Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ, ОНКОГЕМАТОЛОГИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

3-4 октября 2017 года

Киров – 2017

Овсепян В. А., Сарпова М. В., Зотина Е. Н., Минаева Н. В., Загоскина Т. П. **Прогностическое значение содержания клеток с изолированной интерстициальной делецией 13q14 при хроническом лимфолейкозе** 188

Сёмочкин С. В., Желнова Е. И., Юрова Е. В., Гаглоева Д. Э., Архипова Н. В., Толстых Т. Н., Мисюрина Е. Н. **Эффективность лечения впервые диагностированной множественной миеломы, осложненной диализ-зависимой почечной недостаточностью** 193

Сергеева Л. Г., Целоусова О. М., Васкина Е. А., Татаурова И. П. **Заболеваемость острыми лейкозами детского населения Кировской области за период 2002-2016 гг.** 197

Федоровская Н. С., Росин В. А., Дьяконов Д. А., Минаева Н. В., Лагунова О. Р., Самарина С. В., Целоусова О. М., Парамонов И. В. **Анализ структуры и частоты встречаемости неходжкинских лимфом в Кировской области** 206

Чеботкевич В. Н., Бессмельцев С. С., Киселева Е. Е., Кайтанджан Е. И., Стижак Н. П., Бурылев В. В. **Клинические и этиологические особенности вирусно-бактериальных инфекционных осложнений у больных гемобластозами** 211

Черепанова В. В, Курыщева М. А. **Острые порфирии** 216

Вопросы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Коряковцева Т. А. **Анализ посттрансплантационного химеризма на основании исследования антигенов эритроцитов** 224

Бутина Е. В., Зайцева Г. А., Зорина Н. А., Минаева Н. В., Хоробрых М. Н., Киселева А. Н. **Определение посттрансплантационного химеризма при анализе генов F2, F5, F7, F13, FGB, ITGA2, ITGB3, PAI-1, MTHFR: 677, MTHFR: 1298, MTR, MTRR** 229

Исаева Н. В., Утемов С. В., Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Костяев А. А., Шерстнев Ф. С. **Результаты оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконцентратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки** 234

Логинова М. А., Парамонов И. В., Рылов А. В. **Новый аллель локуса HLA-C, HLA-C*06:02:48, выявленный у бурят** 241

Минаева Н. В., Ветошкин К. А., Исаева Н. В., Утемов С. В. **Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки: свойства, источники получения и перспективы применения в трансплантологии** 245

Хоробрых М. Н., Минаева Н. В., Зорина Н. А., Лучинин А. С., Лагунова О. Р., Докшина И. А., Исаева Н. В., Утемов С. В., Ветошкин К. А., Парамонов И. В. **Эффективность режима кондиционирования высокими дозами мелфалана с бортезомибом при аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с множественной миеломой** 252

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

СОХРАННОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ В РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДМСО И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М., Бабийчук Л. А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
(Харьков, Холодногорский район, Переяславская улица, 23)

PRESERVATION AND VIABILITY OF CORD BLOOD NYCLEATED CELLS CRYOPRESERVED IN SOLUTIONS CONTAINING VARYING CONCENTRATIONS OF DMSO AND ASCORBIC ACID

Makashova O. Ye., Zubova O. L., Zubov P. M., Babijchuk L. O.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
(Kharkov, Holodnogorsko district, Pereyaslavskaya street, 23)
E-mail: Olena.makashova@gmail.com, pmzubov@gmail.com

Проведенные в работе исследования по определению числа клеток с избыточным содержанием АФК, а также их сохранности и жизнеспособности после криоконсервирования с различными концентрациями ДМСО показали, что добавление в криозащитную среду аскорбиновой кислоты в концентрациях 100 и 150 мкМ способно снизить уровень активных форм кислорода в клетках и тем самым обеспечить повышение количества клеток в препарате кордовой крови с сохранением их жизнеспособности.

