

БИОЛОГИЯ

УДК 611-018.5.013.8:615.014.41

Л. А. Бабийчук, В. В. Рязанцев, П. М. Зубов, О. А. Михайлова

ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЯДРОСОДЕРЖАЩИМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой: «Изучение механизмов структурно-функциональных изменений ядродержащих клеток кордовой крови и эритроцитов под влиянием экзо- и эндоцеллюлярных криопротекторов и низких температур»; государственный регистрационный номер темы 0109U00278.

Вступление. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в последние годы стала важным компонентом лечения многих гематологических заболеваний, нарушений иммунной системы, анемий и т.п. В настоящее время стволовые гемопоэтические клетки для трансплантации получают из трех источников: костный мозг, периферическая кровь и пуповинная кровь (ПК). Повышение частоты использования ядродержащих клеток пуповинной крови (ЯСК ПК) для трансплантаций стало предпосылкой к созданию банков пуповинной крови, в которых образцы хранятся в жидком азоте (при -196°C) в течение длительного времени. Эффективность трансплантации во многом зависит от количества ГСК в концентрате ЯСК, поэтому, важным является совершенствование методов выделения этих клеток из цельной крови и дальнейшего их криоконсервирования, а также оценки структурно-функциональных показателей [6,7,8].

Кроме потери количества клеток, которая может наблюдаться уже на этапе выделения ЯСК из цельной ПК, процесс криоконсервирования способен вызывать нарушение их морфологических и метаболических свойств, что в дальнейшем может стать причиной гибели клеток. Одним из результатов подобных нарушений может быть накопление высоких концентраций активных форм кислорода (АФК), которые инициируют гибель клеток [3].

В связи с этим **цель исследования** заключалась в комплексной оценке состояния ЯСК ПК при различных методах криоконсервирования, включающая в себя определение количества сохранных и жизнеспособных клеток, а также оценку продукции клетками АФК.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служила пуповинная кровь человека, полученная из вены пульсирующей пуповины, заготовленная на глюкозоцитратном растворе.

Выделение фракции ЯСК проводили несколькими методами, в частности, по разработанному нами методу двухэтапного центрифугирования цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме (CONC 1) [4]. Кроме того, ядродержащие клетки выделялись методом седиментации в полиглюкине (CONC 2) и методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (CONC 3).

Для криоконсервирования CONC 1 был применен метод «холодовой» обработки 10 % полиэтиленоксидом с м.м. 1500 (ПЭО-1500) в конечной концентрации, приготовленный на растворе 0,01 М фосфатно-солевого буфера, содержащего 0,15М NaCl, pH 7.4 [4]. В качестве криопротектора для обработки CONC 2 использовали 5 % ДМСО (в конечной концентрации). CONC 3 замораживали с использованием двух криопротекторов — 10 % ПЭО-1500 и 5 % ДМСО. Добавление криопротекторов к суспензии клеток проводили дозировано, при низкой положительной температуре, 1:1 по объему. Затем суспензию клеток переносили в специальные криопробирки фирмы Nunc для замораживания.

Замораживание проводили до -196°C по специально разработанной двухэтапной программе. Оттаивание осуществляли при

37–40°C на водяній бані при постійному прокачуванні.

Сохранність ЯСК ПК определяли стандартним методом подсчета количества клеток в камере Горяева. Оценку жизнеспособности ядродержащих (CD45⁺) клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (США)) по международному ISHAGE протоколу с использованием ДНК-маркера 7-аминоактиномицина D (7AAD).

Уровень продукции внутриклеточных АФК определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием 5 μM дихлорфлуоресцин диацетата (DCFH₂DA).

Результаты исследований и их обсуждение. Процесс заготовки и криоконсервирования ядродержащих клеток пуповинной крови состоит из нескольких этапов: забор крови, выделение ЯСК из цельной ПК, обработка клеток криопротектором, процедура замораживания и отогрева. Для определения фенотипа клеток и их жизнеспособности широко применяют метод проточной лазерной цитометрии. На основе этого метода была проведена оценка жизнеспособности фенотипированных ядродержащих CD45⁺-клеток с использованием флуоресцентного ДНК-маркера 7AAD, который связывается с фрагментированным участком ДНК мертвой клетки.

