

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ УЧЕТ CD34⁺ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЦЕЛЬНОЙ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

А.В. Куртова, Е.Е. Зуева

Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики,

Центр лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: пуповинная кровь, CD34⁺ гемопоэтические стволовые клетки, проточная цитометрия

Пуповинная кровь является альтернативным костному мозгу и мобилизованной периферической крови источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Популяция CD34⁺ клеток в пуповинной крови является малочисленной, что создает определенные трудности при проведении количественного учета ГСК. В данной статье рассмотрены некоторые практические аспекты определения CD34⁺ ГСК в цельной пуповинной крови. Предварительная оценка количества ГСК в образцах до начала подготовки к длительному хранению может стать дополнительным критерием отбора при приеме пуповинной крови в некоммерческие анонимные банки.

Введение

Пуповинная кровь является источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и может быть использована в качестве альтернативы костному мозгу для проведения трансплантаций при лечении ряда гематологических и наследственных заболеваний [1]. Успешность трансплантации во многом зависит от достаточного количества CD34⁺ ГСК на килограмм массы тела реципиента, поэтому содержание CD34⁺ ГСК в образце пуповинной крови в значительной мере определяет его трансплантационную состоятельность [2].

Развитие практики банкирования пуповинной крови привело к необходимости проведения сепарации образцов различными методами перед помещением на длительное хранение в жидкий азот. При апробации протоколов сепарации и криоконсервации, а также при изучении влияния процедур обработки на сохранность стволовых клеток учет CD34⁺ ГСК обособанно проводить в трех типах образцов пуповинной крови:

- в цельной пуповинной крови непосредственно после ее получения;
- после сепарации перед криоконсервацией;
- после размораживания.

Последней редакцией стандартов NETCORD/FACT банкам пуповинной крови рекомендовано проводить исследование содержания CD34⁺ после завершения всех подготовительных процедур, т.е. непосредственно перед криоконсервацией образца, а при планировании проведения неродственной аллогенной трансплантации – также после размораживания [3]. Тем не менее, на начальных этапах работы банков для проведения внутреннего контроля качества процедур сепарации, при хранении нефракционированной пуповинной крови, а также в случаях научных исследований с использованием пуповинной крови может возникнуть необходимость проведения количественного учета CD34⁺ ГСК в образцах цельной пуповинной крови.

Важно отметить, что подготовка пуповинной крови к длительному хранению требует проведения достаточно большого

количества дорогостоящих исследований и процедур. При аутологичном коммерческом хранении или родственном аллогенном некоммерческом хранении (например, долгосрочное хранение в медицинском учреждении пуповинной крови от сиблинга пациента) относительно невысокое содержание CD34⁺ ГСК не является противопоказанием к банкированию [4]. В таких случаях важно сохранить даже небогатые ГСК образцы пуповинной крови.

Целью некоммерческих анонимных банков является заготовка, хранение и предоставление пуповинной крови для неродственных аллогенных трансплантаций, когда трансплантационная состоятельность образца (в частности, количество CD34⁺ ГСК) приобретает особую важность.

При планировании неродственного хранения необходимо учитывать, что для пуповинной крови здоровых новорожденных характерен относительно невысокий лейкоцитоз (в среднем, $10,8 \times 10^9$ /л, что на порядок ниже, чем в костном мозге и периферической крови взрослых), а объем образца в среднем не превышает 100 мл [5]. Для успешного приживания трансплантата количество ядросодержащих клеток должно быть не менее $2,5 \times 10^7$ /кг массы тела реципиента [6], поэтому объем и абсолютный лейкоцитоз служат прогностическими критериями пригодности образца для трансплантации.

При использовании неродственного трансплантата нет возможности проведения повторного забора ГСК и лимфоцитов у донора, а опыт *ex vivo* экспансии и трансплантации нескольких объемов пуповинной крови пока не вошел в широкую клиническую практику. Количество CD34⁺ ГСК при трансплантации пуповинной крови может быть на порядок меньше, чем при использовании костного мозга или аферезного продукта: $1,7-2,3 \times 10^5$ /кг против 2×10^6 /кг [2, 6], но необходимо помнить, что пуповинная кровь является чрезвычайно вариабельным по количеству ГСК источником.