Ключевые слова: *кордовая кровь человека, ядросодержащие клетки, криоконсервирование, диметилсульфоксид, активные формы кислорода, антиоксиданты, аскорбиновая кислота*

The studies carried out to determine the number of cells with excess ROS content, as well as their preservation and viability after cryopreservation with various concentrations of DMSO, showed that the addition of ascorbic acid in concentrations of 100 and 150 μM to the cryoprotective medium can reduce the level of active oxygen species in cells and thereby provide an increase in the number of cells in the cord blood preparation while maintaining their viability.

Keywords: *human cord blood, nucleated cells, cryopreservation, dimethylsulfoxide, reactive oxygen species, antioxidants, ascorbic acid*

В научной медицинской литературе появляется все больше публикаций, указывающих на повышение частоты использования кордовой крови (КК) для лечения различных заболеваний [1]. Причем в клинических целях могут использоваться как отдельные ее компоненты (эритроциты, стволовые гемопоэтические клетки, плазма), так и цельная КК. Повышенное внимание со стороны ученых и врачей к использованию КК привела к необходимости разработки эффективных технологий криоконсервирования и создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре -196^{0}С в течение практически неограниченного времени без потери биологических свойств [2]. В наших предыдущих исследованиях [3] было установлено, что криоконсервирование ядросодержащих клеток

(ЯСК) КК под защитой различных концентраций ДМСО приводит к увеличению количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК), что отрицательно влияет на количественные и качественные характеристики клеток в препарате. Исходя из этого целесообразно было провести исследования по определению влияния различных концентраций веществ, которые обладают выраженными антиоксидантными и цитопротекторными свойства [4]. Мы считаем, что это позволит избежать или замедлить развитие оксидативного стресса и улучшить результаты криоконсервирования. Одним из таких потенциальных веществ является аскорбиновая кислота или витамин С. Некоторые исследователи относят его к представителям «первой линии обороны» от «агрессивных» реактивных соединений, обладающих высокой окислительной активностью [5; 12]. В связи с этим добавление в криозащитную среду аскорбиновой кислоты (АК) может способствовать снижению количества ЯСК с избыточным содержанием АФК, повышению уровня их сохранности и жизнеспособности после криоконсервирования – как следствие клинической эффективности препаратов. В связи с этим целью работы была оценка сохранности, жизнеспособности и количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода в ядросодержащих клетках кордовой крови при криоконсервировании в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты.

Для этого выделенную декстраном с молекулярной массой 60 кДа фракцию ЯСК КК обрабатывали 25% раствором ДМСО до конечных концентраций в пробе 5; 7,5 и 10%. В криозащитные среды также вносили аскорбиновую кислоту в концентрациях 0,05; 0,1; 0,15 и 0,2 мМ. Криоконсервирование проводили со скоростью 1-3^{0}С в минуту до -80^{0}С с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе Cryoson. Отогрев осуществляли при 37÷40^{0}С на водяной бане при постоянном покачивании до исчезновения твердой фазы. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере Горяева согласно стандартной методике [6]. Жизнеспособность ЯСК оценивали по стандартному ISHAGE протоколу с использованием моноклонального антитела (CD45FITC) и ДНК-красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD) методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur [7]. Оценку содержания внутриклеточных активных форм кислорода в ЯСК осуществляли с помощью флуоресцентного зонда дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH2DA («Sigma-Aldrich», США) [8]. Статистическую обработку результатов проводили методом Стьюдента-Фишера с использованием программы «Excel» («Microsoft Office», США). Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Как отмечалось ранее, добавление ДМСО и, особенно, замораживание-отогрев может вызвать повышение уровня АФК, что инициирует апоптоз и в дальнейшем приводит к гибели клеток. В связи с этим нами

было изучено количество клеток с избыточным содержанием АФК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и АК. Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что даже минимальная концентрация антиоксиданта (0,05 мМ) обеспечивает достоверное снижение количества клеток с избыточным содержанием АФК в пробах, консервированных с 10% ДМСО, по сравнению с контрольными значениями, в остальных случаях можно говорить лишь о некоторой тенденции к снижению.