Использование метода проточной лазерной цитометрии возможно не только для определения фенотипа клеток, но и для исследования метаболического состояния клеток. С этой целью постоянно разрабатываются новые флуоресцентные красители. В основном это нефлуоресцирующие вне клетки мембранно-проницаемые вещества, которые трансформируются в цитоплазме после обработки эстеразами. Данный принцип лежит и в основе применения индикаторов активных форм кислорода. В частности, нами использовался дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH₂DA), который после отщепления диацильной группы теряет способность свободно покинуть клетку, а образованный нефлуоресцентный DCFH₂, при наличии в клетке активных форм кислорода (АФК), переходит в высокофлуоресцентную форму DCF [2,5].

В физиологически полноценной клетке большинство АФК образуются постоянно, но их уровень в норме небольшой, так что клетка способна инактивировать их с помощью антиоксидантной системы. Поэтому, АФК, образующиеся в процессе нормального клеточного метаболизма, в основном из-за небольшой утечки электронов в дыхательной цепи митохондрий, а также других

окислительно-восстановительных реакций в органеллах и цитоплазме, не вызывают повреждения клетки. Однако уровень АФК, превышающий защитные возможности клетки, может вызывать нарушения митохондрий и, как следствие, истощение АТФ и активацию ферментов лизосом, что приводит к разрушению клетки. В зависимости от силы оксидантного стресса клетки могут погибнуть либо в результате апоптоза, когда внутреннее содержимое клетки успевает деградировать до нетоксичных продуктов распада, либо в результате некроза, когда сила оксидантного стресса слишком велика. При некрозе клеточная мембрана нарушается и содержимое клетки высвобождается в окружающую среду, что может в результате приводить к повреждению окружающих клеток и тканей [9].

Нами было проведено исследование состояния клеток, связанное с изучением процессов повреждения ЯСК ПК, происходящих на этапах выделения и криоконсервирования. В активно метаболизирующих ядродержащих клетках крови здоровых людей содержание активных форм кислорода находится на постоянном уровне. Любое изменение интенсивности флуоресценции исследуемых суспензий ЯСК сопоставлялось с базовым уровнем АФК в нативных клетках цельной ПК (контроль).

Было показано, что изменение количества DCF-меченых ядродержащих клеток в зоне высокой флуоресценции (зона High), зависело от метода их выделения из цельной ПК и становилось тем выше, чем большим воздействиям подвергались клетки в процессе выделения (рис.1). Т.е. применение метода двухэтапного центрифугирования для выделения фракции ЯСК из цельной пуповинной крови, характеризуется отсутствием достоверно значимых отличий количества

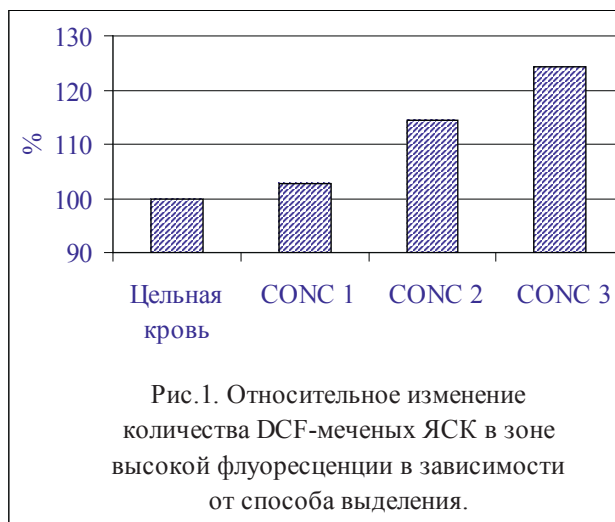


Рис. 1. Относительное изменение количества DCF-меченых ЯСК в зоне высокой флуоресценции в зависимости от способа выделения.

