

СЕКЦІЯ 10. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 611.018.53:618.48:57.086.13:577.121.7

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ І ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ У L-КАРНІТИН-ВМІСНИХ РОЗЧИНАХ ТА ПЕРЕНЕСЕННЯ У ФІЗІОЛОГІЧНІ УМОВИ *IN VITRO*

П.М. Зубов¹, О.Л. Зубова²

^{1, 2}Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна

Кордова кров (КК), яка раніше вважалася медичними відходами, в даний час визнана цінним джерелом клітин для терапевтичного використання [3]. Накопичені за тривалий період спостереження щодо клінічного застосування КК значно покращили розуміння її біологічних властивостей і терапевтичного потенціалу [5]. Легкий спосіб отримання КК і унікальні характеристики клітин розкривають її можливості для терапії різних гематологічних та негематологічних захворювань [4]. Найбільш поширеним застосуванням є трансплантація гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК), які мають подібні властивості з клітинами кісткового мозку. З огляду на широке застосування КК виникла необхідність створення кріобанків та ефективних кріотехнологій довгострокового зберігання. Вирішення цієї задачі можливе лише шляхом проведення досліджень по вивченню впливу факторів на збереження та життєздатність клітин на всіх етапах заморожування-відігрівання. Це дозволить виявити критичні точки, в яких відбувається порушення структурних компонентів клітин, що стане основою для розробки ефективних технологій кріоконсервування. Крім того, для прогнозування терапевтичної ефективності препаратів кордової крові важливо не лише оцінювати їх стан одразу після розморожування, але й вивчати відстрочений стан клітин, перенісши їх у фізіологічні умови *in vitro* [1].

У попередніх роботах ми показали, що при кріоконсервуванні ядровісних клітин кордової крові (ЯВК) на етапі еквілібрації з кріопротекторами, а також після розморожування, спостерігається збільшення активних форм кисню. Це може призвести до порушення енергетичного стану клітин і пошкодження їх мембран через перекисне окислення ліпідів [2]. Ми вважаємо, що додавання до кріозахисного середовища речовин з антиоксидантними властивостями дозволить уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу, покращуючи результати кріоконсервування. Спираючись на аналіз літератури, ми припустили, що додавання антиоксиданту L-карнітину до кріопротекторного розчину може суттєво поліпшити результати кріоконсервування ЯВК кордової крові [6].

Таким чином, метою роботи було визначення збереженості і життєздатності ядровісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних,

клітин кордової крові людини після кріоконсервування у L -карнітин-вмісних розчинах та перенесення до фізіологічних умов *in vitro*.

Виділення фракції ядровмісних клітин із цільної КК проводили методом седиментації у 6 % розчині поліглюкіну. В якості кріопротектора використовували ДМСО у кінцевих концентраціях 2,5; 5 та 7,5 %. L-карнітин використовували в кінцевих концентраціях 1; 5; 10; 15; 20; 50 мМ. Кріоконсервування проб КК проводили на програмному заморозувачі зі швидкістю 1 °С/хв до -80 °С з наступним зануренням до рідкого азоту. Моделювання трансфузії *in vitro* проводили шляхом перенесення у співвідношенні 1:10 суспензії деконсервованих клітин у розчин Хенкса (рН 7,4) при підтримуванні температури 37 °С протягом однієї години. Підрахунок клітин у пробах проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою. Життєздатність ЯВК (CD45⁺) та ГПК (CD34⁺) оцінювали з використанням моноклональних антитіл CD45FITC, CD34PE і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) методом протокової цитофлуориметрії.

Отримані нами результати показали, що після годинної інкубації розморожених клітин в фізіологічних умовах *in vitro* спостерігається значне зниження (на 20-35 %) збереженості та життєздатності ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові, що вказує на виражену дестабілізацію клітин при заморожуванні-відтаванні.

