

DOI: 10.26693/jmbs03.02.245

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

Макашова О. Є.¹, Зубова О. Л.¹, Зубов П. М.¹,
Михайлова О. О.^{1,2}, Бабійчук Л. О.¹

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ ЇХ ДО УМОВ, ЩО МОДЕЛЮЮТЬ ФІЗІОЛОГІЧНІ

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Olena.makashova@gmail.com

У роботі проведено порівняльний аналіз ефективності кріопротекторних сумішей, що містять різні концентрації проникаючого кріопротектора ДМСО та антиоксидантів, при кріоконсервуванні ядровісних клітин кордової крові та після перенесення їх до умов, наближених до фізіологічних. Показано, що додавання до кріозахисного середовища аскорбінової кислоти, N-ацетил-L-цистеїна або глутатіона сприяє зниженню кількості клітин із надлишковим вмістом активних форм кисню і підвищенню показників збереженості та життєздатності ядровісних клітин після перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні. Найбільший цитопротекторний ефект спостерігається в пробах, кріоконсервованих із 7,5 і 10% ДМСО з додаванням глутатіону в концентрації 1 та 3 мМ, де зберігається до 75% ядровісних клітин в життєздатному стані, порівняно з двома іншими антиоксидантами в оптимальних концентраціях, які забезпечують життєздатність лише до 65% клітин.

Ключові слова: ядровісні клітини кордової крові, кріоконсервування, диметилсульфоксид, активні форми кисню, аскорбінова кислота, N-ацетил-L-цистеїн, глутатіон.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота виконана у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи відділу кріоцитології «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур», № державної реєстрації 0114U001320.

Вступ. Після проведення серій успішних трансплантацій гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові (КК) та отримання беззаперечних доказів її ефективності і безпеки, у багатьох наукових центрах світу активно ведуться розробки протоколів її кріоконсервування з метою підвищення показ-

ників збереженості та життєздатності клітин [3]. Більшість з них базується на застосуванні проникаючого кріопротектора ДМСО в ефективних концентраціях. Проте вони не враховують, що під час кріоконсервування ядровісні клітини (ЯВК) КК зазнають значного стресорного впливу, в результаті чого відбувається накопичення високих концентрацій активних форм кисню (АФК), які, як свідчать літературні дані [8], можуть ініціювати розвиток апоптозу та загибель клітин як до, так і після кріоконсервування. Тому додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів [7] може сприяти підвищенню збереженості та життєздатності ЯВК КК як відразу після кріоконсервування, так і після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні. Оскільки існують припущення, що в процесі кріоконсервування клітини отримують певні сигнали, які роблять їх «схильними» до розвитку апоптозу, але не ініціюють його розвиток у цей момент [10]. важливим завданням для науковців є не тільки проведення їх оцінки відразу після розморожування, а й визначення відстроченого виживання клітин після перенесення до фізіологічних умов.

Виходячи з цього, **метою роботи** було оцінити ефективність кріоконсервування ЯВК КК, кріоконсервованих у захисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

Матеріали і методи досліджень. Виділену декстраном із М.в. 60 кДа фракцію ЯВК КК, обробляли 25%-м розчином ДМСО до кінцевих концентрацій в пробі 5, 7,5 і 10%. До кріозахисних середовищ також вносили антиоксиданти: аскорбінову кислоту (АК) в концентраціях 0,1 та 0,15 мМ; N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) – 10 та 15 мМ та глутатіон в концентраціях 1 та 3 мМ. Кріоконсервування проводили зі швидкістю 1–3 °С в хвилину до –80 °С, з наступним зануренням у рідкий азот на програмному заморожувачі Cryoson. Відтавання здійснювали при 37±40 °С на водяній бані при постійному

погойдуванні до зникнення твердої фази. Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва [4]. Життєздатність ЯВК оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом з використанням моноклонального антитіла CD45FITC і ДНК-барвника 7-аміноактіноміцина D (7AAD) методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur [9]. Кількість клітин із надлишковим вмістом АФК в клітинах визначали на проточному цитофлуориметрі за допомогою флуоресцентного зонду дихлородигідрофлуоресцеїн дیاцетату (DCFH₂-DA). Для моделювання трансфузії частину клітин після розморожування перенесли до розчину Хенкса й інкубували при 37°C протягом години. Розведення складало 1:10. Статистичну обробку результатів проводили методом Стюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft Office», США). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Оскільки ключовими ініціаторами та медіаторами холод-індукованого апоптозу можуть бути АФК, утворення яких, в силу різних причин, активізується під час кріоконсервування [6], найбільш перспективним напрямком їх елімінації може бути додавання до середовища кріоконсервування антиоксидантів. У роботі були використані глутатіон – головний антиоксидант клітини [5], N-ацетил-L-цистеїн (АЦ), який характеризується не тільки безпосередньою антиоксидантною активністю, але й бере участь у синтезі глутатіону та забезпеченні тіоловими групами цитоскелетні структури, тим самим зберігаючи клітини від руйнування [7] і аскорбінова кислота, яка в залежності від обраної концентрації може здійснювати як анти-, так і прооксидантний вплив на клітини [1].