Выявлено, что содержание ГСК в образце положительно коррелирует с его объемом, абсолютным лейкоцитозом, с весом новорожденного и другими факторами [7]. Тем не менее, не всегда понятно, как поступать с образцами, имеющими объем, близкий к 40 мл, который принято считать нижней границей приема пуповинной крови на хранение при некоммерческом неродственном банкировании [3]. Известно также, что значительное содержание лейкоцитов в пуповинной крови может свидетельствовать о наличии инфекционного процесса, что требует проведения дополнительных исследований для подтверждения инфекционной безопасности будущего трансплантата, или быть опосредовано присутствием ядросодержащих эритроидных предшественников [4].

В связи с этим возникает вопрос: насколько универсальными критериями отбора являются объем образца и его

лейкоцитоз? Оправданы ли проведение полного обследования образца, подготовка его к хранению и криоконсервация при невысоком содержании CD34⁺ ГСК еще в цельной пуповинной крови?

Проточная цитометрия позволяет осуществлять быстрый количественный учет CD34⁺ ГСК [8]. Наличие данных по объему и абсолютному лейкоцитозу дает возможность в течение одного часа получить предварительные результаты об абсолютном количестве ГСК в образце цельной пуповинной крови. С учетом поправок на потерю клеток в процессе сепарации и криоконсервации, данная информация может послужить дополнительным критерием отбора образцов пуповинной крови непосредственно перед началом всех процедур подготовки к хранению.

Популяция CD34⁺ клеток в пуповинной крови является малочисленной и гетерогенной по экспрессии данного маркера, что создает определенные трудности при проведении количественного учета ГСК. Ниже представлены некоторые практические аспекты определения CD34⁺ ГСК в образцах цельной пуповинной крови.

Материалы и методы

1. Образцы пуповинной крови

Образцы пуповинной крови (n=20) были получены от пациенток клиники акушерства и гинекологии СПбГМУ после нормальных срочных родов. Сбор пуповинной крови был осуществлен из пупочной вены в стандартные контейнеры для донорской крови объемом 250 мл с внесенным антикоагулянтом CPDA (цитрат/фосфат/декстран/аденин) (CPDA-1 Baxter Transfer Bag, S.A. de C.V., Mexico).

2. Подготовка проб

Подготовка проб для выявления CD34⁺ ГСК в образцах цельной пуповинной крови была осуществлена по методике окрашивание-лизис-отмывка (n=19), а также по методике окрашивание-лизис (n=1).

Клетки (не менее 2–3×10⁶/мл) были инкубированы при +4°C в темноте в течение 30 минут со следующими моноклональными антителами: IgG1-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) и IgG2-PE (BD) для выявления уровня неспецифического окрашивания, CD45-FITC (BD) для выявления лейкоцитов, CD34-PE (BD) для выявления ГСК. Для лизирования эритроцитов в образцах, подготовленных по методике окрашивание-лизис-отмывка, был использован рабочий раствор FACSlyse (BD, Biosciences, USA). Отмывка центрифугированием (5 минут при 300×g) с использованием FACSFlow (BD, Biosciences, USA) была проведена дважды, после чего клетки были проанализированы в течение часа. Для лизирования эритроцитов в образцах, подготовленных по методике окрашивание-лизис, был использован рабочий раствор EasyLyse (DakoCytomation, Denmark) согласно рекомендациям производителя.

3. Анализ антигенной экспрессии

Анализ антигенной экспрессии образцов был проведен на проточном цитометре DAKO Galaxy (Dako, Denmark) с использованием программного обеспечения Flomax (Dako) по модифицированному двухплатформенному протоколу ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) [9]. Для получения коэффициента вариации по экспрессии CD34 не более 15% было учтено не менее 75 000 событий и не менее 50 CD34⁺ клеток [10]. Флюоресценция была учтена при 512–547 нм и 571–591 нм для FITC и PE каналов флюоресценции на первом (log FL1) и втором (log FL2) фотоумножителях. Компенсация наложения флюоресценции была осуществлена средствами программного обеспечения. Для определения установок на всех фотоумножителях и под-

бора значений компенсации наложения флюоресценции были использованы неокрашенные лимфоциты здоровых доноров, окрашенные CD45-FITC/CD14-PE мононуклеары здоровых доноров и стандартизированные калибровочные частицы (Fluoro Spheres, DAKO; Calibrite 3, BD). Лаборатория проходит регулярную оценку контроля качества исследований, участвуя в программах FCVOK, EQAS, CEQUAL.

Результаты и обсуждение

При работе с образцами цельной пуповинной крови в некоторых случаях бывает достаточно сложно создать логическое ограничение (гейт) по ядросодержащим событиям (лейкоцитам) на двумерной гистограмме прямого и углового светорассеяния (FSC/SSC), что может быть связано с индивидуальными особенностями образца (рис. 1). В связи с этим, учет экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45 является наиболее корректным способом выделения лейкоцитов при работе с цельной пуповинной кровью.