Визначення кількості збережених ЯВК КК після кріоконсервування у розчинах з різною концентрацією ДМСО і L-карнітину та годинної інкубації клітин у розчині Хенкса виявило значущі відмінності за даним показником між пробами, що містили різну концентрацію ДМСО. Мінімальні значення (28-33 %) були у зразках, що містили 2,5 % ДМСО. Клітини, заморожені з кріопротектором у концентрації 5 %, характеризувалися збереженістю на рівні 38-43 %. Максимальна збереженість (49-57 %) фіксувалася в пробах, що містили 7,5 % ДМСО. Наявність L-карнітину у кріопротекторних розчинах забезпечувало збільшення кількості збережених клітин при всіх концентраціях ДМСО, що досліджувалися. Максимальний ріст збереженості виявлявся у пробах, що містили 15-50 мМ антиоксиданту. Аналогічні закономірності також спостерігалися при аналізі збереженості ГПК: мінімальна збереженість клітин була у зразках, заморожених з 2,5 % ДМСО, а максимальна (60-73 %) – при вмісті 7,5 % ДМСО у складі кріопротекторного розчину. Наявність у пробах антиоксиданту також, як і у випадку з ЯВК, забезпечувала збереженість більшої кількості ГПК у пробах. При кріоконсервуванні з 2,5 % ДМСО та L-карнітином достовірні відмінності спостерігалися лише у пробах з 20 мМ антиоксидантом. Підвищення збереженості у цих зразках складало близько 28 %. В розчинах з 5 % ДМСО ефект від внесення антиоксиданту був більш виражений: L-карнітин викликав достовірне підвищення кількості збережених ГПК, починаючи з концентрації L-карнітину 5 мМ. У пробах, що містили 7,5 % ДМСО та 10 – 50 мМ L-карнітину, кількість збережених клітин була на 15-20 % вищою у порівнянні з контрольними пробами, які не містили антиоксидант.

У наступній серії експериментів було проведено визначення виходу живих клітин після кріоконсервування у різних розчинах та моделювання трансфузії *in vitro* у порівнянні з контрольними значеннями до кріоконсервування.

Так, у пробах, що містили 2,5 % ДМСО та антиоксидант, достовірних відмінностей не спостерігалось. Можна говорити лише про тенденцію збільшення виходу живих клітин з 22,7 % у контролі до 27 % у пробах, що містили 20 мкМ L-карнітину. Аналогічний ефект спостерігався і у пробах з 5 % ДМСО. При концентрації кріопротектора 7,5 % та антиоксиданту – 15-50 мМ спостерігалось достовірне збільшення виходу живих клітин. Підвищення складало до 21 % у порівнянні з контрольними пробами, куди не вносили L-карнітин.

Визначення кількості живих ГПК у порівнянні з контрольними значеннями до заморожування показало, що в зразках, які містили 2,5 % ДМСО та L-карнітин, спостерігалась тенденція до підвищення даного показника при зростанні концентрації антиоксиданту. Максимальні показники фіксувалися в пробах, що містили 2,5 % ДМСО та 20 мМ L-карнітину (в цих пробах вихід клітин був на 40 % більшим у порівнянні з контрольними значеннями). Збільшення концентрації кріопротектора в зразках до 5 % в 1,5–1,9 раз підвищувало вихід живих клітин. Окрім цього, додавання в кріопротекторне середовище L-карнітину викликало додаткове зростання виходу живих ГПК на 18-25 % (концентрація 20 мМ виявилася найефективнішою). Годинна інкубація зразків, кріоконсервованих з 7,5 % ДМСО та L-карнітином, в розчині Хенкса виявила ефективність внесення антиоксиданту в концентраціях 10 - 50 мМ. У цих експериментальних зразках вихід живих ГПК був на 20-27 % вищим у порівнянні з пробами, в які його не вносили.

Таким чином було показано, що кріоконсервування ядровмісних клітин під захистом ДМСО та з додаванням антиоксиданту L-карнітину в ефективних концентраціях (15-20 мМ) дозволяє зберігати на 13-28 % більше життєздатних ядровмісних клітин, включно з гемопоетичними прогеніторними, після годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro*, у порівнянні з контрольними зразками, в які не вносили антиоксиданти.

Література

1. Бабійчук Л.О., Зубов П.М., Макашова О.Є., Зубова О.Л. Моделювання трансфузії як підхід для прогнозування ефективності кріоконсервованих препаратів ядровмісних клітин кордової крові людини: матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., м. Одеса, 16-17 жовт. 2020 р. Одеса, 2016. С. 66–70.

2. Макашова О.Є., Зубова О.Л., Зубов П.М., Бабійчук Л.О. Активні форми кисню як фактор зниження кількості життєздатних ядровмісних клітин кордової крові людини при кріоконсервуванні. Медична та клінічна хімія. 2019 Т. 21, № 3, додаток. С. 112–113.

3. Ballen K., Gluckman E., Broxmeyer H. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Blood. 2013. Vol. 122, № 4. P. 491–498.

4. Orlando N., Pellegrino C., Valentini C. Umbilical cord blood: Current uses for transfusion and regenerative medicine. *Transfus. Apher. Sci.* 2020. Vol. 59, № 5. P. 102952.

5. Sanchez-Petitto G., Rezvani K., Daher M. Umbilical cord blood transplantation: connecting its origin to its future. *Stem Cells Transl Med.* 2023. Vol. 12, № 2. P. 55–71.

6. Surai P.F. Antioxidant action of carnitine: molecular mechanisms and practical applications // *EC Veterinary Science.* 2015. Vol. 2, № 1. P. 66-84.