Проведений аналіз результатів збереженості та життєздатності ЯВК, кріоконсервованих із ДМСО без додавання антиоксидантів показав, що най-

більш захищеними виявилися клітини, кріоконсервовані з ДМСО у концентрації 7,5% та 10%. За даних концентрацій, після часу інкубації в умовах, що моделюють фізіологічні, зниження показників збереженості та життєздатності було менш вираженим, хоча й достовірно нижчим на 15-20% порівняно з даними відразу після кріоконсервування. В пробі кріоконсервованій з ДМСО у концентрації 5% втрати абсолютної кількості клітин були значуще більшими (до 2 разів), ніж відразу після розморожування. При цьому, в даній пробі спостерігалось достовірне зниження кількості клітин із надлишковим вмістом АФК приблизно у 2 рази порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування. Це пов'язано з втратою значної кількості клітин, що співпадає з даними зі збереженості. Кількість DCF⁺-клітин після інкубації проб, кріоконсервованих із ДМСО в концентрації 7,5 та 10% залишалась на рівні результатів, отриманих одразу після розморожування.

Таким чином, перенесення деконсервованих клітин до умов, що моделюють фізіологічні викликає зниження збереженості та життєздатності ЯВК і чим менше оптимізоване кріозахисне середовище, тим ці зміни більш виражені. Однією з причин цього може бути накопичення активних форм кисню (АФК) під час кріоконсервування, ймовірно в силу інгібування антиоксидантної системи під час впливу фізико-хімічних стрес-факторів кріоконсервування [2]. У зв'язку з цим, доцільно було провести дослідження з оцінки ефективності внесення антиоксидантів у кріозахисні розчини з метою зменшення накопичення АФК і запобігання розвитку окисного стресу в клітинах після перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні.

Результати аналізу збереженості ЯВК КК, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО в поєднанні з аскорбіновою кислотою в концентрації 0,1 та 0,15 мМ (табл.) після годинної інкубації в

Таблиця – Кількість збережених та життєздатних ЯВК КК після кріоконсервування з ДМСО у різній концентрації та антиоксидантами і перенесення до умов, що моделюють фізіологічні

Антиоксиданти (мМ)		Збереженість			Життєздатність		
		Концентрація ДМСО, %					
		5	7,5	10	5	7,5	10
Контроль (без АО)		34,3 ± 1,2	51,6 ± 1,5	55,1 ± 1,2	46,4 ± 0,8	59,3 ± 2,2	55,6 ± 1,5
Аскорбінова кислота	0,1	44,0 ± 1,6*	59,7 ± 1,2*	61,3 ± 0,9*	50,5 ± 1,8*	62,8 ± 2,1*	56,6 ± 2,2
	0,15	42,8 ± 1,9*	61,7 ± 2,3*	61,9 ± 2,3*	52,9 ± 1,6*	65,2 ± 1,4*	53,0 ± 1,8
N-ацетил-L-цистеїн	10	49,6 ± 2,2*	68,8 ± 2,6*	70,3 ± 2,7*	52,0 ± 2,2*	60,6 ± 3,4	57,0 ± 4,6
	15	49,3 ± 3,6*	70,1 ± 2,8*	73,2 ± 3,3*	82,7 ± 2,9*	61,3 ± 2,4	57,5 ± 2,5
Глутатіон	1	63,4 ± 1,6*	79,0 ± 1,8*	75,0 ± 2,3*	60,0 ± 1,8*	75,9 ± 1,1*	68,6 ± 1,7*
	3	63,8 ± 1,9*	77,9 ± 1,4*	79,2 ± 1,4*	58,4 ± 2,1*	74,6 ± 1,3*	70,9 ± 1,2*

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи клітин, кріоконсервованої без внесення антиоксидантів; $p < 0,05$.