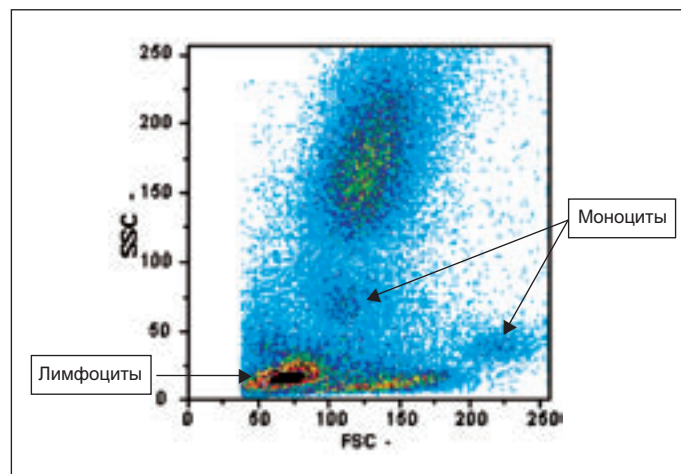


Рис. 1. Двумерная гистограмма параметров светорассеяния образца цельной пуповинной крови. Обращает внимание необычная картина распределения популяций лимфоцитов и моноцитов. Принадлежность кластеров к указанным популяциям была определена с помощью анализа гистограммы CD45/SSC

Следует помнить, что в пуповинной крови могут присутствовать ядросодержащие эритроидные предшественники, что приводит к завышению количества лейкоцитов [11]. В обычной практике нет возможности осуществлять деплецию по гликофору А, а стандартные лизирующие растворы не позволяют удалить предшественники эритроцитов, содержащие ядро. Отсутствие экспрессии CD45 у ядросодержащих эритроидных предшественников дает возможность исключить их из исследования при создании логического ограничения по лейкоцитам.

При анализе одномерной гистограммы экспрессии CD45 все события, лежащие правее первого логарифма и формирующие пики с промежуточным (гранулоциты) и высоким (мононуклеары) уровнем экспрессии, можно определить, как лейкоциты (рис. 2Б).

Наложение логического ограничения CD45⁺ событий на двумерную гистограмму CD45/SSC позволяет исключить дребес и ядросодержащие эритроидные предшественники из анализа и оценить относительное содержание мононуклеаров, которые обладают высоким уровнем экспрессии CD45 (рис. 2В).

Необходимо учитывать, что в пуповинной крови могут присутствовать лимфоциты с уровнем экспрессии CD45, который соответствует бластам костного мозга (CD45^{dim}). Во многих случаях именно эти клетки являются стволовыми, поэтому важно не исключить их при создании логического ограничения.

При проведении количественного учета ГСК можно применять дополнительный маркер CD14 для создания более точного логического ограничения по мононуклеарам, что в дальнейшем может служить для внутреннего контроля правильности создания гейтов [12]. Учитывая возможное присутствие малоклеточной популяции с промежуточным уровнем экспрессии CD45 и низким уровнем гранулярности, применение дополнительного маркера CD14 при анализе пуповинной крови нецелесообразно.

На гистограмме CD45-FITC/CD34-PE ГСК формируют малоклеточную популяцию с яркой экспрессией обоих маркеров. Приложение к гистограмме логического ограничения, созданного по лейкоцитам, позволяет исключить из анали-

за дебрис и выделить целевую популяцию (рис. 2Г).

После приложения гейта по лейкоцитам к гистограмме CD34/SSC можно выявить популяцию с яркой экспрессией маркера CD34 (рис. 2Д). Количественное совпадение ГСК в гейтах, созданных на гистограммах CD45/CD34 и CD34/SSC, является подтверждением корректности созданных логических ограничений, что позволяет проводить контроль качества результатов анализа каждого образца при учете малоклеточной популяции ГСК.

Обязательным условием подтверждения правильности выделения популяции ГСК является обратное гейтирование CD45⁺CD34⁺ событий (для точного обозначения которых необходимо создать логический гейт, представляющий собой сумму гейтов по лейкоцитам и CD34⁺ клеткам). События, которые будут расположены вне области лимфоцитов на гистограмме FSC/SSC, не могут быть учтены как истинные ГСК, т.к. только клетки, принадлежащие области лимфоцитов и формирующие кластер, будут обладать клоногенной активностью (рис.2Е).

