МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЇ ТА ПАТОЛОГІЧНОЇ ФІЗІОЛОГІЇ

IV науково-практична конференція
студентів та молодих вчених з міжнародною участю

«ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ»

19 травня 2022 р.
ХАРКІВ – Україна

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА НОРМАЛЬНОЇ ТА ПАТОЛОГІЧНОЇ ФІЗІОЛОГІЇ

IV науково-практична конференція
студентів та молодих вчених з міжнародною участю

«ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ ПАТОФІЗІОЛОГІЇ ДО ДОСЯГНЕНЬ СУЧАСНОЇ МЕДИЦИНИ І ФАРМАЦІЇ»

19 травня 2022 р.
ХАРКІВ – Україна

ОЦІНКА СТАДІЙ АПОПТОЗУ/НЕКРОЗУ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ В РОЗЧИНАХ, ЩО МІСТЯТЬ РІЗНУ КОНЦЕНТРАЦІЮ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ І АНТИОКСИДАНТУ ТРОЛОКСУ

Зубов П. М.*, Зубова О. Л.*, Бабійчук А. В.**
**Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна*
***Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна*
pmzubov@gmail.com

Вступ. Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до використання кордової крові (КК) людини призвела до необхідності створення банків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані за температури -196ºС протягом практично необмеженого часу без втрати їх біологічних властивостей. Проте невеликі об'єми кожної дози КК та неможливість повторного забору потребують застосування оптимального методу кріоконсервування з метою збереження максимальної кількості функціонально активних клітин після розморожування. Вирішення цього завдання можливе тільки шляхом проведення комплексних досліджень, спрямованих на вивчення ролі факторів, що впливають на збереженість та життєздатність клітин на кожному з етапів технологічного процесу кріоконсервування.

Деякими авторами було показано, що процес кріоконсервування, як на стадіях еквілібрації з кріопротекторами, так і безпосередньо під час заморожування-відігрівання може викликати загибель клітин як шляхом некрозу, так і апоптозу. Однією з можливих причин апоптозу може бути збільшення в клітинах вільних радикалів (активних форм кисню), в результаті чого відбувається порушення енергетичного стану та пошкодження мембран клітин через перекисне окислення ліпідів. Додавання до кріозахисного середовища речовин, які мають виражені антиоксидантні та цитопротекторні властивості, дозволить, на нашу думку, уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу і таким чином покращити результати кріоконсервування та підвищити клінічну ефективність препаратів.

Мета. Проведення досліджень по вивченню порушень розподілу фосфоліпідів в мембрані та стадій апоптозу/некрозу ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові людини після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією диметилсульфоксиду (ДМСО) та антиоксиданту тролоксу.

Матеріали та методи. Використовувалася кордова кров людини, отримана з вени пуповини, після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі відповідно до вимог комісії з біоетики ІПКіК НАН України. Матеріал було заготовлено на консерванті "Глюгіцир". Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану) з молекулярною вагою 60000). Час седиментації складав від 30 до 50 хв, після цього супернатант відбирали та центрифугували протягом 5−7 хв при 1000 об/хв для отримання концентрату ЯВК.

У роботі застосовували антиоксиданти тролокс у концентраціях 5; 10; 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. Після внесення до суспензій клітин відповідних концентрацій антиоксиданту проводили обробку ядровмісних клітин кордової крові кріопротектором ДМСО. У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО, який був приготовлений на 6%-му розчині поліглюкіну, до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5; 7,5%.

Кріоконсервування проводили зі швидкістю 1-3°С в хвилину до -80°С на програмному заморожувачі Cryoson (Німеччина) з наступним зануренням до рідкого азоту. Відтавання здійснювали при 37÷40°С на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази.

Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою. Життєздатність ЯВК оцінювали за стандартним протоколом ISHAGE з використанням моноклональних антитіл CD45FITC і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) методом протокової цитофлуориметрії. Аналізували зразки за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Pro («BD»). Оцінку стадій апоптозу ядровмісних клітин проводили з одночасним внесенням до зразку маркерів Annexin V FITC, CD45PE та 7-AAD. Зразки аналізували на протоковому цитофлуориметрі «FACS Calibur».

Результати та їх обговорення. Застосування антиоксидантів під час кріоконсервування різних біооб'єктів є предметом серйозних досліджень, спрямованих на поліпшення якості клітин після розморожування. Проте застосування антиоксидантів й інгібіторів апоптозу для кріоконсервування ЯВК КК активно не вивчається. Тролокс (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) є гідрофільним аналогом α-токоферолу, найактивнішої та найпоширенішої форми токоферолів (вітаміну Е) в організмі людини. Тролокс проявляє таку ж саму антиоксидантну активність α-токоферолу, але в порівнянні з α-токоферолом, який є ліпідорозчинним, у нього відсутній фітиловий хвіст, тому він більш гідророзчинний, і цим має перевагу, оскільки може досягти як гідрофільного, так і гідрофобного компартменту клітин. Таким чином, базуючись на високій ефективності застосування тролоксу для пригнічення окисного стресу в різних клітинних системах, доцільно було використати даний антиоксидант і при кріоконсервуванні ЯВК КК з метою забезпечення елімінації активних форм кисню та підвищення показників збереженості та життєздатності клітин.

Оскільки втрата трансмембранної асиметрії фосфоліпідів, з подальшим експонуванням амінофосфоліпідів в зовнішньому моношарі, є одним із невід'ємних ознак розвитку апоптозу в клітині, вказуючи на розвиток патологічних і найчастіше незворотних станів, саме тому на першому етапі була проведена оцінка ступеня порушення асиметрії мембрани після розморожування.

Аналіз результатів, отриманих після кріоконсервування ЯВК КК у кріопротекторних розчинах, що містять ДМСО та тролокс у різних концентраціях показав, що заморожування-відігрівання призводить до зростання числа клітин з порушеним розподілом фосфатидилсерину у мембрані. При цьому відслідковуються чіткі закономірності динаміки змін

даного показника залежно від концентрації ДМСО, використаного для заморожування, і значно меншою мірою тролоксу: мінімальні показники спостерігаються в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО (близько 6-8%), і максимальні - при 7,5% (близько 9-12%). У пробах з використанням 5% ДМСО цей показник займає проміжне значення і становить 8-10%.

Виявлене збільшення кількості Annexin V позитивних клітин з ростом концентрації ДМСО та тролоксу не можна розглядати як однозначно негативне явище, оскільки в цих пробах збільшується загальна збереженість клітин (дані по збереженості клітин не наведені), тобто Annexin V позитивні клітини не руйнуються, як у випадку з 2,5% ДМСО, а залишаються в суспензії та йдуть до аналізу.

Оскільки екстерналізація фосфатидилсерину на зовнішньому моношарі мембрани свідчить про запуск апоптичних процесів в клітинах, тому на наступному етапі досліджень доцільно було провести аналіз клітин з визначенням того, на якій стадії апоптозу/некрозу знаходяться пошкоджені клітини після розморожування.

Аналіз результатів показав, що незначний відсоток клітин (1-3%) знаходиться на початковій стадії апоптозу ($AnnexinV^{+}7AAD^{-}$), що супроводжується втратою ліпідної асиметрії плазматичної мембрани та призводить до експонування фосфатидилсерину на поверхні клітини, який в нормі розташовується виключно на внутрішній стороні. Мінімальні значення даного показника спостерігалися при кріоконсервуванні клітин з 2,5% ДМСО, а максимальні з 7,5% ДМСО. Можна вказати на достовірні відмінності в пробах, кріоконсервованих з 5% ДМСО, що містять 30 або 50 мкМ тролоксу, а також 7,5% ДМСО та 30 мкМ антиоксиданту.