Таблица 1.

Количество ЯСК КК с избыточным содержанием АФК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты

Конц. ДМСО, %	Контр.	Конц. аскорбиновой кислоты (мМ)			
		0,05	0,1	0,15	0,2
5	29,5±4,7	26,1±1,5	21,2±2,0*	19,7±2,7*	25,1±3,8
7,5	20,6±3,2	20,1±2,1	16,9±2,3	17,5±1,4	24,3±2,8
10	21,2±1,9	16,3±1,0*	18,7±1,3	17,9±2,1	25,2±2,1

Примечание. Данные представлены в процентах в виде M ± SE.
**** - значимо по отношению к контролю, с уровнем p <0,05.***

В свою очередь применение концентраций АК 0,1 и 0,15 мМ обеспечивает достоверное снижение данного показателя в группе, обработанной ДМСО в концентрации 5%, в других группах можно говорить о тенденции к снижению. Эти данные указывают на антиоксидантное действие АК в данных клетках, которое, по-видимому, реализуется путем инактивации свободных радикалов с образованием семидегидроаскорбата (неактивной формы), т.е. АК перехватывает АФК и восстанавливает их [9; 10], не позволяя вызывать связанные с увеличением их уровня повреждения клеток.

Добавление аскорбиновой кислоты в концентрации 0,2 мМ вызывало увеличение количества клеток с избыточным содержанием АФК, что свидетельствует о прооксидантном действии этого вещества в высоких концентрациях. Это может быть связано с тем, что АК представлена в жидкости в виде АК и аскорбинового радикала А, который, если накапливается чрезмерно, может индуцировать образование свободных радикалов. Поэтому, повышенные концентрации АК могут приводить к накоплению промежуточного продукта - аскорбинового радикала А и индуцировать оксидативный стресс [11].

На следующем этапе нами было проанализировано влияние избыточного содержания АФК на показатели сохранности и жизнеспособности ЯСК КК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и АК.

Ранее нами было показано, что процесс криоконсервирования вызывает выраженное снижение исследуемых параметров [13]. Как видно из

табл. 2, добавление к суспензии клеток АК в минимальной концентрации (0,05 мМ) было эффективным только в пробах, криоконсервированных с ДМСО в концентрации 5%, о чем свидетельствует достоверное увеличение количества сохраненных клеток в пробах практически на 10%, по сравнению с контролем, криоконсервированным без добавления АК. При этом добавление аскорбиновой кислоты в средних концентрациях 0,1 и 0,15 мМ позволило сохранить большее количество клеток во всех экспериментальных группах, что напрямую может быть связано с антиоксидантным эффектом данного соединения.

Таблица 2.

Сохранность (А) и жизнеспособность (Б) ЯСК КК после криоконсервирования в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты

Конц. ДМСО, %		Контр.	Конц. аскорбиновой кислоты (мМ)			
			0,05	0,1	0,15	0,2
5	А	63,2±2,7	74,6±2,7*	76,6±1,4*	75,4±3,7*	67,5±2,9
	Б	75,2±3,9	75,8±3,1	78,5±2,1	79,3±3,6	65,8±4,1*
7,5	А	72,1±3,2	77,7±6,7	84,5±4,3*	86,4±5,1*	79,1±6,9
	Б	78,5±4,2	80,9±3,8	82,8±4,5	84,2±4,7	78,1±3,4
10	А	73,4±2,1	77,6±4,7	82,4±*3,4	83,2±2,7*	76,0±7,1
	Б	76,9±3,1	72,5±4,1	73,8±4,2	72,8±4,1	62,7±3,2*

Примечание. Данные представлены в процентах в виде M±SE.
**** - значимо по отношению к контролю, с уровнем p<0,05.***

