

Состояние АФК-продуцирующей и антиоксидантной системы криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови

В.В. РЯЗАНЦЕВ, Л.А. БАБИЧУК, О.А. МИХАЙЛОВА, П.М. ЗУБОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

State of ROS-Producing and Antioxidant Systems in Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cells

V.V. RYAZANTSEV, L.A. BABYCHUK, O.A. MIKHAYLOVA, P.M. ZUBOV

L.V. BABYCHUK, V.G. BABYCHUK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Эффективность применения фракции криоконсервированных ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови (КК) определяется не только достаточным их количеством, но и сохранением функциональной полноценности как после выделения из цельной крови, так и в процессе криоконсервирования. Одним из объективных критериев полноценности ЯСК является оценка их метаболического состояния по продукции активных форм кислорода (АФК) и активности антиоксидантной системы (АОС) клеток.

Целью работы было определение содержания активных форм кислорода в ЯСК КК и изучение состояния их АОС до и после криоконсервирования.

Продукцию АФК ядросодержащих клеток КК оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием DCFH₂-DA, который при наличии в клетке АФК переходит в высокофлуоресцентную форму DCF. Состояние АОС клеток оценивали после добавления в суспензию клеток экзогенной H₂O₂ в концентрации 250 мкмоль. Показано, что активация образования АФК зависит от метода выделения клеток из пуповинной крови и используемого криопротектора. Наиболее эффективным являлся метод двухэтапного центрифугирования цельной пуповинной крови с получением концентрата ЯСК в аутоплазме. Метод криоконсервирования ЯСК под защитой 5%-го раствора ДМСО в наименьшей степени приводил к активации образования АФК в клетках. При исследовании особенностей образования АФК разными популяциями ЯСК было показано, что как в цельной КК, так и после выделения клеток, обработки их криопротектором и после замораживания-оттаивания наибольший вклад в общий уровень флуоресцирующей формы DCF вносит популяция моноцитов, в то время как лимфоциты и гранулоциты образуют меньшее количество внутриклеточных АФК.

Подобный дисбаланс окислительного метаболизма клеток, возникающий на разных этапах криоконсервирования, может быть связан с состоянием ферментов антиоксидантной защитной системы (каталаза, GS-пероксидаза, СОД), которую оценивали после добавления в суспензию клеток экзогенной H₂O₂. Показано, что после замораживания-отогрева временная динамика АФК отличалась от таковой в клетках до замораживания и характеризовалась отсутствием существенного снижения АФК в первые 15 мин инкубации с H₂O₂, но с течением времени данные различия нивелировались и содержание АФК снижалось до базового уровня в цельной КК, что свидетельствует о восстановлении работы АОС клеток после криоконсервирования. Основной вклад в этот процесс происходит за счет популяций моноцитов и гранулоцитов, а лимфоциты сохраняют высокую активность АОС.

Application efficiency of the fraction of cord blood (CB) cryopreserved nucleated cells (NC) is determined not only by the number but also by the preservation of functional integrity both after isolation from the whole blood and during cryopreservation. One of objective criteria of NC integrity is the estimation of their metabolic state by the production of reactive oxygen species (ROS) and activity of antioxidant system (AOS) in the cells.

The research aim was the examining of reactive oxygen species content in CB NC and investigation of their AOS state prior to and after cryopreservation.

ROS production of CB nucleated cells was assessed by means of flow cytometer using DCFH₂-DA which in the presence of ROS in a cell transforms into highly fluorescent form of DCF. State of cell AOS was assessed after adding into cell suspension of exogenous H₂O₂ in 250 μmol concentration. It has been shown that activation of ROS formation depends on the method of cell isolation from umbilical blood and the cryoprotectant used. The most effective was the method of two-stage centrifugation of the whole cord blood with obtaining the NC concentration in autoplasm. Cryopreservation method for NC under 5% DMSO protection in less extent resulted into activation of ROS formation in cells. When studying the peculiarities of the ROS formation by different NC populations it has been shown that both in the whole CB and after isolation of the cells, treating them with cryoprotectant and after freeze-thawing the biggest contribution into the total level of fluorescent form of DCF was done by population of mono-cytes, while the lymphocytes and granulocytes form the less amount of intracellular ROS.

Such a disbalance in cell oxidative metabolism appearing at different cryopreservation stages can be related to the state of enzymes of antioxidant defence system (catalase, GS-peroxidase, SOD) which was estimated after adding into cell suspension of exogenous H₂O₂. It has been demonstrated that after freeze-thawing the temporal dynamics of ROS formation differed from the one in cells prior to freezing and was characterized by the absence of significant reduction of ROS content in the first 15 min of incubation with H₂O₂, but with time these differences were levelled and ROS content decreased down to base level in the whole CB, testifying to the restoration in cell AOS activity after cryopreservation. Populations of monocytes and granulocytes mainly contribute to this process and lymphocytes preserve a high activity of AOS.