

КРІОЧУТЛИВІСТЬ ГЕМОПОЕТИЧНОЇ ТКАНИНИ ПУПОВИННОЇ КРОВІ

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», м. Київ

Вступ. Втрата клітин при проведенні кріоконсервування відбувається за рахунок апоптозу й некрозу.

Мета. Дослідити показники кріочутливості гемопоетичної тканини пуповинної крові (ПК) за рівнем апоптозу ядровмісних клітин (ЯВК).

Методи. Кріоконсервування ЯВК ПК здійснювали під захистом 5 і 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО). Оцінку стану клітин проводили методами проточної цитофлуориметрії з використанням подвійного фарбування аннексином V (Ann V) й пропідіум йодидом (Pi), а також спектрофотометричного дослідження перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Результати. Показано, що після експозиції з 5 % ДМСО зростають популяції як Ann V+/Pi+ -ЯВК (до $2,2 \pm 0,3$ %) ($p < 0,001$), так і клітин з пошкодженими мембранами (до $1,1 \pm 0,5$ %, $p < 0,02$). Застосування 10 % ДМСО призводить до збільшення клітин, що перебувають на ранній стадії апоптозу (до $16,1 \pm 1,8$ %, $p < 0,05$). У розморожених зразках, порівняно з нативними, виявлено прогнозоване зростання ($p < 0,01$) відсотків Ann V-/Pi+ та Ann V+/Pi+ клітин. Встановлено тісні кореляційні зв'язки показників активності процесів ліпопероксидації зі станом клітин.

Висновки. Наявність тісної кореляції між показниками апоптозу та ПОЛ на етапах кріоконсервування підтверджують зв'язок структурно-функціональних порушень у мембранах клітин з їх кріочутливістю. Резервом для покращення характеристик розмороженого зразка є клітини, що знаходяться на ранніх стадіях апоптозу.

Ключові слова: кріоконсервування, пуповинна кров, апоптоз, перекисне окислення ліпідів.

Вступ. Сьогодні зразки ядровмісних клітин (ЯВК) кріоконсервованої пуповинної крові широко застосовують як гемопоетичну тканину при аlogenних неродинних трансплантаціях [1], успіх яких напряму пов'язаний з ефективністю збереження донорського матеріалу в умовах наднизької температури рідкого азоту. Сучасний рівень наукових знань дозволяє стверджувати, що втрата клітин при проведенні кріоконсервування відбувається за участю різних типів клітинної смерті – апоптозу й некрозу [2].

Мета – дослідити показники кріочутливості гемопоетичної тканини пуповинної крові (ГТПК) за рівнем апоптозу ЯВК.

Матеріали і методи. Досліджували рівень апоптозу у суспензії ЯВК ГТПК на етапах технологічного процесу кріоконсервування під захистом кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) у двох кінцевих концентраціях (5 і 10 %). Зразки пуповинної крові отримували за інформованою згодою методом забору у «замкненій» системі мішків для заготівлі крові зі стабілізуючим розчином CPDA-1. Зразки зберігали при температурі $(21,5 \pm 3,5) ^\circ\text{C}$ протягом 1 доби після пологів. Заморожування ЯВК виконували за програмою повільного охолодження з наступним зануренням в рідкий азот.

Оцінку стадій апоптозу проводили у нативному матеріалі (контрольна група), що зберігали протягом однієї доби після пологів, після 15 хв. експозиції з кріопротектором, а також у розморожених аліквотах методом проточної

цитофлуориметрії. Використовували подвійне фарбування вітальним ДНК-барвником – пропідіум йодидом (Pi) та кальційзалежним фосфоліпідзв'язуючим білком – аннексином V (Ann V). Фарбування клітин здійснювали за протоколом фірми BD [3]. Результати аналізували не пізніше ніж за 1 годину.

