

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И МЕХАНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИХ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ ТРАНСПОРТИРОВКЕ

А. А. Степанов, Е. В. Коротаев, В. И. Рабинович, Е. А. Селиванов, Л. П. Астахова, С. А. Пономарев

АУ Югорский НИИ клеточных технологий, Ханты-Мансийск, РосНИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург, Россия.

Резюме

В статье представлено исследование влияния условий транспортировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) периферической крови для трансплантации, на их жизнеспособность и репродуктивную способность.

Проведена экспериментальная оценка влияния температуры и механических воздействий, влияющих при транспортировке различной продолжительности, на важные для исхода трансплантации характеристики трансплантационного материала. Исследование интенсивности цитолитических процессов лейкоцитов выполнено методом проточной цитометрии. Репродуктивная способность ГСК оценивалась методом колониеобразующей активности.

Результаты анализа репродуктивной способности ГСК свидетельствуют о снижении данного показателя через 6 часов транспортировки. Выявленная динамика снижения репродуктивной способности ГСК описывается линейной функцией, что позволяет прогнозировать изменения при длительной транспортировке трансплантационного материала.

Интенсивность цитолитиза лейкоцитов достоверно выше при их хранении при температуре +4°C, чем при +24°C. На репродуктивную способность ГСК температура не оказала значимого влияния. Установлена оптимальная температура транспортировки трансплантационного материала.

Механические воздействия, такие как покачивание, перемешивание и встряхивание не оказали влияния ни на пролиферативный потенциал ГСК, ни на интенсивность цитолитиза лейкоцитов.

Ключевые слова: гемопоэтическая стволовая клетка, трансплантация, условия транспортировки трансплантационного материала.

Effect of temperature variation and shake by long transfer on viability and clonogenic potential of hematopoietic stem cells for clinical transplantation

A. Stepanov, E. Korotaev, V. Rabinovich, E. Selivanov, L. Astahova, S. Ponomarev.

Abstract

We have analyzed the effect of temperature variation and shake on viability and progenitor's ability of hematopoietic stem cells. The result of research presents arguments for choosing of the best conditions for transportation of hematopoietic stem cells for clinical transplantation.

We have made experimental investigations of influence of temperature and shake at different long time at transportation on important characteristic of the transplantation material. We have researched processes of destruction of leukocytes by flow cytometry and progenitor's ability of stem cells by quantitation assay colony of hematopoietic progenitors.

Results of our analysis speak about decrease progenitor's activity of stem cells by the transportation after 6 hours, and them progenitor's activity decrease in during 24 hours. The dynamic of decrease of progenitor's ability of stem cells is describing at linear function and that allows to us to predict of changes of transplantation material at long transportation.

Our research has showed that destruction of leukocytes is more at temperature +4°C, than at temperature +24°C, but progenitor's ability of stem cells has not depended from this temperature conditions. It has showed the optimum temperature of transportation of transplantation material.

Mechanical influences have not effect on progenitor's ability of stem cells and on intensity of destruction of leukocytes.

hematopoietic stem cells, clinical transplantation, conditions of transportation of material for clinical transplantation

Введение

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время является одним из наиболее эффективных методов лечения многих гематологических

заболеваний. Все более широко в качестве источника трансплантационного материала используют не костный мозг, а периферическую кровь, особенно при аутологичной ТГСК. Но пока не все клинические учреждения в России, потенциально способные выполнять ТГСК, имеют условия для хранения трансплантационного материала.

Для реализации ТГСК в подобных учреждениях, нами предложено создание специализированных центров для централизованного хранения трансплантационного материала с выездными бригадами, осуществляющими его заготовку и транспортировку. Такой подход позволит обеспечить единые трансфузиологические стандарты при ТГСК и эффективно использовать дорогостоящее оборудование [1]. При этом необходимо обеспечить оптимальные условия транспортировки для сохранения физиологических качеств трансплантационного материала. Следовательно, возникает необходимость оценить влияние на гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) факторов, возникающих при транспортировке.