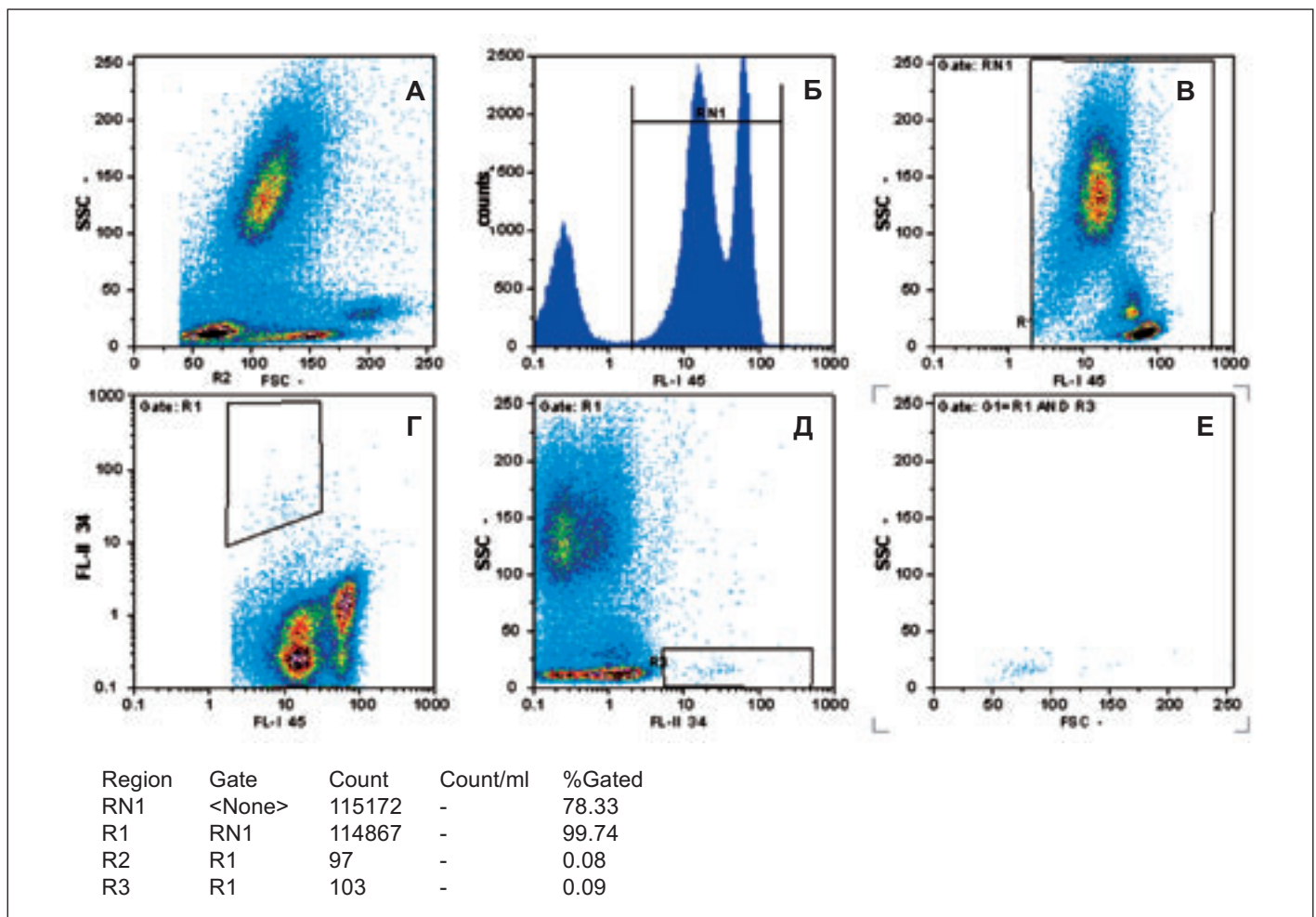


Рис. 2. Последовательность создания логических ограничений при проведении количественного учета ГСК:

А – двумерная гистограмма параметров светорассеяния. Необходимо обратить внимание на область расположения лимфоцитов.
Б – одномерная гистограмма экспрессии CD45. Гейт RN1 позволяет выделить CD45⁺ события. Внутри созданного гейта левый пик формируют гранулоциты, правый пик формируют мононуклеары.

В – гейт R1 ограничивает лейкоциты. Особое внимание необходимо уделять популяции лимфоцитов с промежуточным уровнем экспрессии CD45.

Г, Д – гейты R2 и R3 ограничивают целевую популяцию с высоким уровнем экспрессии CD34.

