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

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

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

18 травня 2023 р.
ХАРКІВ – Україна

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

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

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

18 травня 2023 р.
ХАРКІВ – Україна

НАКОПИЧЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИНАХ КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ЯК ІНТЕГРАЛЬНИЙ ПОКАЗНИК ЇХ СТАНУ

Чабаненко О. О., Зубова О. Л., Зубов П. М.
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна
pmzubov@gmail.com

Вступ. Використання клітин кордової крові людини в медичній практиці наразі набуло значного поширення, що викликає необхідність розширення мережі низькотемпературних банків клітинних препаратів кордової крові. У зв'язку з цим розробка нових та вдосконалення існуючих методів довгострокового зберігання кордової крові є актуальною проблемою. Відомо, що під впливом температурно-осмотичних факторів, які діють на клітини під час кріоконсервування, відбувається порушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги. Таким чином, можна припустити, що в процесі проведення різних маніпуляцій з клітинною суспензією при кріоконсервуванні може виникати оксидативний стрес, який характеризується надлишковим накопиченням у клітинах активних форм кисню (АФК), що призводить до пошкодження макромолекулярних структур у клітинах і, як наслідок, до зниження їх життєздатності. Для запобігання накопиченню АФК у клітинах перспективним напрямком може бути додавання в кріозахисне середовище антиоксидантів, одним з яких є водорозчинний аналог вітаміна Е – тролокс.

Мета. Визначити кількість ядровмісних клітин кордової крові людини (ЯВК КК) з надмірним вмістом активних форм кисню та їх життєздатність після кріоконсервування у розчинах з різною концентрацією ДМСО та тролоксу.

Матеріали та методи. У роботі використовували кордову кров людини. Фракцію ЯВК КК виділяли шляхом седиментації в поліглюкіні. Тролокс у суспензії клітин вносили у концентраціях 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. Для кріоконсервування ЯВК КК використовували проникний кріопротектор ДМСО. Обробку клітин ДМСО проводили до кінцевих концентрацій 2,5; 5 та 7,5%. Зразки кріоконсервували з використанням програмного заморожувача зі швидкістю 1-3 град/хв до -80°С з наступним зануренням у рідкий азот. Життєздатність $CD45^+$-клітин оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом методом протокової цитофлуориметрії. Кількість клітин з надмірною кількістю АФК визначали цитометричним методом з використанням флуоресцентного барвника дихлорфлуоресцеїн діацетату ($DCFH_2$-DA), який після відщеплення внутрішньоклітинною формою естерази діацильної групи втрачає здатність вільно залишати клітину, а утворений нефлуоресцентний $DCFH_2$, за наявності АФК, переходить у високофлуоресцентну форму DCF, флуоресценція якого прямо пропорційно залежить від кількості внутрішньоклітинних АФК. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення CELLQuest Pro (BD, США).

Результати та їх обговорення. Результати проведених експериментів із впливу різних концентрацій ДМСО та тролоксу на кількість клітин із надлишковим вмістом АФК показали, що проби, кріоконсервовані з 2,5%

ДМСО, характеризувалися найнижчим відсотком таких клітин (7,5-12%), що може бути наслідком наднизької концентрації кріопротектора, в результаті чого значна частина дестабілізованих клітин руйнується та не йде до аналізу. При цьому слід зауважити, що збережені клітини активно реагують на внесення тролоксу. Так, починаючи з концентрації 10 мкМ антиоксиданту спостерігається значуще зниження кількості клітин з надлишковим вмістом АФК: мінімальне їх число спостерігається в пробах, що містять 50 мкМ тролоксу (зниження складає 38,5% у порівнянні з контрольними значеннями).

Проби, що містять у складі кріопротекторного розчину 5% ДМСО, характеризувалися найбільшим відсотком клітин з надлишковим вмістом АФК (в контрольних пробах до 32%, в пробах, що містять тролокс – 17-27%). Таку значну кількість клітин з АФК можна пояснити підвищенням кріопротекторного ефекту ДМСО і, як наслідок, збереженням більшої кількості клітин. Оцінка впливу антиоксиданту при такій концентрації кріопротектора показала, що внесення тролоксу, починаючи з концентрації 10 мкМ, призводить до значущого зниження DCF^{+}-клітин. При цьому мінімальна кількість АФК спостерігалася в пробах, що містять 70 мкМ тролоксу (зниження складає до 44% у порівнянні з контрольними значеннями). Контрольні проби, що містили 7,5% ДМСО, характеризувалися кількістю клітин з надмірним вмістом АФК на рівні 21,3±2,1%. При внесенні в середовище кріоконсервування тролоксу зазначені вище тенденції зберігалися: достовірне зниження кількості АФК в клітинах фіксувалося вже при вмісті тролоксу 20 мкМ. Максимальне зниження на 40% спостерігалося в пробах, що містили тролокс в концентраціях 50-70 мкМ.

Аналіз життєздатності ЯВК КК після кріоконсервування показав, що даний показник значним чином залежить від концентрації ДМСО, та корелює з накопиченням АФК в клітинах. Так, в контрольних пробах, заморожених з 2,5% ДМСО, життєздатність клітин складала близько 50%, у той час як з підвищенням концентрації кріопротектора до 7,5% цей показник становив близько 70%. Життєздатність клітин, заморожених з 5% ДМСО, складала 60-63%. Внесення тролоксу в зразки з 2,5% ДМСО призводило до збільшення виживання клітин після розмороження в усіх експериментальних групах. Спостерігалося значуще підвищення життєздатності клітин на 12-15% в пробах, що містили 70-200 мкМ тролоксу. Також можна зазначити значущі зміни на 10% в пробах, заморожених в кріопротекторних розчинах, що містили 5% ДМСО та тролокс в концентраціях 50-70 мкМ. Як вже зазначалося вище, максимальна життєздатність була при кріоконсервуванні ЯВК КК з 7,5% ДМСО. Заморожування в кріопротекторних сумішах, що містили 7,5% ДМСО та тролокс в концентраціях 20-200 мкМ призводило до збільшення кількості життєздатних ЯВК на 8-10%.

Висновки. В залежності від складу кріоконсерванта спостерігаються значущі зміни в кількості клітин з надмірним вмістом АФК. Мінімальна кількість АФК та максимальна життєздатність спостерігалася при кріоконсервуванні в розчинах, що містили 50-70 мкМ тролоксу та 7,5% ДМСО.

Ключові слова: кордова кров людини, кріоконсервування, ДМСО, тролокс, активні форми кисню.