Продолжительность транспортировки - один из значимых факторов, возникающих при транспортировке и влияющих на ГСК.

Из данных С.В. Юрасова [2], исследовавшего ГСК пуповиной крови (ПК) методом проточной цитометрии, следует, что при хранении ПК в течение 24 и 48 часов жизнеспособность ГСК составляла, соответственно, 92% и 88% от исходной. Однако при хранении ПК в течение 72 часов отмечалось значительное снижение жизнеспособности общего пула ядродержащих клеток (ЯСК). Abdel-Mageed A. и Hubl W. [3, 4] в своих исследованиях, методом проточной цитометрии, также показали, что при хранении ПК в течение 2-3 суток, прежде всего, страдает жизнеспособность гранулоцитов, а не ГСК. В то же время Shlebak A.A. [5] изучая колониобразующую активность гранулоцитарно-моноцитарного ряда кроветворения (КОЕ-ГМ) и гранулоцитарного ряда кроветворения (КОЕ-Г) ГСК ПК, установил, что при хранении ПК более 9 часов резко снижается колониобразующая активность ГСК. Во всех приведенных исследованиях применялся консервант крови АСД-А.

Таким образом, можно сделать вывод, что лишь анализ колониобразующей активности ГСК позволяет полноценно оценить их репродуктивный потенциал, чрезвычайно важного при ТГСК. Кроме того, допустимое время транспортировки ГСК определяется часами, но не сутками.

Влияние температура температуры, при которой транспортируется и хранится трансплантационный материал до момента консервации, весьма многообразно. Физиологической для клеток крови является температура +37°C. Изменение ее в сторону

повышения нежелательно, так как может вести к денатурации белков, ДНК и РНК и ошибкам считывания информации при репликации ДНК и биосинтезе белков. Такие процессы неизбежно приведут к апоптозу и некрозу клеток.

Понижение температуры экстракорпорально помещенных клеток крови создает термодинамически невыгодные условия для течения биохимических процессов. Угнетается активность пептидаз и нуклеаз, афинность взаимодействий антиген-антитело, экспрессия клетками лигандов - рецепторов апоптоза. Таким образом, понижение температуры трансплантационного материала может снижать интенсивность апоптоза и некроза, тем самым способствуя сохранению физиологических свойств клеток. С другой стороны, известно, что снижение температуры нарушает работу ионных каналов, меняет проницаемость биологических мембран, влияет на механизмы диффузии. Это, в свою очередь, ведет к изменению рН и осмотического давления в клетке и во внеклеточном пространстве, нарушению транспортной функции клеточной мембраны, повышению адгезии и другим, в том числе необратимым, патологическим изменениям со стороны клеток крови.

Таким образом, стоит задача определения оптимального температурного интервала, в пределах которого целесообразно транспортировать ГСК. Решению данной задачи может помочь анализ опыта хранения крови и её компонентов на станциях переливания крови и нормативная база, регламентирующая данный раздел работы этих учреждений.

Так, например, Инструкция по заготовке и консервации донорской крови Минздрава РФ, рекомендует упакованные полимерные контейнеры с донорской кровью помещать в металлические сетки и, в возможно короткий срок, переносить для хранения при температуре от +2°C до +6°C в холодильник. Для повышения кислородно-транспортной функции крови, предназначенной для лечения острой кровопотери, ее хранят при температуре от 0°C до +2°C. Донорскую кровь, предназначенную для выделения концентрата тромбоцитов, хранят при температуре +20°C – +24 °C, но не более 6 часов.

В приказе Минздрава РФ № 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» указывается возможность транспортировки заготовленной ПК при температуре от +15°C до +30°C не более 24 часов.