Е – обратное гейтирование CD45⁺CD34⁺ событий на гистограмму FSC/SSC подтверждает их принадлежность к области лимфоцитов. Количественное совпадение ГСК в гейтах R1 и R2 подтверждает правильность созданных логических ограничений

В некоторых случаях, использование гейта по лейкоцитам не позволяет однозначно выявить интересующую нас популяцию ГСК на гистограмме CD45/CD34 (рис. 3).

Приложение к гистограмме логического ограничения, созданного по мононуклеарам с учетом популяции лимфоцитов с промежуточным уровнем экспрессии CD45 дает возможность более корректного определения данной популяции (рис. 4). Формально, применение гейта по мононуклеарам

позволяет изначально не включать в исследование события, среди которых нет клеток, обладающих клоногенным потенциалом. Сепарация, криоконсервация и размораживание приводят к значительной потере гранулоцитов, поэтому при оценке трансплантационной состоятельности образца после размораживания применение гейта по мононуклеарам позволит достигнуть большей сопоставимости результатов.

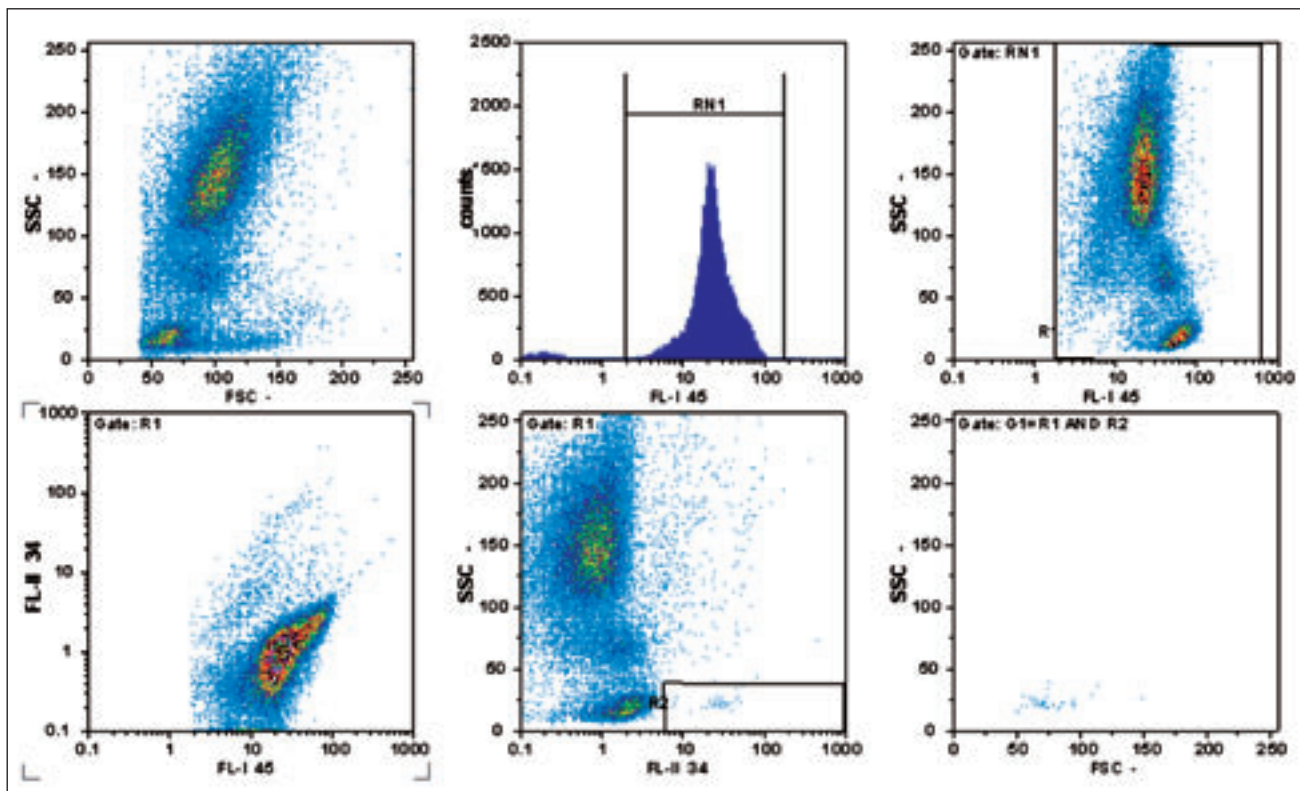


Рис. 3. Образец N. Двумерная гистограмма параметров светорассеяния. Наложения логического ограничения по лейкоцитам на гистограмму CD45/CD34 в данном случае не позволяет однозначно выявить популяцию ГСК