умовах, що моделюють фізіологічні показали, що найбільший рівень даного показника спостерігався в пробах із ДМСО в концентрації 7,5% та 10% (середній показник складав біля 60%). У даних експериментальних групах також спостерігалось деяке збільшення життєздатності на 4-6% у порівнянні з даними, отриманими без додавання антиоксидантів. Це може бути пов'язано напряду з антиоксидантним ефектом даної кислоти, який обумовлений тим, що АК перехоплює АФК і відновлює їх, не дозволяючи викликати пов'язані зі збільшенням їхнього рівня пошкодження клітин.

Визначення цитопротекторного ефекту N-ацетил-L-цистеїна на ЯВК КК після годинної інкубації в умовах, що моделюють фізіологічні, продемонструвало (табл.) підвищення рівня збереженості клітин в усіх експериментальних групах та, особливо, у пробах, кріоконсервованих із розчинами антиоксиданта в концентрації 10 та 15 мМ з 7,5 та 10% ДМСО (до 73,2%), в яких відзначалась найменша кількість клітин із надлишковим вмістом АФК. Даний цитопротекторний ефект можна пояснити не тільки антиоксидантною активністю АЦ завдяки SH-групам, але й тим, що він бере участь у синтезі глутатіона – основного антиоксиданту клітини.

Додавання даних концентрацій антиоксиданту до проб, кріоконсервованих із 5% також підвищувало рівень досліджуваного показника, проте ці дані були нижчі ніж у пробах із 7,5% та 10% ДМСО. Аналіз відсотка життєздатних CD45⁺-клітин виявив достовірні відмінності від контрольних значень тільки в групі з 5% ДМСО (табл.). В даній пробі спостерігалось збільшення кількості життєздатних клітин по відношенню до контрольних значень, до яких не було додано антиоксиданти.

Оскільки ключова роль у захисті клітин від оксидативного стресу відводиться системі глутатіону, наступним антиоксидантом, який було використано у нашій роботі, став глутатіон. Проведені дослідження показали (табл.), що даний антиоксидант сприяє збільшенню кількості збережених клітин до 75–79% в пробах із 7,5 та 10% ДМСО у комбінації з 1 та 3 мМ глутатіоном. У даних експериментальних групах було отримано до 60–75% життєздатних клітин, що на 14–16% більше порівняно з відповідними контрольними значеннями без додавання антиоксиданту. Це говорить про значний вклад глутатіону у захист клітин від пошкоджуючих факторів кріоконсервування.

На наступному етапі визначали кількість клітин із надлишковим вмістом

АФК після перенесення ЯВК, кріоконсервованих у розчинах із різною концентрацією ДМСО та антиоксидантами, до умов, що моделюють фізіологічні.

При інкубації кріоконсервованих ЯВК в розчинах, що містять ДМСО та АК, протягом години в умовах, що моделюють фізіологічні було виявлено збільшення кількості DCF⁺-клітин (рис.) у групах із 5 та 7,5% ДМСО на 6 та 14%, відповідно, порівняно з даними, отриманими без додавання антиоксидантів. Ми припускаємо, що це може бути пов'язано з тим, що в даних зразках аскорбінова кислота сприяє збільшенню кількості збережених клітин (табл.), що йдуть до аналізу, порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксидантів. У пробі з ДМСО в концентрації 10% аскорбінова кислота у застосованих концентраціях (0,1 м та 0,15 мМ) не змінювала кількість клітин із надлишковим вмістом АФК порівняно з відповідними пробами, до яких не вносили антиоксидант. У цих групах можна говорити лише про тенденцію до збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК. Ці дані можуть свідчити про те, що аскорбінова кислота має тимчасову антиоксидантну дію та не здатна попередити надмірне накопичення АФК в ЯВК КК після перенесення їх до фізіологічних умов, що може призвести до загибелі клітин та стати причиною зниження ефективності препарату ЯВК КК.

Позитивний вплив на клітини спостерігався в пробах, кріоконсервованих із ДМСО в концентрації 7,5 та 10% ДМСО та АЦ у концентрації 10 і 15 мМ, де дана комбінація кріопротектору та антиоксиданту сприяла зменшенню вмісту DCF⁺-клітин із 18,9%