В большинстве публикаций не отмечают достоверных различий в жизнеспособности иммунокомпетентных клеток крови, хранившихся при температуре в диапазоне от +4°C до +24°C [2, 3, 4]. В этих работах жизнеспособность лейкоцитов и ГСК

определялась на основании оценки проницаемости клеточной мембраны для красителей - 7AAD и трипановый синий с помощью проточной цитометрии и микроскопии. Такие методы определяют клетку как погибшую, если в ее мембране образуются поры, способствующие внутриклеточному проникновению красителя, что происходит в случае некроза. Однако такие методы окраски не позволяют определить клетки, находящиеся в апоптозе, но имеющие пока неповрежденную мембрану. Как сказано выше, в отношении ГСК более информативным можно считать определение их колониеобразующей активности показавшее, что через 9 часов хранения при температуре от +4°C до +24° С, количество КОЕ-ГМ снижалось соответственно на 46% и 70% [5].

Таким образом, нормативные документы по работе с компонентами крови и ГСК ПК, а также опубликованные результаты исследований содержат неоднозначные рекомендации по температуре хранения, целесообразные для трансплантационного материала ГСК. С учетом вышеизложенного, актуально оценивать именно репродуктивную способность ГСК, хранившихся при пониженной (+4°C) и комнатной (+24°C) температуре.

Механические воздействия при транспортировке материала для трансплантации являются одним из факторов, способных влиять на жизнеспособность ГСК. По характеру механические воздействия можно условно разделить на три типа: вибрация, встряхивание и покачивание. В литературных данных отсутствует анализ того, как подобные воздействия могут влиять на трансплантационный материал.

Известно, что выделенные тромбоциты лучше сохраняют свои функциональные свойства при постоянном перемешивании во время хранения [6]. Кроме того, для всех клеток крови отсутствие гемодинамических факторов не является естественным. Клетки крови в сосудах организма постоянно движутся, также движется окружающая их среда. При этом на клетку оказывают влияние силы различного характера - ускорение, гравитация, изменение давления в широких пределах. В определенных границах при постоянном движении клеток меняется рН (легочный круг – периферия), клетки постоянно контактируют друг с другом, получают иницирующие стимулы от эндокринных факторов, антител и антигенов.

Следовательно, необходимо уяснить, как повлияют при отсутствии гемодинамики механические факторы транспортировки на пролиферативную активность ГСК, помещенных вне организма.

Цель исследования: Оценить влияние механического воздействия с различной экспозицией при температуре +24°C и +4°C на интенсивность цитолитиза лейкоцитов и пролиферативную активность ГСК периферической крови.

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленной целью, необходимо в лабораторных условиях смоделировать условия транспортировки. Однако такое моделирование при работе с клиническим материалом противоречит этическим нормам, но возможно при проведении экспериментальных контролируемых проспективных исследований с ГСК ПК, разрешенных приказом № 325 МЗ РФ.

Экспериментальный материал ПК был получен нами в процессе естественных родов, непосредственно после отхождения и отделения плаценты, из плацентарного сегмента пуповинной вены. ПК собиралась в контейнер для сбора донорской крови, содержащий консервант АСD-А и транспортировалась в Югорский НИИ клеточных технологий в течение 2 ч., где проводилась ее исследование при помощи проточной цитометрии и определения колониеобразующей активности ГСК. Затем ПК помещалась в моделированные условия транспортировки.

Для эксперимента ПК делили на несколько частей. Одну часть помещали в комнатную температуру +24°C, другую – температуру, рекомендованную для хранения донорской крови +4°C в защищенном от света месте. Моделирование механических воздействий осуществлялось при той и другой температуре с помощью программируемого шейкера MultiBio 3D (Biosan, Латвия) в режиме орбитального перемешивания и покачивания, и проводили сравнение с контрольными – неподвижно находящимися при данной температуре образцами.

Группа I: Пакет с ПК находится при температуре +24°C неподвижно.

Группа II: Пакет с ПК находится при температуре +24°C на шейкере.

