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

VI науково-практична internet-конференція
з міжнародною участю

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

16 листопада 2023 р.
ХАРКІВ – Україна

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

VI науково-практична internet-конференція
з міжнародною участю

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

16 листопада 2023 р.
ХАРКІВ – Україна

РОЗВИТОК ОКИСНИХ ПРОЦЕСІВ ТА МОЖЛИВІСТЬ ЇХ ІНГІБУВАННЯ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Зубов П. М., Зубова О. Л.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

pmzubov@gmail.com

Вступ. Після першого успішного використання у 1989 році кордової крові (КК) при лікуванні анемії Фанконі у дитини була розпочата нова ера в використанні гемопоетичних прогеніторних клітин. Кордова кров, разом з кістковим мозком та мобілізованою периферійною кров'ю, стала третім повноцінним джерелом клітин даного типу для клінічного використання. Завдяки простоті та безпеці заготівлі, великій кількості клітин-попередників та зниженому ризику імунологічних реакцій препарати КК показані як при гематологічних, так і широкому спектрі негематологічних захворювань, серед яких серцево-судинні патології, неврологічні розлади, поліорганні дисфункції, діабет. Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до використання КК призвела до необхідності створення кріобанків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані за температури -196ºС. Проте, процес кріоконсервування, як на стадіях еквілібрації з кріопротектором (найчастіше з 7,5-10% ДМСО), так і після заморожування-відігрівання, може викликати утворення в клітинах активних форм кисню (АФК) з подальшим розвитком апоптичних або некротичних процесів. Додавання до кріозахисного середовища речовин з антиоксидантними властивостями дозволить уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу і, таким чином, покращити результати кріоконсервування та підвищити клінічну ефективність препаратів кордової крові.

Мета. Оцінити розвиток окисних процесів та можливість їх інгібування з використанням антиоксидантів тролоксу та L-карнітину при кріоконсервуванні ядровмісних клітин кордової крові людини з 7,5% ДМСО.

Матеріали та методи. У роботі використовувалася кордова кров людини. Виділення фракції ядровмісних клітин (ЯВК) із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні. У якості кріопротектора використовували ДМСО у кінцевій концентрації у пробі 7,5%. У роботі використовували антиоксиданти L-карнітин (LC) у концентраціях 1; 5, 10; 15; 20; 50 мМ та тролокс у концентраціях 5; 10; 20; 30; 50; 70; 200 мкМ фірми «Sigma-Aldrich». Кріоконсервування зразків проводили зі швидкістю 1ºС/хв до -80ºС на програмному заморожувачі з наступним зануренням до рідкого азоту. Оцінка вмісту внутрішньоклітинних АФК в ЯВК здійснювалася методом протокової цитофлуориметрії за допомогою флуоресцентного зонду дихлородигідрофлуоресцеїн диацетату ($CD45^+DCF^+$-клітини). Оцінку стадій апоптозу ядровмісних клітин з подальшим визначенням живих клітин з непошкодженою мембраною ($AnnexinV^-7AAD^-$ клітини) проводили цитофлуориметричним методом з одночасним внесенням до зразків маркерів Annexin V FITC, CD45PE і 7-AAD. Статистичну обробку результатів проводили з використанням програмного пакета Statgraphics plus.

Результати та їх обговорення. Результати проведених експериментів із визначення впливу ДМСО та різних концентрацій антиоксидантів на кількість клітин із надлишковим вмістом АФК показали, що зразки, заморожені тільки в присутності 7,5% ДМСО, характеризувалися кількістю клітин з надмірним вмістом АФК на рівні 19-23%. При внесенні в середовище кріоконсервування тролоксу спостерігалося достовірне зменшення $CD45^{+}DCF^{+}$-клітин вже при вмісті антиоксиданту на рівні 20 мкМ. Максимальне зниження на 40% спостерігалося в пробах, що містили тролокс в концентраціях 50-70 мкМ. Внесення в середовище кріоконсервування LC забезпечувало зниження кількості DCF^{+}-клітин в деконсервованих клітинах в середньому на 15-24%. Оптимальними виявились концентрації LC 15-20 мМ.

Одним з об'єктивних критеріїв ефективності методу кріоконсервування є визначення кількості живих клітин з неушкодженою мембраною ($AnnexinV^{-}$ $7AAD^{-}$). Використання методу протокової цитофлуориметрії з використанням вітального ДНК барвника 7-AAD, який зв'язується тільки з деспіралізованою молекулою ДНК, дозволяє, як показали додаткові тести (у тому числі культуральні), ідентифікувати саме живі клітини. Annexin V, який фіксує наявність екстерналізованого на зовнішньому моношарі мембрани фосфатидилсерину, дозволяє виявити клітини на першій стадії апоптозу, які при потраплянні в кровоносне русло будуть додатково елімінуватися макрофагами, оскільки втрата трансмембранної асиметрії фосфоліпідів є однією з невід'ємних ознак розвитку апоптозу в клітині та тригером для їх поглинання. При аналізі виходу отриманих після кріоконсервування з 7,5% ДМСО життєздатних клітин з неушкодженою мембраною було показано, що в контролі вихід таких клітин складав близько 54% у порівнянні з пробами до кріоконсервування, а при додаванні 50 або 70 мкМ тролоксу даний параметр складав до 72%, що вказує на досить високу ефективність антиоксиданту. Визначення виходу живих неушкоджених клітин після розморожування з різними концентраціями ДМСО та LC було виявлено більше збереження таких клітин в усіх експериментальних групах, що містили антиоксидант, починаючи з самої низької концентрації 1 мМ. Значущі відмінності спостерігалися в пробах, що містили у складі кріопротекторного розчину 7,5% ДМСО та 15-20 мМ LC. В цих пробах зберігалося на 14% більше живих клітин у порівнянні з контрольними зразками, які не містили антиоксидант.

Висновки. Показано, що обробка ядровмісних клітин кордової крові людини розчинами, що містять ДМСО, та подальше їх кріоконсервування призводить до накопичення в клітинах активних форм кисню та розвитку окисних процесів, які можуть спричиняти зниження збереженості та життєздатності клітин. Додавання на етапі еквілібрації в кріозахисне ДМСО-вмісне середовище таких антиоксидантів, як тролокс у концентраціях 50 та 70 мкМ або L-карнітин у концентраціях 15 та 20 мМ, сприяє зниженню кількості клітин із надлишковим вмістом АФК та підвищенню кількості живих клітин з неушкодженою мембраною.

Ключові слова: кордова кров людини, ядровмісні клітини, L-карнітин, тролокс, кріоконсервування, ДМСО.