Л. А. Бабийчук, Е. Е. Макашова, О. Л. Зубова, П. М. Зубов



Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина для повышения сохранности и жизнеспособности ядросодержащих клеток кордовой крови, криоконсервированных с ДМСО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В настоящее время трансплантация гемопоэтических клеток предшественников (ГКП) кордовой крови (КК) признана стандартной практикой лечения более 80 серьезных заболеваний. С увеличением частоты клинического использования КК возникла необходимость накопления большого количества доз. Решение этой задачи возможно только при условии долгосрочного хранения клеток в замороженном состоянии. Следует отметить, что методы криоконсервирования ядросодержащих клеток (ЯСК) КК, в том числе и ГКП, были разработаны эмпирически и базировались на технологиях, применяемых для костного мозга с использованием проникающего криопротектора ДМСО в конечных концентрациях 5-10%. Однако криоконсервирование по этим протоколам может приводить к гибели до 50% популяции клеток, а учитывая ограниченный объем КК при заготовке, такие потери неприемлемы и могут привести к «несостоятельности» трансплантата. Такие значительные потери в процессе замораживания-отогрева могут быть связаны с развитием метаболических нарушений, являющихся следствием накопления в клетках высоких концентраций активных форм кислорода (АФК). Одним из путей предотвращения накопления большого количества АФК может быть внесение в криозащитную среду антиоксидантов, одним из которых является N-ацетил-L-цистеин (АЦ).

Исходя из выше сказанного, целью работы была оценка влияния N-ацетил-L-цистеина на содержание АФК, сохранность и

жизнеспособность ядросодержащих клеток кордовой крови после криоконсервирования в криозащитных средах с разными концентрациями ДМСО.

Материалы и методы

В работе использовали КК человека, полученную после нормальных родов. Фракцию ЯСК КК выделяли методом седиментации с использованием 6% раствора полиглюкина с м. м. 60000. Выделенные клетки обрабатывали 25% раствором ДМСО до конечных концентраций в пробе 5%, 7,5% и 10%, соответственно. Образцы криоконсервировали в программном замораживателе «Cryoson» (Германия) со скоростью 1-3 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот (–196°). Отогрев осуществляли при 37-40°С на водяной бане при постоянном покачивании до исчезновения твердой фазы. В работе использовали антиоксидант N-ацетил-L-цистеин («Sigma») в концентрациях 5; 10; 15 и 30 ммоль/л. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере Горяева согласно стандартной методике. Жизнеспособность $CD45^+$-клеток оценивали по стандартному ISHAGE протоколу с использованием моноклонального антитела CD45FITC и ДНК красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD). Результаты измерений оценивали с помощью программного обеспечения CELLQuest Pro («BD», США). Количество клеток с избыточным содержанием АФК определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur («BD», США) по накоплению в них 2',7'-дихлорофлуресцеина (DCF).

Результаты и обсуждение

Для криоконсервирования ЯСК КК использовали криозащитные растворы, содержащие ДМСО в конечных концентрациях 5; 7,5 и 10%. Было показано, что самые высокие показатели сохранности и жизнеспособности при замораживании суспензии клеток с 7,5% раствором ДМСО (78,0±4,1; 78,5±4,2 соответственно).

Проведенные нами исследования по определению числа ЯСК КК с избыточным содержанием АФК до и после криоконсервирования показали, что при добавлении ДМСО смещается прооксидантно-антиоксидантное равновесие в клетках с развитием стресс-реакции в виде образования избыточного количества АФК, причем этот процесс напрямую зависит от концентрации ДМСО. Вследствие замораживания-отогрева наблюдается более выраженное увеличение содержания АФК в ЯСК КК по сравнению с данными, полученными до криоконсервирования. Максимальное количество клеток с избыточным содержанием

АФК наблюдалось при криоконсервировании с ДМСО в концентрации 5% (29,5±2,7). Данные, полученные при замораживании с 7,5 и 10% ДМСО, значимо не отличались (20,6±2,1; 21,2±1,7 соответственно).

Исходя из того, что при криоконсервировании ЯСК КК с ДМСО увеличивается содержание АФК, целесообразно было внести в криозащитную среду антиоксидант. В связи с этим на следующем этапе была проведена серия экспериментов по определению оптимальной концентрации АЦ. Мы использовали АЦ в концентрациях 5; 10; 15 и 30 мМ. Установлено, что АЦ, добавленный в среду криоконсервирования, способствует снижению внутриклеточного содержания АФК в криоконсервированных клетках по сравнению с данными без добавления антиоксиданта. Следует отметить, что концентрация АЦ 5 мМ при добавлении к суспензии клеток с разными концентрациями ДМСО была наименее эффективной при криоконсервировании ЯСК КК, возможно из-за низкой концентрации. При этом АЦ в концентрации 30 мМ, независимо от концентрации криопротектора, проявлял меньшую эффективность относительно снижения внутриклеточного содержания АФК по сравнению с растворами АЦ 10 и 15мМ. Это может быть связано с нарушением равновесия между окисленной и восстановленной формами, в результате чего снижается антиоксидантная активность восстановленного глутатиона, что способствует генерации АФК в клетках. Наименьшее количество ЯСК КК с избыточным содержанием АФК было при криоконсервировании в криозащитном растворе, содержащем 10 или 15 мМ АЦ в сочетании с 7,5% или 10% раствором ДМСО (не более 9% клеток). Таким образом, можно указать на активацию АЦ антиоксидантных процессов в клетках, что способствовало предотвращению развития окислительного стресса и снижению уровня АФК в клетках.

Известно, что процесс криоконсервирования приводит к потере клеток и нарушению их структурно-функционального состояния, вызывающего снижение жизнеспособности. Поэтому была проведена серия экспериментов по оценке зависимости этих параметров от концентрации АЦ и ДМСО в среде криоконсервирования (табл).

Полученные нами данные по определению сохранности и жизнеспособности ЯСК КК показали наилучшие показатели после криоконсервирования при использовании комбинации 7,5% раствора ДМСО и 10-15 мМ АЦ.

Таблица – Сохранность (А) и жизнеспособность (Б) ЯСК КК после замораживания-отогрева в зависимости от концентрации ДМСО и N-ацетил-L-цистеина (M ± SE)

		5мМ	10мМ	15мМ	30мМ
5% ДМСО	А	68,2±4,1	72,3±2,8	71±3,9	68,8±6,9
	Б	65,8±3,4	72,5±3,7	72,8±3,5	70,1±3,1
7,5% ДМСО	А	78,8±6,2	83,9±4,3	84,6±6,8	79,7±5,8
	Б	73,8±3,6	80,1±3,9	80,5±3,9	73,2±3,6
10% ДМСО	А	77,7±3,7	84,6±5,9	83,8±5,4	83,5±7,1
	Б	73,1±2,7	77,8±2,9	78,1±3,9	77,9±3,4

Выводы

1. Полученные данные по определению числа ЯСК КК с избыточным содержанием АФК при разных концентрациях ДМСО показали, что замораживание-отогрев приводит к увеличению данного показателя, что может указывать как на развитие окислительного стресса, так и на ингибирование антиоксидантной системы.

2. Внесение в криозащитную среду антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина в концентрации 10-15 мМ способствует значимому снижению уровня АФК вследствие активации антиоксидантной системы и, как следствие, увеличению показателей сохранности и жизнеспособности ЯСК КК после криоконсервирования.