Группа III: Пакет с ПК находится при температуре +4°C неподвижно.

Группа IV: Пакет с ПК находится при температуре +4°C на шейкере.

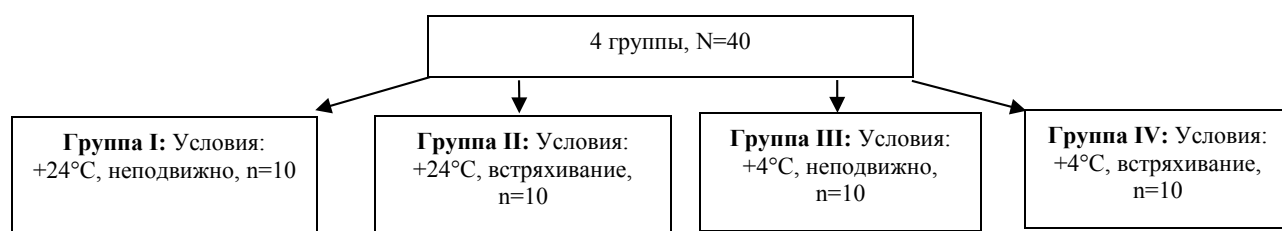


Рис. 1. Схема распределение ПК по группам в моделированных условиях.

Отбор проб ПК для анализа осуществлялся непосредственно перед началом эксперимента, а затем через 6, 12 и 24 часа, в каждой группе было по 10 наблюдений.

Для оценки колониеобразующей активности ГСК использована метилцеллюлозная среда MethoCult H4434. Результаты анализа КОЕ ГСК выражался в количестве образованных колоний на 10^4 лейкоцитов внесенных в одну чашку Петри. Оценка влияния каждого фактора выражалась в процентном отношении, и рассчитывалась по формуле:

$$\text{Влияние фактора} = \frac{\text{КОЕ после воздействия фактора}}{\text{КОЕ (исходное)}} \times 100\%$$

Цитолитоллиз лейкоцитов оценивался с помощью проточной цитометрии с моноклональными антителами CD45+ и витальным красителем 7AAD. Результаты анализа цитолитической активности лейкоцитов выражались в процентном отношении сохранившихся с неповрежденной мембранной клеток к их исходному количеству. Оценка влияния каждого фактора выражалась в процентном отношении и рассчитывалась по формуле:

$$\text{Влияние фактора} = \frac{\% \text{ неповрежденных лейкоцитов после воздействия фактора}}{\% \text{ неповрежденных лейкоцитов (исходное)}} \times 100\%$$

Для оценки нормальности распределения в каждой выборке применялся критерий Пирсона. Поскольку была установлена нормальность распределения, выборки сравнивались с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Оценка колониеобразующей активности ГСК в группах, где моделировалась транспортировка при различных температурных режимах представлено в таблице 1.

Таблица 1.

Колониеобразующая активность ГСК, подвергавшихся, при различной температуре, механическому воздействию с различной экспозицией.

Группы	Экспозиция , часы	Колониеобразующая активность ГСК, % M± m
Группа I: +24°C, неподвижно, n= 10	6	87,6±3,7
	12	62,8±5,8
	24	41,8±11,4
Группа II: +24°C, встряхивание, n= 10	6	83,1±7,6
	12	62,1±6,9
	24	40,2±9,7

Группа III: +4°C, неподвижно, n= 10	6	79,1±5,3
	12	60,8±8,3
	24	35±7,1
Группа IV: +4°C, встряхивание, n= 10	6	84,5±4,6
	12	64,4±7,3
	24	35,6±10,8

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, вибрация и температура не оказали влияния на колониобразующую активность ГСК, подвергшихся этим воздействиям с одинаковой экспозицией. Достоверных различий между группами, находившимися в вышеописанных условиях 6 часов, не выявлено. Аналогичные результаты получены в группах подвергавшихся вибрации 12 часов при различной температуре, и между группами, находившимися в моделированных условиях 24 часа. Вследствие этого, для дальнейшего анализа КОЕ, мы объединили группы с одинаковой экспозицией, и рассматривали четыре группы – исходную (n= 40), транспортировавшуюся 6 часов (n= 40), 12 часов (n= 40) и 24 часа (n= 40).