DCF^{High}+ЯСК (3 %), по сравнению с цельной кровью, что свидетельствует об отсутствии активации перекисных процессов.

С другой стороны, процедура выделения ЯСК с использованием полиглюкина приводила к изменению количества CD45⁺DCF^{High}+клеток в среднем на 14 % по сравнению с изначальным уровнем АФК цельной крови. По данным ДНК-красителя 7AAD, жизнеспособность ЯСК в CONC 1 и CONC 2 оставалась на высоком уровне — 98–100 % 7AAD⁺CD45⁺. А использование фиколла — высокомолекулярного полимера, повышает количество АФК в клетках на 25 %, что может быть связано с присутствием в среде выделения дополнительных повреждающих физико-химических факторов.

Необходимо отметить, что популяционный состав концентратов ЯСК ПК, полученный различными методами, отличается содержанием гранулоцитарных лейкоцитов, которые, в силу своих особенностей строения (большое количество лизосом и пероксисом), вносят значимый вклад в общий для всех ЯСК уровень флуоресценции DCF. Так, наиболее обогащенным гранулоцитами является концентрат, полученный методом двухэтапного центрифугирования (CONC 1), а наименее — метод с использованием фиколл-верографина, который позволяет получить преимущественно мононуклеарную фракцию клеток (CONC 3). Можно предположить, что CONC 3 должен иметь более низкий уровень флуоресценции DCF⁺-клеток, чем уровень в цельной кордовой крови. Однако, полученные данные прироста количества CD45⁺DCF^{High}+клеток могут свидетельствовать об интенсификации внутриклеточной продукции АФК на фоне сочетанного повреждающего действия химических и физических факторов на мононуклеарную фракцию лейкоцитов. Также, данный концентрат ЯСК, полученный с помощью фиколл-верографина, кроме 35–55 % потери клеток на этапе выделения, которая совпадает с литературными данными [6], имел более низкую жизнеспособность клеток по данным ДНК-красителя 7AAD — до 7 % 7AAD⁺CD45⁺.

В работе было использовано два метода криоконсервирования — под защитой проникающего (ДМСО) и непроникающего (ПЭО-1500) криопротекторов. Было показано, что обработка концентратов ЯСК данными криопротекторами, независимо от природы их действия на клетку, несущественно влияла на продукцию клетками АФК, что соответствовало незначительному изменению интенсивности свечения DCF^{High}+ в исследуемых клеточных препаратах (на 2–14 %) по срав-

нению с уровнем до обработки криопротектором (рис.2).

Сохранность ЯСК в CONC 1 и CONC 2 после обработки криопротекторами составляла 97–99 % CD45⁺-клеток от изначального их количества в концентрате. А обработка клеток, выделенных в градиенте плотности фиколла, показывала наиболее низкую сохранность ЯСК — 93–96 % (рис.3А).

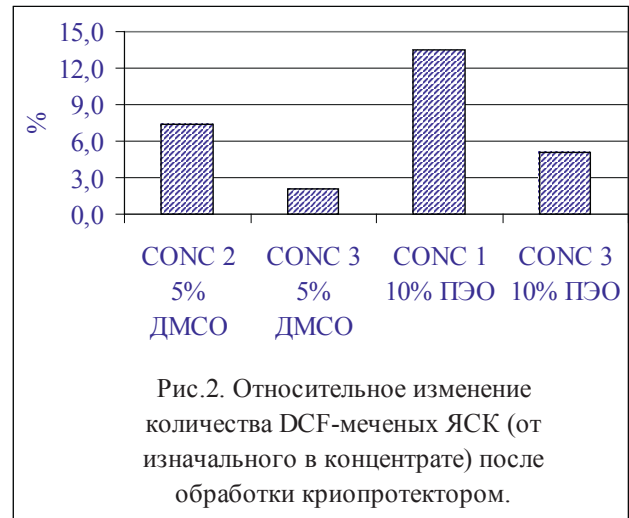


Рис.2. Относительное изменение количества DCF-меченых ЯСК (от изначального в концентрате) после обработки криопротектором.