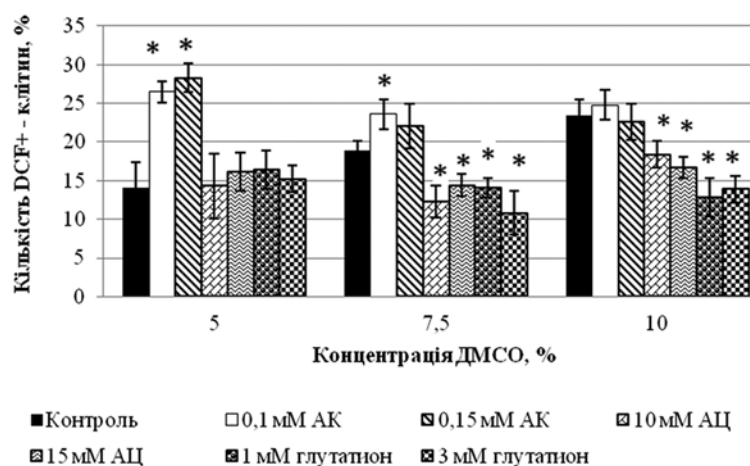


Рис. Кількість ядровмісних клітин кордової крові із надлишковим вмістом АФК після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО і антиоксидантів та перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта із рівнем $p < 0,05$.

у контролі без внесення антиоксиданта до 12,3% при 7,5% ДМСО та з 23,4% до 16,7% при 10% ДМСО, що підтверджує цитопротекторні властивості даної речовини.

Кріоконсервування ЯВК у розчинах, що містять глутатіон (рис.) сприяло зниженню DCF⁺-клітин в усіх експериментальних групах, окрім 5% ДМСО, де відбулась значна руйнація клітин, про що свідчать дані зі збереженості та життєздатності. Проте кріоконсервування CD45⁺-клітин із додаванням глутатіону в кінцевій концентрації 1 та 3 мМ і ДМСО в концентрації 7,5 та 10% сприяло достовірному зниженню CD45⁺DCF⁺-клітин приблизно на 7 та 11%. Комбінація ДМСО в концентрації 7,5% та ефективних концентрацій глутатіону (1 та 3 мМ) сприяла зниженню кількості клітин із надлишковим вмістом АФК з 19% у контролі до 11% навіть після перенесенні до умов, що моделюють фізіологічні, що говорить про виражені антиоксидантні властивості даної речовини.

Висновки

1. Інкубація протягом години деконсервованих ЯВК в умовах, що моделюють фізіологічні, призводить до зниження показників збереженості й життєздатності порівняно з даними, отриманими одразу після кріоконсервування. Тобто, стан клітин, визначений одразу після розморожуван-

ня не може дати повну оцінку якості препаратів кордової крові.

2. Кріоконсервування ЯВК з ДМСО в концентрації 7,5 та 10% з додаванням аскорбінової кислоти в концентрації 0,1 та 0,15 мМ та подальше перенесення до умов, що моделюють фізіологічні, продемонструвало достовірне підвищення як загальної кількості збережених клітин, так і числа життєздатних до 65%. Проте збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК свідчить про подальший розвиток окисного стресу в клітинах, який призведе до додаткової втрати клітин.
3. Глутатіон та АЦ забезпечували виражене зниження кількості клітин із надлишковим вмістом АФК та достовірне підвищення збереженості та життєздатності. Найбільший цитопротекторний ефект мав глутатіон, який сприяв підвищенню рівня збереженості та життєздатності ЯВК КК до 75%.

Перспективи подальших досліджень. Оскільки надлишкове накопичення АФК в клітинах здатне привести до подальшої загибелі клітин шляхом апоптозу або некрозу, доцільно було б провести дослідження з впливу антиоксидантів на кількість клітин які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування з ДМСО та перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні.

References

1. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1569 (1-3): 1-9. PMID: 11853951. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00235-5)
2. Babijchuk LA, Makashova OYe, Zubov PM, Zubova OL. Estimation of antioxidant properties of N-acetyl-L-cysteine during cord blood cryopreservation with DMSO. *Cell Biology*. 2015; 78.
3. Ballen K, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 122: 491–8. PMID: PMC3952633. doi: 10.1182/blood-2013-02-453175
4. Davis JM. *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. Oxford University Press; 2002. 382 p.
5. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*. 2003; 17: 64–6. PMID: 12424221. DOI: 10.1096/fj.02-0105fje
6. Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*. 2002; 84 (2-3): 131–41. PMID: 12022944. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01369-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01369-X)
7. Linping Hu, Hui Cheng, Yingdai Gao, Ming Shi, Yanfeng Liu, Zheng Hu, Jing Xu, Lugui Qiu, et al. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood*. 2014; 124 (20): 45–8. PMID: PMC4231425. doi: 10.1182/blood-2014-03-559369
8. Kim KM, Huh JY, Hong SS, Kang MS. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion*. 2015; 55 (8): 2017–22. PMID: 25858170. DOI: 10.1111/trf.13120
9. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992; 13: 204–8. PMID: 1547670. DOI: 10.1002/cyto.990130216
10. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *J Amer Soc Exper Neuro Therapeutics*. 2004; 1: 5–16. PMID: PMC534908. doi: 10.1602/neurorx.1.1.5

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ПЕРЕНОСА ИХ В УСЛОВИЯ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ

Макашова Е. Е., Zubova O. L., Zubov P. M., Михайлова О. А., Бабийчук Л. А.