При этом достоверное снижение ($P \leq 0,05$) колониобразующей активности ГСК обнаружено уже через 6 часов моделирования транспортировки. На рис. 2 видно, что колониобразующая активность в среднем составила через 6 часов 84%±6,1, через 12 часов 63%±6,9, а через 24 часа - 38%±9,9. Таким образом, снижение данного показателя составило соответственно – 16%±1,2, 37%±4,1 и 62%±6,1.

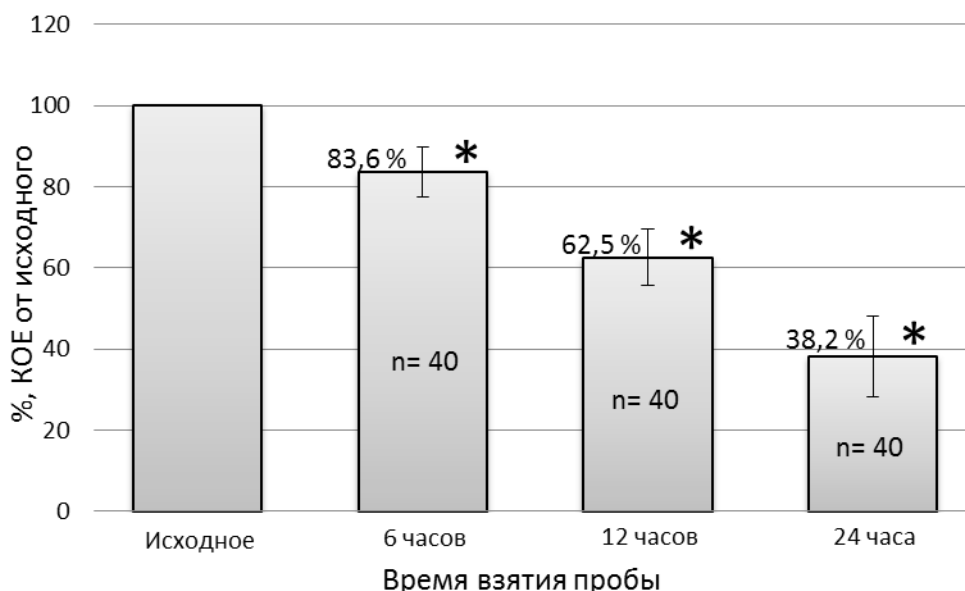


Рис. 2. Изменение колониобразующей активности ГСК в зависимости от времени транспортировки. (* - $P \leq 0,05$, отличия достоверны в сравнении с контролем. Контролем является исходное количество КОЕ в образце, принимаемое за 100 %).

Оценка цитолитической активности лейкоцитов, представленная на рис. 3, показала, что моделировании условий транспортировки при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и при температуре $+24^{\circ}\text{C}$ обеспечило сохранность лейкоцитов через 6 часов близкую к 100%. При температуре $+4^{\circ}\text{C}$ через 12 часов она составила $87\% \pm 2,6$, а через 24 часа – $82\% \pm 3,9$. При моделировании транспортировки в условиях комнатного температурного режима ($+24^{\circ}\text{C}$) сохранность лейкоцитов составила через 12 - $96,2\% \pm 1,18$, а через 24 часа - $93,5\% \pm 2,5$.