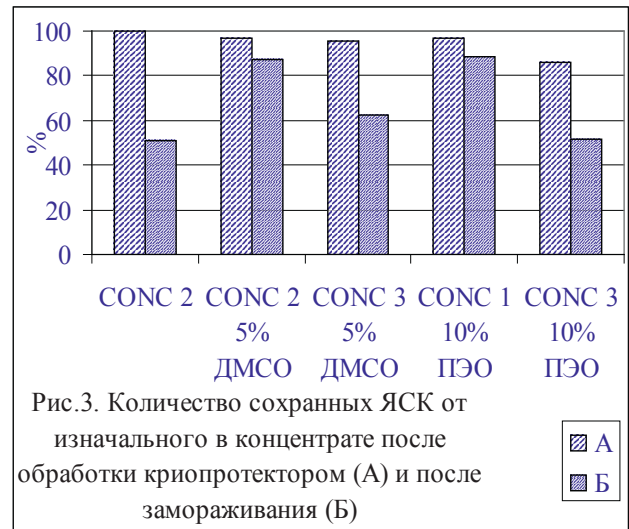


Рис.3. Количество сохраненных ЯСК от изначального в концентрате после обработки криопротектором (А) и после замораживания (Б)

Процедура замораживания-оттаивания клеток, как наиболее повреждающий этап в процессе криоконсервирования, приводит к существенным изменениям в работе окислительно-восстановительной системы. После криоконсервирования количество CD45⁺DCF^{High}+клеток изменяется в разной степени, в зависимости от метода выделения и использованного криопротектора (рис.4).

Минимальная сохранность клеток после замораживания отмечалась в ядродержащих клетках, выделенных в полиглюкине и замороженных без дополнительного криопротектора (CONC 2), и составляла порядка 46–60 % (рис.3Б), из которых толь-

ко 18–25 % являються життєспособними (CD45⁺7AAD⁻) (рис.5, CONC 2). При цьому також наблюдалось наибольшее изменение количества DCF⁺-клеток в зоне яркого свечения High — порядка 60 % (рис.4, CONC 2).

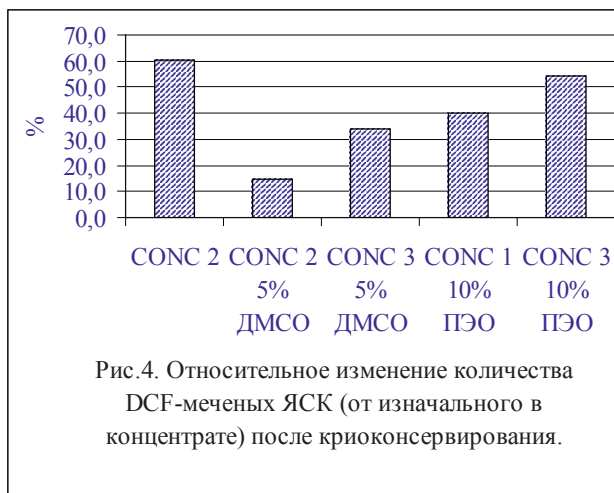


Рис. 4. Относительное изменение количества DCF-меченых ЯСК (от изначального в концентрате) после криоконсервирования.