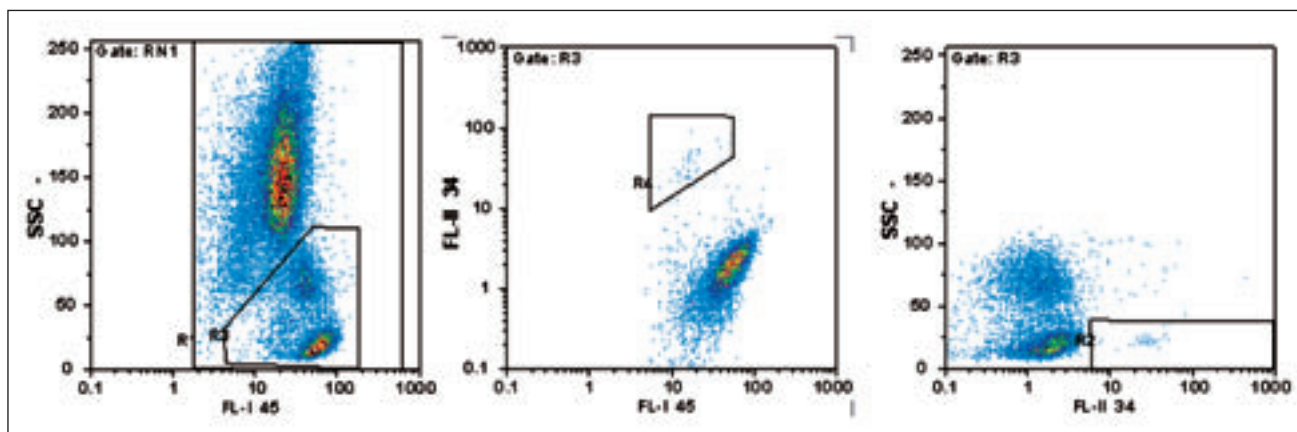


Рис. 4. Образец N. Двумерная гистограмма параметров светорассеяния. Наложение логического ограничения по мононуклеарам на гистограмму CD45/CD34 позволяет выявить целевую популяцию, что подтверждено количественным совпадением ГСК в гейтах R2 и R4

Внутри популяции $CD34^+$ ГСК может быть выявлена гетерогенность по экспрессии $CD34$ (рис. 5). При использовании способа окрашивание–лизис, в образце цельной пуповинной крови было выявлено две популяции $CD34^+$ клеток: $CD34^{bright}$ и $CD34^{dim}$. Присутствие двух популяций ГСК является индивидуальной особенностью отдельного образца, но известно, что процедура отмывки после лизирования вносит основной вклад в потерю ГСК при анализе.

Протокол окрашивание–лизис без последующей отмывки является более предпочтительным при работе с цельной пуповинной кровью. В работе Brocklebank et al. также указано, что использование реагента FACSLyse приводит при анализе к значительным занижениям количества $CD34^+$ ГСК по сравнению с лизирующими растворами на основе хлорида аммония, не содержащими фиксаторов [11].