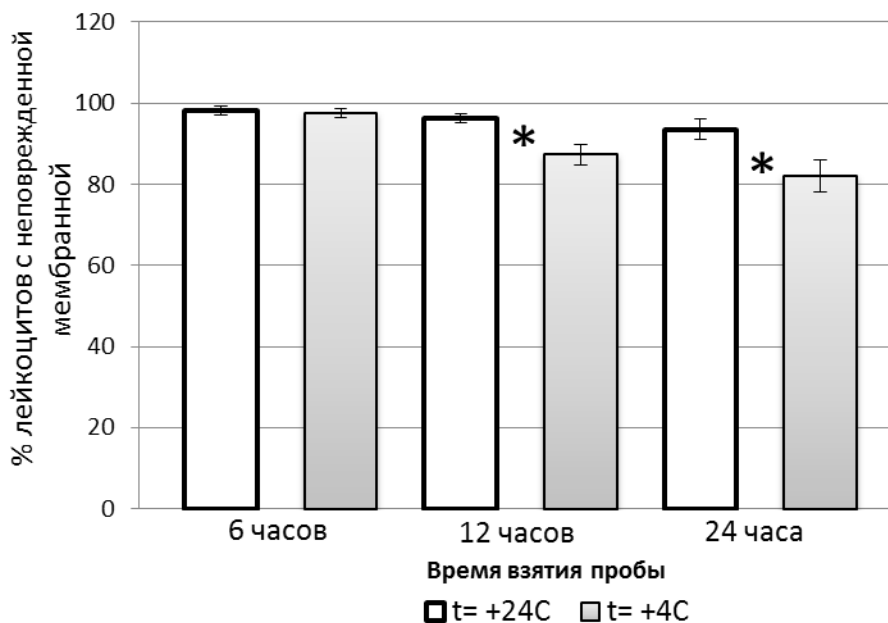


Рис. 3. Изменение цитолитической активности лейкоцитов в зависимости от продолжительности транспортировки при двух вариантах температурного режима (* - $P \leq 0,01$, отличия между группами с разным температурным режимом, находившимися в одном временном диапазоне достоверны).

Таким образом в группах, где моделирование транспортировки осуществлялось при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, лизис лейкоцитов оказался достоверно выше ($P \leq 0,01$), чем в соответствующих группах при температуре $+24^{\circ}\text{C}$ через 12 часов на 9%, а через 24 часа - на 12%.

Обсуждение результатов

Для выявления оптимальных условий транспортировки трансплантационного материала, нами проведен анализ значимости факторов, влияющих на качество материала,

т.е. на способность ГСК к воспроизводству, таких как продолжительность транспортировки, температура и механические воздействия на ГСК.

Экстраполируя результаты полученные в эксперименте, на условия реальной продолжительности транспортировки трансплантационного материала, было показано, что пролиферативный потенциал ГСК начинает снижаться непосредственно после момента получения трансплантационного материала. Выявлено, что пролиферативный потенциал ГСК снижается по зависимости, близкой к линейной, которая не имеет критических точек изменения динамики данного показателя. При этом, уже через 6 часов транспортировки выявлено достоверное снижение пролиферативного потенциала ГСК.

Полученная зависимость колониобразующей активности от времени, позволяет математически рассчитать прогнозируемый пролиферативный потенциал, зная предполагаемое время транспортировки. Для расчета используется формула линейной функции:

$$\text{КОЕ}(\%) = -k \times T + 100\%$$

где k – угловой коэффициент прямой, который равен тангенсу угла прямой, в нашем случае $k = -0,047$, T – время транспортировки в минутах; 100 % - исходное количество КОЕ в материале. Результат полученный с помощью данной формулы должен учитываться с поправкой $\pm 7\%$, то есть принимать во внимание стандартное отклонение, полученное в эксперименте.

Таким образом, полученные данные позволяют прогнозировать снижение пролиферативного потенциала ГСК в трансплантационном материале, зная предполагаемое время его транспортировки.

Обращает на себя внимание, что полученные нами данные совпадают с рекомендациями, изложенными в «Инструкции по заготовке и консервации донорской крови Минздрава РФ», где сказано что «контейнеры с донорской кровью в возможно короткий срок переносить для хранения».