При использовании непроникающего криопротектора ПЭО-1500 для обработки концентратов ЯСК, полученных методом двухэтапного центрифугирования (CONC 1) и с использованием фиколла (CONC 3), изменение относительного количества DCF⁺-клеток в зоне High после криоконсервирования составляло 40 и 54 % соответственно. Применение проникающего в клетки ДМСО для обработки CONC 2 и CONC 3, показывало изменение относительного количества CD45⁺DCF^{High+}-клеток после замораживания на 15 и 34 % соответственно. Эти данные свидетельствуют о большем повреждении клеток в CONC 3, по сравнению с другими методами выделения, независимо от вида использованного криопротектора. Из данных, представленных на рисунке 4, видно, что использование при криоконсервировании проникающего ДМСО для обработки CONC 2 и CONC 3, количество внутриклеточных АФК изменяется в меньшей степени, по сравнению с обработкой ПЭО-1500. По-видимому, использование только непроникающего криопротектора для защиты ядродержащих клеток от повреждающих факторов замораживания, является недостаточным условием для обеспечения хорошего качества таких клеток после процедуры криоконсервирования: жизнеспособность CD45⁺-клеток в CONC 3, замороженных под защитой 5 % ДМСО в среднем на 30 % выше, чем при использовании 10 % ПЭО-1500 (рис.5).

Подобный дисбаланс окислительного метаболизма клеток, возникающий на этапах криоконсервирования, может быть связан с рядом механизмов, в том числе активации ферментов антиоксидантной защиты (ката-

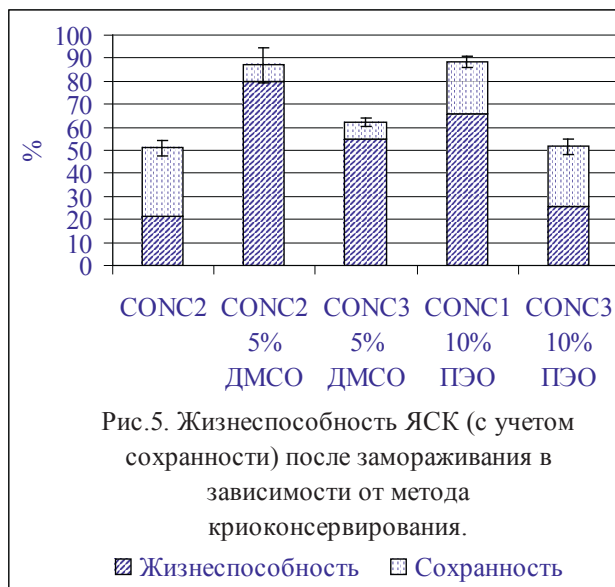


Рис. 5. Жизнеспособность ЯСК (с учетом сохранности) после замораживания в зависимости от метода криоконсервирования.

лаза, GS-пероксидаза, СОД), в результате чего процесс образования АФК в клетке замедляется [5]. В случае замораживания-оттаивания могут возникать нарушения эстеразной энзиматической активности внутри клетки, в результате чего DCFH₂-DA не преобразуется в активную форму DCFH₂. Кроме того, возможно увеличение скорости рециклинга NADPH/NADP при участии NADP-оксидазы в данных экспериментальных условиях, что снижает цитозольную концентрацию АФК, поскольку известно, что клеточное окисление DCFH₂-DA осуществляется двумя энзиматическими H₂O₂-генерирующими системами — глюкооксидазной и ксантиноксидазной [2,5].

Выводы. Таким образом, проведенная комплексная оценка продукции внутриклеточных АФК, количества сохраненных и жизнеспособных ЯСК в процессе криоконсервирования под защитой различных криопротекторов, показала, что активация образования АФК в существенной степени зависит от применяемого метода выделения клеток из пуповинной крови и используемого криопротектора. Наиболее эффективным для обеспечения сохранности, жизнеспособности и продукции клетками АФК в процессе замораживания-отогрева являлся метод двухэтапного центрифугирования цельной пуповинной крови с последующим разделением на эритроциты и концентрат ЯСК в аутоплазме. Метод криоконсервирования ЯСК под защитой 5 % ДМСО в наименьшей степени приводил к активации образования АФК в клетке и позволял сохранить в жизнеспособном состоянии более 80 % CD45⁺-клеток.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшей работе предполагается исследовать антиоксидантное состояние ЯСК