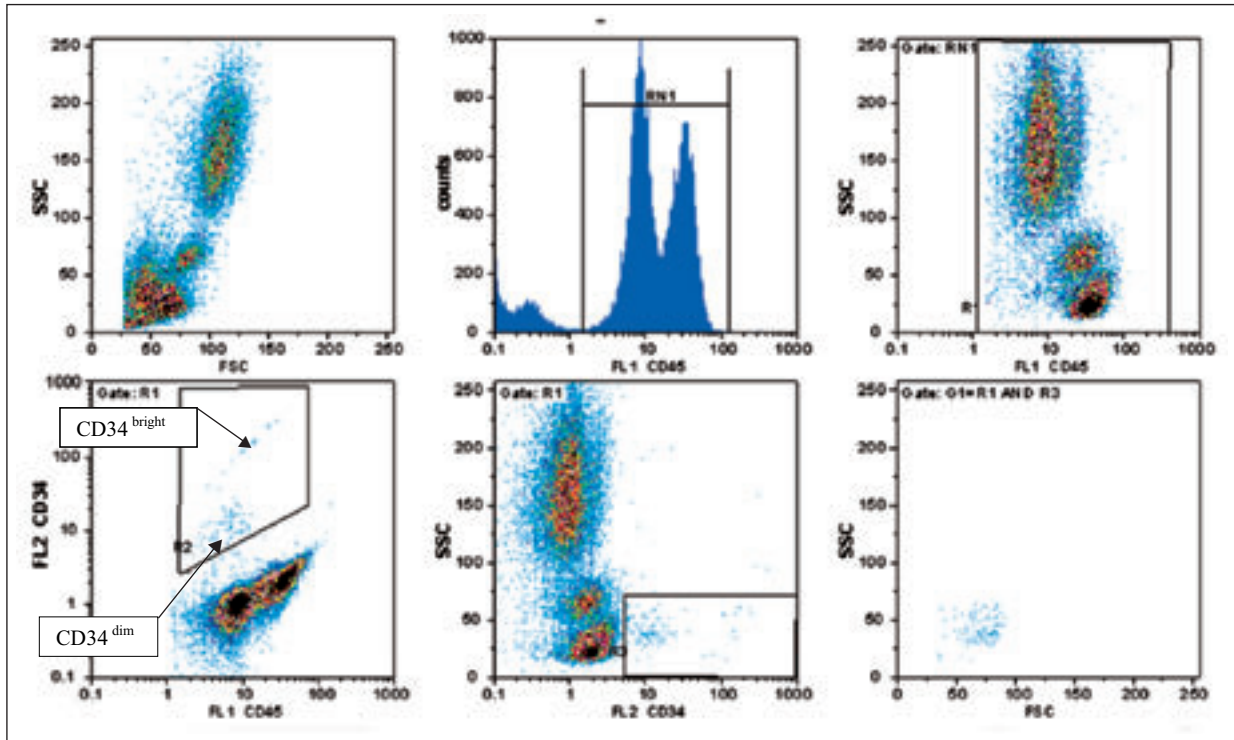


Рис. 5. Выявление двух популяций $CD34^+$ клеток в образце цельной пуповинной крови, подготовленном по протоколу окрашивание–лизис. Проведение обратного гейтирования подтвердило принадлежность обеих популяций к области лимфоцитов

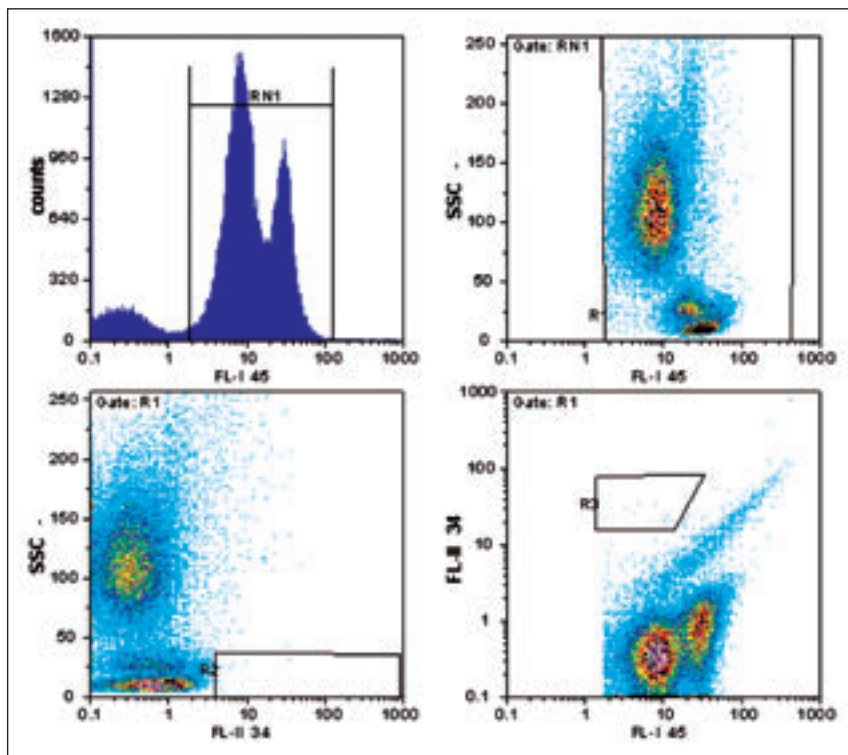


Рис. 6. Образец цельной пуповинной крови с очень низким содержанием ГСК $CD34^+$ клетки малочисленны и не формируют кластера, что свидетельствует об отсутствии у них клоногенной активности

Анализ содержания ГСК в цельной пуповинной крови позволяет быстро определить образцы с очень низким содержанием ГСК или их отсутствием (рис. 6). Очевидно, что хранение подобных образцов не является обоснованным.