В приказе Минздрава РФ № 325 «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» указывается возможность транспортировки заготовленной ПК в течение 24 часов. Однако, согласно полученным нами данным, через 24 часа транспортировки пролиферативный потенциал ГСК составляет только 38,2 % от исходного, несмотря на умеренное проявление цитолитиза. Таким образом, учитывая вероятную значительную потерю качества ГСК, как материала для трансплантации, при транспортировке на

большие расстояния не криоконсервированных ГСК, целесообразнее выбор доставки при помощи воздушного транспорта.

Для анализа влияния температура транспортировки на качество трансплантационного материала нами были выбраны два температурных режима - при +4°C и при +24°C.

Было показано, что через 12 часов транспортировки цитолиз лейкоцитов достоверно выше при температуре +4°C, чем при +24°C. Различия между группами составили 9%. Через 24 часа различия в степени цитолиза между группами увеличились и составили 12 %. Такие результаты могут быть обусловлены нарушением работы ионных каналов мембран лейкоцитов, что характерно для инкубации клеток крови при низких температурах. Очевидно, что при длительных воздействиях низкой температуры, данные изменения в клетках могут привести к интенсивному цитолизу.

Таким образом, оптимальной температурой транспортировки трансплантационного материала является температура около +24°C, что соответствует рекомендациям изложенным в Приказе Минздрава РФ № 325.

Рекомендации, изложенные в «Инструкции по заготовке и консервации донорской крови», где рекомендована температура от +2°C до +6°C предназначены прежде всего для сохранения кислород-транспортной функции эритроцитов, что важно для цельной крови, предназначенной для выделения эритроцитов.

Механические воздействия, такие как покачивание, перемешивание и встряхивание не оказали влияния на пролиферативный потенциал ГСК и на интенсивность цитолиза лейкоцитов.

Мы видим, что правила перевозки трансплантационного материала регламентированы в ГОСТ Р 53420-2009 и Приказе Минздрава РФ № 325 от 25.07.2003. В указанных документах отражены требования к транспорту и персоналу обеспечивающему транспортировку, а так же правила обращения с биоматериалом. Однако данные документы не содержат детальных указаний для транспортировки трансплантационного материала ГСК. Проведенное нами исследование было направлено на определение не отраженных в выше указанных документах оптимальных параметров транспортировки не замороженных ГСК. Результаты исследования позволили сделать следующие **выводы:**

1. Цитолиз ядеросодержащих клеток наименее выражен при их транспортировке при температуре +24°C.

2. Механические воздействия при транспортировке (покачивание и встряхивание) не оказывают влияния на свойства ГСК.
3. Продолжительность транспортировки в пределах 24 часов не оказывает влияния на цитолиз ядеросодержащих клеток.
4. Пролиферативный потенциал ГСК падает, начиная с момента их получения, по линейной зависимости.

Литература

1. Рабинович В.И. Организационные и технологические основы аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в онкогематологии / Методические рекомендации для врачей. – СПб, 2011. – 54 с.

1. Юрасов С.В., Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. и др. Выделение гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации// Гематол. и трансфузиол.- 1997.- Т.42.- №2.- С.10-15.

2. Abdel-Mageed A., Hutcheson C.E., Braylan R.C et al. Feasibility of umbilical cord blood unit collection and processing for volume reduction and thawing: Effect on cell loss, viability and clonogenic potential// Blood.- 1997.- Vol.90, N10.- P.321b (4195).

3. Abdel-Mageed A., Rosalio M.L.U., Hutcheson C.E. Effect of temperature variation on cell number, viability and clonogenic potential// Blood.- 1997.- Vol.90, N.10.- P.321b (4194).

4. Shlebak A.A., Marley S.B., Roberts I.A. et al. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation// Bone Marrow Transplant.- 1999.- Vol. 23.- N. 2.- P. 131-136.