Активність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) вимірювали спектрофотометричним методом І.В. Волчегорського у нашій модифікації [4] за показниками ізольованих подвійних зв'язків (ІПЗ), дієнових, триєнових, оксодієнових кон'югатів (ДК, ТК, ОДК відповідно) та шифових основ (ШО). Статистичну обробку та кореляційний аналіз здійснювали з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Виявлення клітин, що перебувають на різних стадіях апоптозу з використанням подвійного забарвлення Ann V та Pi ґрунтується: по-перше – на високій спорідненості Ann V до фосфатидилсерину, що в нормі локалізується виключно з цитозольної сторони ліпідного бішару. Його переміщення на зовнішній бік клітинної мембрани є індикатором апоптозу [3, 5]. По-друге – на здатності ДНК-барвника Pi до потрапляння виключно у мертві клітини. При цьому Ann V-/Pi--клітини є живими; Ann V+/Pi- – вважаються такими, що перебувають у ранніх стадіях апоптозу, Ann V+/Pi+ – є некротичними або такими, що перебувають на пізніх етапах апоптозу, а Ann V-/Pi+-клітини мають пошкодження мембрани, які унеможливають зв'язування з Ann V.

Встановлено, що у контрольній групі популяція Ann V-/Pi- ЯВК складала $(93,6 \pm 1,8) \%$, Ann V+/Pi- – $(5,8 \pm 1,8) \%$, Ann V-/Pi+ – $(0,4 \pm 0,1) \%$ та Ann V+/Pi+ – $(0,2 \pm 0,1) \%$. Після експозиції зразків ПК з ДМСО в кінцевій концентрації 5 % достовірно зростав, порівняно з контролем, вміст клітин з пошкодженими мембранами (Ann V-/Pi+) до $(1,1 \pm 0,5) \%$, $p < 0,02$ та до $(2,2 \pm 0,3) \%$, $p < 0,001$ – мертвих (Ann V+/Pi+). При застосуванні 10 % концентрації кріопротектора збільшувався ($p < 0,001$) відсоток Ann V-/Pi+-клітин до $(1,8 \pm 0,5) \%$, Ann V+/Pi+ – до $(3,1 \pm 0,8) \%$, а також клітин, що перебувають на ранній стадії апоптозу від $(5,8 \pm 1,8)$ до $(16,1 \pm 1,8) \%$, ($p < 0,05$).

Після розморожування зразків ПК, порівняно з контролем, вміст ЯВК з пошкодженими мембранами зростав ($p < 0,001$) до $(3,2 \pm 0,8) \%$ та $(2,9 \pm 1,1) \%$ відповідно застосованій концентрації (5 % та 10 %) ДМСО; мертвих клітин – до $(1,0 \pm 0,2) \%$ та $(0,9 \pm 0,3) \%$. Відмічено зростання відносного вмісту Ann V-/Pi- -ЯВК з $(73,5 \pm 7,2)$ до $(88,6 \pm 1,1) \%$ ($p < 0,001$), а також зменшення клітин з апоптозом у зразках, що заморожували при 10 % ДМСО від $(16,1 \pm 1,8)$ до $(7,6 \pm 2,5) \%$ ($p < 0,01$). Ймовірно, це пов'язано зі зменшенням абсолютної кількості ЯВК ГТПК, що відбувається в процесі кріоконсервування-розморожування. Багаторазові відмивання клітин при їх підготовці до проведення методики оцінки стадій апоптозу сприяють видаленню повністю зруйнованих клітин. У розморожених суспензіях міжгрупових достовірних розбіжностей не виявлено.

При проведенні кореляційного аналізу встановлений тісний зв'язок досліджених показників та ПОЛ. Так, у контрольній групі вміст Ann V-/Pi+-клітин мав зв'язок з ТК ($r = 0,843$, $p < 0,01$), ОДК ($r = 0,863$, $p < 0,01$), ШО/ІПЗ ($r = -0,846$, $p < 0,01$), ДК/ТК ($r = -0,843$, $p < 0,01$) та ДК/ОДК ($r = -0,813$, $p < 0,01$). У зразках, що досліджували після дії кріопротектора, відсоток Ann V-/Pi+-клітин корелював із ШО ($r = 0,855$, $p < 0,01$), ШО/ІПЗ ($r = 0,954$, $p < 0,001$),