Учет ГСК в цельной пуповинной крови может войти в рутинную практику отбора образцов для неродственного использования, которые планируют поместить на хранение в некоммерческие банки. Обнаружение очень низкого содержания ГСК или их отсутствия может стать дополнительным критерием отказа в помещении образца на хранение. Важно отметить, что даже в образцах с нормальным для пуповинной крови лейкоцитозом и объемом более 40 мл не всегда присутствуют ГСК, что ставит вопрос о пригодности таких образцов для аллогенных неродственных трансплантаций в будущем.

Сепарация, криоконсервация и размораживание приводят к потере ГСК [13], что также необходимо учитывать при приеме на хранение образцов с очень низким содержанием ГСК. Хотя во всех банках пуповинной крови учет ГСК проводят непосредственно перед криоконсервацией, информация об очень низком содержании ГСК в образце цельной пуповинной крови позволит вообще не начинать подготовку такого образца к хранению.

Если количественный учет ГСК с помощью проточной цитометрии является рутинной процедурой, лаборатория постоянно работает с одним набором антител, проводит ежедневную калибровку прибора, то анализ образцов цельной пуповинной крови можно проводить без применения отрицательного изотипического контроля. Для получения предварительных данных о присутствии в образце ГСК принято анализировать не менее 75 000 событий. Такое допущение позволяет снизить расход реагентов на подготовку проб, однако, в случае принятия образца на хранение количественный

учет ГСК с анализом жизнеспособности в соответствии со всеми требованиями протокола ISHAGE обязательно должен быть проведен непосредственно перед криоконсервацией.

В случае именного хранения образца пуповинной крови, полученной от сиблинга пациента, страдающего лейкозом или наследственным заболеванием, пуповинную кровь обычно не фракционируют перед криоконсервацией, чтобы сохранить максимальное количество гемопоэтических предшественников [4]. В таких случаях количественный учет ГСК проводят в цельной пуповинной крови.

При работе с цельной пуповинной кровью следует учитывать, что:

- подготовку проб лучше осуществлять с использованием лизирующих растворов, не содержащих фиксаторов, а также позволяющих не проводить отмычки после использования;
- обязательным условием корректности создания ограничений по лейкоцитам является анализ одномерной гистограммы экспрессии CD45, что позволяет исключить из анализа не только дебрис, но и ядродержащие эритроидные предшественники;
- в пуповинной крови могут присутствовать лимфоциты с промежуточным уровнем экспрессии CD45;
- выделение целевой популяции не только на гистограмме CD34/SSC, но и на гистограмме CD45/CD34 позволяет проводить внутренний контроль правильности созданных логических ограничений;
- использование гейта по мононуклеарам для создания логического ограничения области ГСК в некоторых случаях может быть предпочтительным;
- популяция ГСК может иметь неоднородный уровень экспрессии CD34.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Watt S., Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin. Fetal. Neonat. Med.* 2005; 10: 209–20.
2. Bradley M.B., Cairo M.S. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human Immunol.* 2005; 6: 431–46.
3. International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and Release. NETCORD/FACT 2006; 1–65.
4. Warwick R., Armitage S. Cord blood banking. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2004; 18(6): 995–1011.
5. Gluckman E., Rocha V., Chastang C. Use of cord blood cells for banking and transplant. *The Oncologist* 1997; 2: 340–3.
6. Tse W., Laughlin M.J. Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Education Programme Book* 2005; 377–83.
7. Nakagawa R., Watanabe T., Kawano Y. et al. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34⁺ cell yield for cord blood banking. *Transfusion* 2004; 44(2): 262–7.
8. Gratama J., Sutherland D.R., Keeney M., Papa S. Flow cytometric

enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2001; 15: 14–22.

9. Sutherland D.R., Anderson L., Keeney M. et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *J. Hematother.* 1996; 5: 213–26.

10. Gutensohn K., Serke S., Cassens U. et al. German societies of hematology/oncology and transfusion medicine and immunohematology for flow cytometric CD34-determination. *Infusionsther Transfusionmed.* 1996; 23(suppl 2): 1–23.

11. Brocklebank A.M., Sparrow R.L. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry* 2001; 46: 254–61.

12. Зуева Е.Е., Молчанова И.В., Комарова Л.С. и др. Особенности количественного определения гемопоэтических стволовых клеток методом проточной цитометрии. *Молекулярная медицина* 2006; В печати.

13. Laroche V., McKenna D.H., Moroff G. et al. Cell loss and recovery in umbilical cord processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion* 2005; 45: 1909–16.