Кількість клітин, що знаходяться на пізній стадії апоптозу ($AnnexinV^{+}7AAD^{+}$) складає від 5 до 10 відсотків в залежності від концентрації ДМСО. Кріоконсервування досить жорстко впливає на клітини, тому деякі з них не в змозі пристосуватися до таких умов та гинуть шляхом некрозу.

Некротичні клітини при даному аналізі характеризуються як ті, що не зв’язались з Annexin V, але захопили 7AAD ($AnnexinV^{-}7AAD^{+}$). Визначення кількості цих клітин дозволяє об’єктивно визначити те, наскільки не оптимальними/не збалансованими були умови кріоконсервування, оскільки чим більше несприятливих факторів впливали на клітини, тим більш значний відсоток клітин такого типу є в суспензії. Слід зазначити, що такі клітини при руйнуванні вивільнюють у суспензію літичні фактори, які ще більше потенціюють процеси лізису інших клітин. Аналіз отриманих результатів виявив достовірну залежність між концентраційними рядами кріопротектору. Максимальна кількість (37-46%) некротичних клітин була в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО. В пробах з 5% ДМСО цей показник становив 27-33%, а мінімальні значення, що становили 17-25%, були при оптимальній загальновживаній концентрації ДМСО 7,5%. При аналізі впливу різних концентрацій тролоксу в межах однієї концентрації ДМСО було виявлено тенденцію до зниження кількості некротичних клітин в усіх групах дослідження, починаючи з проб, що містили тролокс у концентрації 10мкМ.

Можна вказати на деякі значущі відмінності в пробах, що містили 2,5% ДМСО та 30, 50, 70 або 200 мкМ тролоксу, а також 7,5% ДМСО та 50-70 мкМ антиоксиданту. Ці дані вказують на те, що тролокс, незважаючи навіть на наднизьку концентрацію ДМСО (2,5%), здатен дещо підвищувати стійкість клітин на фоні жорстких факторів кріоконсервування.

Аналіз популяції життєздатних клітини з нативною мембраною, які як не зв'язались з Annexin V, так і не пофарбувались ДНК барвником 7-AAD (AnnexinV$^-$7AAD$^-$-клітини), виявив, що максимальна кількість неушкоджених клітин спостерігається в пробах, які містили 7,5% ДМСО. Причому значущі відмінності спостерігалися в зразках, що містили тролокс в концентрації 30-70 мкМ. В цих пробах кількість AnnexinV$^-$/7AAD$^-$- клітин була на 12-16% вища у порівнянні з контролем, де використовувався тільки один кріопротектор ДМСО.

Висновки.

1. Оцінка порушень ліпідної асиметрії в ядровмісних клітинах кордової крові, кріоконсервованих в різних кріопротекторних розчинах, продемонструвала залежність стану цитоплазматичної мембрани від концентрації ДМСО: мінімальні показники екстерналізованого фосфатидилсерину на зовнішньому моношарі мембрани спостерігаються в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО, а максимальні при використанні 7,5% ДМСО. Таке збільшення кількості Annexin V$^+$-клітин з ростом концентрації ДМСО не можна розглядати як негативне явище, оскільки в цих пробах збільшується загальна збереженість клітин, тобто Annexin V$^+$-клітини не руйнуються, як у випадку з 2,5% ДМСО, а залишаються в суспензії та йдуть до аналізу.

2. Оцінка кількості ядровмісних клітин кордової крові, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в середовищах із додаванням тролоксу свідчить, що використання даного антиоксиданту в концентраціях 50-70 мкМ здатне підвищити кількість живих неушкоджених клітин (AnnexinV$^-$/7AAD$^-$) на 12-16% у порівнянні з контролем, де використовувався тільки один кріопротектор.

Ключові слова: кордова кров, ядровмісні клітини, кріоконсервування, ДМСО, антиоксиданти, тролокс, стадії апоптозу, некроз.