ГЕМАТОЛОГІЯ І ТРАНСФУЗИОЛОГІЯ

ДК/ОДК ($r = -0,573$, $p < 0,05$), ТК/ОДК ($r = 0,613$, $p < 0,01$), ДК/ШО ($r = -0,849$, $p < 0,01$), ОДК/ІПЗ ($r = 0,537$, $p < 0,05$); Ann V+/Pi--клітин – із ДК/ІПЗ ($r = 0,792$, $p < 0,001$) та ОДК/ІПЗ – ($r = 0,679$, $p < 0,01$). У розморожених зразках були встановлені зв'язки вмісту Ann V-/Pi--клітин з показниками ІПЗ ($r = -0,523$, $p < 0,05$), ДК/ТК ($r = -0,700$, $p < 0,001$), ДК/ОДК ($r = -0,605$, $p < 0,01$), ОДК/ІПЗ ($r = 0,493$, $p < 0,05$), ТК/ОДК ($r = 0,680$, $p < 0,01$).

Отже, зміни молекулярно-мембранних показників життєздатності ЯВК ГТПК, що відбуваються під час кріоконсервування, варті особливої уваги. Сьогодні існує достатня кількість повідомлень про можливості запобігання розвитку необоротних наслідків для клітин шляхом варіювання складу захисного середовища, застосування різноманітних біологічно активних речовин [7, 8]. Важливим кроком в еволюції низькотемпературного зберігання є поглиблення досліджень механізмів та шляхів підвищення кріостійкості.

Висновки. Обробка клітин кріопротектором, незалежно від використаної концентрації, негативно впливає на життєздатність ЯВК ГТПК, про що свідчить збільшення показника Pi-позитивних клітин, а також у випадку застосування 10 % концентрації ДМСО – клітин, що перебувають на ранній стадії апоптозу. Зростання вмісту інтактних клітин після розморожування пов'язане з видаленням зі складу розмороженої суспензії найбільш кріочутливих клітин.

Наявність тісної кореляції між показниками апоптозу та ПОЛ на етапах кріоконсервування підтверджують зв'язок структурно-функціональних порушень у мембранах клітин з їх кріочутливістю. Резервом для покращення характеристик розмороженого зразка шляхом удосконалення технології кріоконсервування є клітини, що знаходяться на ранніх стадіях запуску каскадного механізму апоптозу.

Література

1. Eurocord-Netcord and the Lymphoma Working Party; Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Alternative donor hematopoietic stem cell transplantation for mature lymphoid malignancies after reduced-intensity conditioning regimen: similar outcomes with UCB and unrelated donor peripheral blood / Rodrigues C.A., Rocha V., Dreger P. [et al.] // Haematologica. – 2014. – Vol. 99, №2. – P. 370-377.
2. Baust J.G. Cryoablation: Apoptotic Phase Shifting and Cryo-Sensitization / J.G. Baust // Problems of Cryobiology. – 2012. – Vol. 22, №3. – P. 234.
3. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System / R. Hingorani, J. Deng, J. Elia [et al.] // BD Biosciences. Application Note. – 2011. – P. 1-11.
4. Аношина М.Ю. Оцінка перекисного окислення ліпідів у зразках кріоконсервованої пуповинної крові / Аношина М.Ю., Калиниченко Т.О., Глухенька Г.Т. // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2011. – №3. – С. 12-15.
5. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V / Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. // J. Immunol. Methods. – 1995. – Vol. 184, №1 (Biology). – P. 39-51.
6. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment / R.C. Duggleby, S. Querol, R.C. Davy [et al.] // Transfusion. – 2012. – Vol. 52, №3. – P. 549-559.

7. Cryopreservation of Primate Mesenchymal Stem Cells with Antioxidants as Additional CPA / N. Hoffman, T. Muller, D. Pogozykh, B. Glasmacher // Problems of Cryobiology. – 2012. – Vol. 22, №3. – P. 347.

8. Антиоксидантний захист кріоконсервованої гемопоетичної тканини пуповинної крові / Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю., Балан В.В. [та ін.] // 36. наук. пр. співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика. - 2013. – Вип. 22, кн. 2. – С. 282-287.

Т.А. Калиниченко, М.Ю. Аношина, А.И. Гордиенко

Криочувствительность гемопоэтической ткани пуповинной крови

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», г. Киев

Введение. Потеря клеток при проведении криоконсервирования происходит за счет апоптоза и некроза.

Цель. Исследовать показатели криочувствительности гемопоэтической ткани пуповинной крови (ПК) по уровню апоптоза ядросодержащих клеток (ЯСК).

Методы. Криоконсервирование ЯСК ПК осуществляли под защитой 5 и 10 % диметилсульфоксида (ДМСО). Оценку состояния клеток проводили методами проточной цитофлуориметрии с использованием двойного окрашивания аннексином V (Ann V) и пропидиум йодидом (Pi), а также спектрофотометрического исследования перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Результаты. Показано, что после экспозиции с 5 % ДМСО возрастает содержание как Ann V+/ Pi+ ЯСК (до $2,2 \pm 0,3$ %) ($p < 0,001$), так и клеток с поврежденными мембранами (до $1,1 \pm 0,5$ %), ($p < 0,02$). Применение 10 % ДМСО приводит к увеличению клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза (до $16,1 \pm 1,8$ %), ($p < 0,05$). В размороженных образцах по сравнению с нативными, обнаружен прогнозируемый рост ($p < 0,01$) процентного содержания Ann V-/Pi+- и Ann V+/Pi+-клеток. Установлены тесные корреляционные связи показателей активности процессов липопероксидации с состоянием клеток.

Выводы. Наличие тесной корреляции между показателями апоптоза и ПОЛ на этапах криоконсервирования подтверждает связь структурно-функциональных нарушений в мембранах клеток с их криочувствительностью. Резервом для улучшения характеристик размороженного образца являются клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза.

Ключевые слова: криоконсервирование, пуповинная кровь, апоптоз, перекисное окисление липидов.

Т.О. Kalynychenko, M.Yu. Anoshyna, A.I. Gordienko

Cryosensitivity of the hematopoietic tissue of umbilical cord blood

SI “Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine”

Introduction. The cell loss during cryopreservation is due to apoptosis and necrosis.

Aim. To investigate the cryosensitivity level of the cord blood hematopoietic tissue by the indices of apoptosis of nuclear cells.

Methods. 5 and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) was used for cryopreservation of nuclear cells. The cell status was assessed by using the flow cytometry method with Annexin V (Ann V) and Propidium iodide (Pi) staining and the spectrophotometric study of lipid peroxidation.

Results. It has been shown that Ann V+/Pi+ cell content and damaged membranes increased to $(2,2 \pm 0,3) \%$, $p < 0.001$ and to $(1,1 \pm 0,5) \%$, $p < 0.02$, respectively after exposure with 5 % DMSO. The exposition with higher concentrations of DMSO – 10 % caused the increasing in early stages of the apoptosis cells (to $(16,1 \pm 1,8) \%$, $p < 0.05$). The prognostic increasing of the proportions of Ann V-/Pi+- and Ann V+/Pi+-cells was found in the thawed samples (compared to native, $p < 0.01$). The close correlation between lipid peroxidation indices with apoptosis indicators was established.

Conclusion. The close correlation between the indicators of the apoptosis and the lipid peroxidation level confirm the relationship of structural and functional disorders of cell membranes and their cryosensitivity on the stages of cryopreservation. The reserve for improving the thawed sample characteristics is the cells that are in the early stages of the apoptosis.

Key words: cryopreservation, umbilical cord blood, apoptosis, lipid peroxidation.

Відомості про авторів:

Калиниченко Тетяна Олексіївна – к. мед. н., ст. наук. співроб., завідувач лабораторії кріоконсервування гемопоетичних клітин ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. М. Берлинського, 12, тел.: (044) 440-31-55.

Аношина Мілітіна Юрїєвна - к. б. н., ст. наук. співроб., керівник групи біохімії ДУ «ІГТ НАМН», провідний науковий співробітник. Адреса: Київ, вул. М. Берлинського, 12, тел.: (044) 440-21-18.

Гордієнко Алла Іванівна – д. б. н., завідувач лабораторії онкогематології ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. М. Берлинського, 12, тел.: (044) 440-30-44.