МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ І ЗДОРОВ'Я

VII науково-практична internet-конференція
з міжнародною участю

«МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ І ХВОРОБ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ»

14 листопада 2024 р.
ХАРКІВ – Україна

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ І ЗДОРОВ'Я

VII науково-практична internet-конференція
з міжнародною участю

«МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ І ХВОРОБ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ»

14 листопада 2024 р.
ХАРКІВ – Україна

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ: ВИКОРИСТАННЯ АНТИОКСИДАНТІВ ЯК СПОСІБ ПОЛІПШЕННЯ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТІВ

Зубов П. М., Зубова О. Л.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, Україна
pmzubov@gmail.com

Вступ. Процеси виділення ядровмісних клітин (ЯВК) із цільної кордової крові (КК), обробка кріопротекторами та процедура заморожування-відігрівання можуть негативно позначатися на їхньому структурно-функціональному стані, призводячи до некрозу з подальшим руйнуванням. Також відомо, що під час кріоконсервування загибель клітин може відбуватися через апоптоз. Однією з можливих причин апоптозу є фізико-хімічний стрес, якому піддаються клітини протягом багатостадійного процесу кріоконсервування. Інший потенційний фактор - це збільшення в клітинах активних форм кисню (АФК), що викликає порушення енергетичного стану та пошкодження мембран через перекисне окиснення ліпідів. Існує припущення, що в процесі кріоконсервування клітина отримує певні «сигнали» до загибелі, але процес запускається тільки якщо негативний вплив триває або посилюється. Вважається, що одним із подібних «сигналів» є саме АФК. Виходячи з цього, є доцільним проведення досліджень щодо визначення впливу антиоксидантів на розвиток апоптичних процесів у клітинах. Важливо відзначити, що розвиток цих процесів необхідно відстежувати не відразу після розморожування, а через деякий час, що дасть можливість об'єктивніше визначити стан клітин після трансфузії в кровоносну систему реципієнта.

Мета. Оцінка кількості ядровмісних клітин кордової крові, які перебувають на різних стадіях апоптозу або некрозу, після інкубації кріоконсервованих клітин в фізіологічних умовах *in vitro*, а також залежності цих показників від додавання антиоксиданту глутатіону до середовища заморожування.

Матеріали та методи. У роботі використовували КК людини. Виділення популяції ЯВК проводили з використанням 6% розчину поліглюкіну. До виділених клітин додавали ДМСО (кінцеві концентрації 5%, 7,5% і 10%). Глутатіон вносили перед кріоконсервуванням клітин у концентраціях 1 та 3 мМ. Проби кріоконсервували у програмному заморожувачі зі швидкістю 1 град/хв до -80°С з подальшим зануренням у рідкий азот. Відігрівання здійснювали на водяній бані при температурі 37°С. Моделювання трансфузії *in vitro* проводили шляхом перенесення ЯВК у розчин Хенкса та інкубації при 37ºС протягом години. Оцінку стадій апоптозу/некрозу ЯВК проводили на протоковому цитофлуориметрі з використанням Annexin V FITC, CD45 PE та 7-AAD.

Результати та їх обговорення. Годинна інкубація кріоконсервованих ЯВК КК у розчині Хенкса (моделювання трансфузії *in vitro*) дозволила виявити достовірне збільшення кількості некротичних клітин ($AnnexinV^{-}/7AAD^{+}$) у всіх зразках у 2 рази порівняно з даними, отриманими відразу після розморожування

(16-25% та 37-52%, відповідно). Кількість клітин, що знаходяться на початковій стадії апоптозу (AnnexinV$^+$/7AAD$^-$) та пізній стадії апоптозу/некрозу (AnnexinV$^-$/7AAD$^+$), залишалася незначною (0,8-2,5% та 3-6%, відповідно). Кількість живих клітин з неушкодженою мембраною (AnnexinV$^-$/7AAD$^-$) була достовірно нижчою, ніж відразу після розморожування. Так, після годинної інкубації клітин, кріоконсервованих під захистом 5% ДМСО, в умовах, що моделюють фізіологічні *in vitro*, було виявлено зниження цього показника на 26%, з 7,5% ДМСО – на 15% та з 10% ДМСО – на 17%.

Зважаючи на те, що кріоконсервування може призвести до дефіциту відновленого глутатіону в мітохондріях, який є єдиним доступним захистом від метаболізму перекису водню, ми припускаємо, що додавання цього антиоксиданту до середовища кріоконсервування сприятиме протидії окислювальному стресу і, таким чином, запобігатиме розвитку апоптичних та некротичних процесів у ЯВК під час кріоконсервування.

Аналіз стану проб, кріоконсервованих з додаванням глутатіону, показав, що число некротичних клітин (AnnexinV$^-$/7AAD$^+$) було значно нижчим порівняно з групами без додавання антиоксиданту. Найменша кількість некротичних клітин спостерігалася у зразках, кріоконсервованих з ДМСО у концентрації 7,5% та додаванням глутатіону у концентрації 1 або 3 мМ. У цих концентраціях глутатіон знижував кількість таких клітин з 37% до 5-9%. При цьому не було виявлено впливу на кількість клітин, що знаходилися на початковій стадії апоптозу (AnnexinV$^+$/7AAD$^-$). Визначення кількості живих клітин з неушкодженою мембраною (AnnexinV$^-$/7AAD$^-$) після моделювання фізіологічних умов *in vitro* показало, що додавання до кріозахисного середовища глутатіону сприяло збереженню більшої їх кількості у всіх експериментальних групах. Максимальний ефект спостерігався при комбінації ДМСО у концентрації 7,5% з глутатіоном в обох концентраціях (до 81% неушкоджених ЯВК). Додавання 1 або 3 мМ глутатіону до кріозахисного середовища з 5% ДМСО дозволяє зберегти до 61% живих клітин з неушкодженою мембраною, що на 5-7% перевищує показники після заморожування клітин з 7,5% і 10% ДМСО без антиоксиданту. Таким чином, використання глутатіону забезпечує таку ж кількість життєздатних та функціонально активних клітин, як і при заморожуванні за загальноприйнятими протоколами, але знижує токсичний ефект ДМСО завдяки його меншій концентрації.

Висновки. Перенесення клітин до фізіологічних умов *in vitro* призводить до вираженого зниження кількості AnnexinV$^-$/7AAD$^-$-клітин порівняно з даними, отриманими відразу після розморожування. Даний факт вимагає додаткового поглибленого аналізу для коректного розрахунку ефективної дози препарату клітин, що вводиться пацієнту. Додавання глутатіону в кріозахисні розчини здатне підвищити кількість живих неушкоджених ЯВК (AnnexinV$^-$/7AAD$^-$) після кріоконсервування та перенесення до фізіологічних умов *in vitro*. Показано високий цитопротекторний ефект глутатіону.

Ключові слова: кордова кров людини, кріоконсервування, ДМСО, антиоксиданти, апоптоз.