Резюме. В работе проведен сравнительный анализ эффективности криопротекторных смесей, содержащих различные концентрации проникающего криопротектора ДМСО и антиоксидантов, при криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови и после переноса их в условия, моделирую-

щие физиологические. Показано, что добавление в криозащитную среду аскорбиновой кислоты, N-ацетил-L-цистеина или глутатиона способствует снижению количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода и повышению показателей сохранности и жизнеспособности ядродержащих клеток после переноса их в условия, моделирующие физиологические. Наибольший цитопротекторный эффект наблюдается в пробах, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО с добавлением глутатиона в концентрации 1 и 3 мМ, где сохраняется 75% ядродержащих клеток в жизнеспособном состоянии, по сравнению с двумя другими антиоксидантами в оптимальных концентрациях, которые обеспечивают жизнеспособность только до 65% клеток.

Ключевые слова: ядродержащие клетки кордовой крови, криоконсервирование, диметилсульфоксид, активные формы кислорода, аскорбиновая кислота, N-ацетил-L-цистеин, глутатион.

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

The Effect of Antioxidants on the State of Cryopreserved Human Cord Blood Nucleated Cells after Transferring them to Conditions Close to Physiological

Makashova O. Ye., Zubova O. L., Zubov P. M., Mykhailova O. O., Babijchuk L. A.

Abstract. The use of cord blood (CB) hematopoietic progenitor cells for the past 15 years has been firmly established in practical medicine as an effective treatment for diseases of various origins. In this regard, it remains relevant for developing the protocols for cells storage at low temperature. Most of them are based on the use of penetrating cryoprotectant DMSO in effective concentrations. However, they do not take into account the fact that during cryopreservation cord blood nucleated cells are subjected to a significant stress, resulting in the accumulation of high concentration of reactive oxygen species (ROS). The literature analysis evidences that ROS can initiate the development of apoptosis and cell death both before and after cryopreservation. Therefore, the addition of antioxidants to the cryoprotective medium can improve the preservation rate and viability of cord blood nucleated cells both immediately after cryopreservation and after transferring them to conditions close to physiological.

There are assumptions that in the process of cryopreservation cells are subjected of certain signals that make them "susceptible" to the development of apoptosis, but not initiate its development at this moment. Therefore, an important task for scientists is not only to conduct their evaluation immediately after thawing, but also to determine the delayed survival of cells after transferring them to conditions close to physiological. Based on this, *the purpose of the work* was to evaluate the effectiveness of cryopreservation of cord blood nucleated cells (CBNCs) that were cryopreserved in protective solutions containing various concentrations of DMSO and antioxidants after transferring to conditions close to physiological.

The efficacy of application of ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine and glutathione in combination with DMSO in cryopreservation of CBNCs has been evaluated. It has been shown that in the process of cryopreservation with DMSO and after transferring to conditions that are close to physiological, the preservation and viability of CBNCs decreased. One of the reasons for this may be the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells during freezing. The addition of antioxidants to the cryoprotective medium can significantly increase the stability of the CBNCs against the effects of cryopreservation factors and improve the preservation and viability indices. A comparative analysis of antioxidants revealed that ascorbic acid at concentrations of 0.1 and 0.15 mM and N-acetyl-L-cysteine (10 and 15 mM) in combination with 7.5% and 10% DMSO increased the number of preserved viable CBNCs up to 65% in comparison to the samples without adding these antioxidants. Addition of glutathione at a concentration of 1 and 3 mM to cryoprotective medium with 7.5% and 10% DMSO was able to maintain a viable state of up to 75% of the CBNCs. This may be due to the fact that glutathione and acetylcysteine reduced the number of cells with excess content of ROS after transferring the cells to conditions close to physiological.

Keywords: cord blood nucleated cells, cryopreservation, dimethyl sulfoxide, reactive oxygen species, ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine, glutathione.

Стаття надійшла 12.01.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування