

Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М.
**ОЦЕНКА СОХРАННОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ПОСЛЕ
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ В КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ
РАЗЛИЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ
ДМСО И N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА**

Научный руководитель д-р биол. наук, проф. Бабийчук Л. А.

Отдел криоцитологии

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Актуальность. Большое внимание со стороны ученых и врачей к использованию препаратов кордовой крови (КК) привело к необходимости создания банков, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре -196°C в течение практически неограниченного времени без потери их биологических свойств. При этом эффективность криоконсервированных препаратов КК в значительной степени зависит от количества сохраненных клеток и их функциональной активности после размораживания. Добавление в криозащитную среду антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина (АЦ) способно предотвратить повреждение и, как следствие, гибель клеток при криоконсервировании.

Цель: оценка сохранности и жизнеспособности ГПК (гемопоэтических прогениторных клеток) ($\text{CD}34^{+}$ -клеток) кордовой крови после криоконсервирования с использованием различных концентраций ДМСО и N-ацетил-L-цистеина.

Материалы и методы. В выделенную полиглобулином (с молекулярной массой 60кДа) фракцию ядросодержащих клеток вносили 25%-й раствор ДМСО до конечных концентраций в пробе 5, 7,5 и 10%. N-ацетил-L-цистеин использовали в концентрациях 5; 10; 15 и 30 мМ. Криоконсервирование проводили со скоростью 1-3 $^{\circ}\text{C}$ в минуту до -80°C , с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе Cryoson. Абсолютное количество клеток подсчитывали в камере Горяева согласно стандартной методике. Жизнеспособность ГПК оценивали по стандартному ISHAGE протоколу (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) с использованием моноклональных антител ($\text{CD}45\text{FITC}$, $\text{CD}34\text{PE}$) и ДНК-красителя 7-аминоактиномицина D (7AAD) методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur.

Результаты и их обсуждение. При анализе сохранности и жизнеспособности ГПК КК, криоконсервированных под защитой различных концентраций ДМСО без добавления АЦ, было продемонстрировано снижение изучаемых показателей во всех экспериментальных группах. При этом наименьшие потери клеток наблюдались при замораживании ГПК под защитой 7,5 и 10% ДМСО. Абсолютное количество $\text{CD}45^{+}\text{CD}34^{+}7\text{AAD}^{-}$ -клеток в этих пробах составляло до 65%.

При исследовании состояния ГПК после замораживания-отогрева было показано, что при использовании таких концентраций АЦ, как 5 и 30 мМ, показатели сохранности и жизнеспособности не отличались от таковых в пробах, криоконсервированных без антиоксиданта. Наибольшее количество сохраненных клеток наблюдалось в пробах, замороженных с 10 и 15 мМ концентрацией АЦ в комбинации с ДМСО в концентрации 7,5% ($86,4 \pm 1,5\%$ и $88,2 \pm 3,1\%$) и 10% ($88,6 \pm 2,8\%$ и $90,2 \pm 3,1\%$) соответственно. Жизнеспособность ГПК, криоконсервированных с 15 мМ АЦ и 7,5% ДМСО составляла $88,2 \pm 1,5\%$, а с 10 и 15 мМ концентрацией АЦ и 10% ДМСО - $87,8 \pm 3,3\%$ и $86,6 \pm 2,1\%$, соответственно. Следует отметить, что абсолютное количество $\text{CD}45^{+}\text{CD}34^{+}7\text{AAD}^{-}$ -клеток в пробах, содержащих 10 и 15 мМ АЦ и 7,5% ДМСО, составляло $74,8 \pm 2,4\%$ и $77,8 \pm 2,3\%$, а с 10% ДМСО - $77,8 \pm 3,3\%$ и $78,1 \pm 3,1\%$, что превышает аналогичные показатели без использования антиоксидантов.

Выводы. Таким образом, криоконсервирование ГПК КК под защитой 7,5-10% ДМСО в сочетании с 10-15 мМ растворами АЦ обеспечивает сохранность достоверно большего количества жизнеспособных клеток, что может указывать на перспективность использования антиоксидантов при разработке технологий криоконсервирования гемопоэтических прогениторных клеток кордовой крови.