путем индукции окислительного стресса с помощью экзогенной перекиси водорода, что может приводить к разобщению окислительного фосфорилирования и неконтролируемому нарастанию внутриклеточного содержания АФК в ЯСК в случае сильного повреждения на всех этапах криоконсервирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабийчук Л.А Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопозитических клеток кордовой крови человека/Л.А. Бабийчук, В.И. Грищенко, В.В. Рязанцев [и др.]//Укр. журн. гематол. і трансфузіол.– 2005.– № 4 (д).– С. 122–123.
2. Дамбаева С.В Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека/С.В. Дамбаева, Д.В. Мазуров, Б.В. Пинегин//Иммунология.– 2001.– № 6.– С. 58–61.
3. Новицкий В.В Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса/В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Н.Ю. Часовских [и др.]//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2008.– № 3.– С. 251–254.
4. Пат. 23499 Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові/Бабийчук Л.А., Грищенко В.И., Рязанцев В.В., Зубов П.М., Зубова О.Л.; заявник та патентовласник інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. — № 200700585; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. № 7
5. Bass D.A Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation/D.A. Bass, J.W. Parce, L.R. Dechatelet [et al.]//J. Immunol.– 1983.– Vol. 130.– № 4.– P. 1910–7.
6. Broxmeyer H.E Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells/H.E. Broxmeyer, G.W. Gordon, G. Hangoc [et al.]//Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1989.– Vol. 86.– P. 3828–3832.
7. Gluckman E. Cord blood transplant: strategy of alternative donor search/E. Gluckman, V. Rocha//Springer Semin Immunopathol.– 2004.– Vol. 26.– № 1–2.– P. 143–54.
8. Laroche V. Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples/V. Laroche, D.H. McKenna, G. Moroff [et al.]//Transfusion.– 2005.– Vol. 45.– № 12.– P. 1909–16.
9. Valko M. Toxicity and Oxidative Stress/M. Valko, H. Morris, M. Cronin [et al.]//Current Medicinal Chemistry.– Vol. 12.– № 10.– P. 1161–1208 (48).

УДК 611–018.5.013.8:615.014.41

ОЦІНКА ПРОДУКЦІЇ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ЯДРОВІСНИМИ КЛІТИНАМИ ПУПОВИНОЇ КРОВІ НА ЕТАПАХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Бабійчук Л. О., Рязанцев В. В., Зубов П. М., Михайлова О. О.

Резюме. Метою дослідження була комплексна оцінка стану ядровмісних клітин пуповинної крові при різних методах криоконсервування, що включає в себе визначення кількості збережених та життєздатних клітин, а також оцінку продукції клітинами активних форм кисню. Показано, що найбільш ефективним методом виділення для забезпечення високого рівня збереженості та життєздатності, а також низького рівня продукції активних форм кисню ядровмісними клітинами є метод двохетапного центрифугування цільної пуповинної крові з подальшим розділенням на еритроцити та концентрат ядровмісних клітин в аутоплазмі. Метод криоконсервування ядровмісних клітин під захистом 10 % ДМСО в найменшій мірі призводив до активації утворення активних форм кисню в клітинах і дозволяв зберегти у життєздатному стані більше 80 % CD45⁺-клітин.

Ключові слова: ядровмісні клітини пуповинної крові, криоконсервування, активні форми кисню.

УДК 611–018.5.013.8:615.014.41

ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЯДРОСОДЕРЖАЩИМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ЭТАПАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Бабийчук Л. А., Рязанцев В. В., Зубов П. М., Михайлова О. А.

Резюме. Целью исследования была комплексная оценка состояния ядросодержащих клеток кордовой крови при различных методах криоконсервирования, включающая в себя определение количества сохранных и жизнеспособных клеток, а также оценку продукции клетками активных форм кислорода. Показано, что наиболее эффективным методом выделения для обеспечения высокого уровня сохранности и жизнеспособности, а также низкого уровня продукции активных форм кислорода ядросодержащими клетками явился метод двухэтапного центрифугирования цельной пуповинной крови с последующим разделением на эритроциты и концентрат ядросодержащих клеток в аутоплазме. Метод криоконсервирования ядросодержащих клеток под защитой 5 % ДМСО в наименьшей степени приводил к активации образования активных форм кислорода в клетке и позволял сохранить в жизнеспособном состоянии более 80 % CD45⁺-клеток.

Ключевые слова: ядросодержащие клетки кордовой крови, криоконсервирование, активные формы кислорода.

UDC 611-018.5.013.8:615.014.41**EVALUATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS ON CRYOPRESERVATION STAGES****Babijchuk L. A., Ryazantsev V. V., Zubov P. M., Mikhailova O. A.**

Summary. The aim of this study was a comprehensive assessment of the cord blood nucleated cells with various methods of cryopreservation, which includes amount determining of intact and viable cells, as well as evaluation of reactive oxygen species production. It is shown that the most effective method of cord blood nuclear cells isolation for a high level of safety and viability, as well as low levels of production of reactive oxygen species is a two-step method of centrifugation of whole cord blood, followed by separation into red blood cells and concentrate of nuclear cells in autoplasm. The cryopreservation method of nucleated cells under the protection of 10 % DMSO least of all led to the activation of reactive oxygen species in cells and allowed to maintain a viable state for more than 80 % CD45⁺-cells.

Key words: cord blood nucleated cells, cryopreservation, reactive oxygen species.

Стаття надійшла 26.08.2010 р.

УДК 576.08+571.21+616.33-008.821.14+612.326.3

О. Г. Короткий, С. В. Пилипенко, І. В. Компанець, Л. І. Остапченко

РЕАКЦІЯ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ ЩУРІВ НА ВВЕДЕННЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ» КОНЦЕНТРОВАННИЙ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ЗНИЖЕННЯ ШЛУНКОВОЇ СЕКРЕЦІЇ СОЛЯНОЇ КИСЛОТИ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Дослідження проведені в рамках наукових тем біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка: «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції» (№ держреєстрації 0106U005755) та «Визначення біохімічних, генетичних, імунологічних та цитологічних маркерів розвитку патологічних станів організму з метою розробки засобів направленої корекції і профілактики» (№ держреєстрації 0106U005750).

Вступ. Зниження секреції соляної кислоти в шлунку сприяє посиленню колонізації травного тракту різноманітними мікроорганізмами, оскільки кисле середовище є одним з найголовніших неспецифічних факторів захисту проти бактеріальної інфекції [17,29]. Відомо, що мікрофлора шлунково-кишкового тракту виконує імуномодулюючу функцію на різних рівнях імунного захисту: підтримує імунний гомеостаз, активно взаємодіючи з клітинами імунної системи травного тракту, визначає їх диференціацію, впливає на баланс в системі Th1/Th2 та на синтез імунними клітинами багатьох цитокінів [11,27]. За умов тривалої гіпоацидності шлункового

соку доцільним є профілактика та лікування дисбактеріозів пробіотиками.

Тривале зниження кислотності шлункового соку, викликане введенням інгібітору протонної помпи — омепразолу, призводить до морфофункціональних змін в шлунково-кишковому тракті, запалення та значного підвищення рівня гастрину в крові (гіпергастринемії) [8,34]. Встановлено, що гіпергастринемія є фактором ризику розвитку пухлин шлунку та товстого кишечника [28,30].

Негативні наслідки гіпоацидності шлункового соку, безумовно, впливають на імунну систему, яка шляхом багатьох складних імунних реакцій підтримує фізіологічний стан організму. Сьогодні особлива увага дослідників пов'язана із з'ясуванням регуляторної ролі різноманітних цитокінів, які контролюють певні імунні реакції, в тому числі і ті, які суттєво впливають на функціонування травного тракту. Так відомо, що прозапальні цитокіни ІЛ-1 β та ФНП- α є потужними факторами пригнічення шлункової секреції [9], а ІФН- γ стимулює продукцію G-клітинами шлунку гастрину [33].

Сучасні експериментальні роботи присвячені вивченню механізмів дії пробіотиків та їх ролі в корекції порушень, які виника-