Анализ жизнеспособности клеток (табл. 2), криоконсервированных с добавлением АК в малых и средних концентрациях (0,05; 0,15 мМ) продемонстрировал отсутствие достоверных отличий от аналогичных показателей без использования антиоксиданта. Применение же высокой концентрации аскорбиновой кислоты (0,2 мМ) приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток в суспензии по отношению к контрольным значениям, не изменяя их сохранность. Эти результаты подтверждают тот факт, что при использовании высоких концентраций аскорбиновой кислоты, она перестает выступать в роли антиоксиданта и начинает оказывать прооксидантный эффект, вызывая снижение уровня жизнеспособности клеток. Следует отметить, что в пробах криоконсервированных в 7,5% растворе ДМСО с добавлением 0,1 и 0,15 мМ раствора АК наблюдались максимальные показатели сохранности и жизнеспособности.

Таким образом, криоконсервирование ЯСК КК в растворах, содержащих аскорбиновую кислоту, является перспективным направлением для разработки протоколов криоконсервирования, однако следует учитывать, что данное соединение может иметь и прооксидантный эффект. Комплексный анализ полученных результатов позволил установить, что в пробах замороженных в растворе с концентрацией ДМСО 7,5% с добавлением 0,1 и 0,15 мМ раствора АК наблюдались максимальные показатели сохранности и жизнеспособности ЯСК КК. Эти данные подтверждают антиоксидантное

действие АК в данных клетках, что в конечном итоге выражается в улучшении качества консервированных препаратов и может быть предпосылкой для разработки криопротекторных сред с более низким содержанием ДМСО.

Список литературы

1. Gluckman, E. History of cord blood transplantation [Tekst] // Bone marrow transplantation.– 2009.– Vol. 44, №10.– P. 621–626.

2. Rubinstein, P. Cord blood banking for clinical transplantation [Tekst] // Bone Marrow Transplantation.– 2009.– Vol. 44, №10.– P. 635-642.

3. Mykhailova, O.Y. Cryopreservation and redox state of cord blood nucleated cells [Oral report] / O.Y. Mykhailova, O.Y. Makashova, P.M. Zubov, O.L. Zubova, L.A. Babijchuk.– SLTB 2016.– Dresden.

4. Журавлев, А.И. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология [Текст] / А.И. Журавлев, С.М. Зубкова.– М.: МИКО-ПРИНТ, 2008.– 269 с.

5. Arrigoni, O. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant [Tekst] / O. Arrigoni, M.C. De Tullio // Biochim Biophys Acta.– 2002.– Vol. 1569, №1-3.– P. 1-9.

6. Davis, J.M. Basic Cell CultureA Practical Approach [Tekst] // Oxford University Press, 2002.– 382 p.

7. Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry [Tekst] / I. Schmid, W.J. Krall, C.H. Uittenbogaart // Cytometry.– 1992.– Vol. 13.– P. 204-208.

8. Chen, X. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy [Tekst] / X. Chen, H. Z Zhong, Z. Xu [et al.] // Free Radical Research.- 2010.- Vol. 44, № 6.- P. 587-604.

9. Blokhina, O.I. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [Tekst] / O. I. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // Ann. Bot.– 2003.– Vol. 91.– P. 179-194.

10. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV–infected patients [Tekst] / P. Jaruga, B. Jaruga, D. Gackowski [et al.] // Free Radic. Biol. Med.– 2002.– Vol. 32, № 5.– P. 414-420.

11. Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes [Tekst] / A. García-Krauss , L. Ferrada, A. Astuya [at al.] // Mol Neurobiol.– 2016.– P. 5847-5863.

12. Effect of vitamins C and E on antioxidant status of breast–cancer patients undergoing chemotherapy [Tekst] / N. Suhail, N. Bilal, H.Y. Khan [et al.] // J. Clin. Pharm. Ther.– 2012.– Vol. 37, №1. – P. 22-26.

13. Oxidative processes: Structural state of cord blood nucleated cells upon cryopreservation [Tekst] / O.Y. Mykhailova, O.Y. Makashova, P.M. Zubov [at al.] // X Parnas Conference Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine».– Poland. – 2016. – P. 8.