

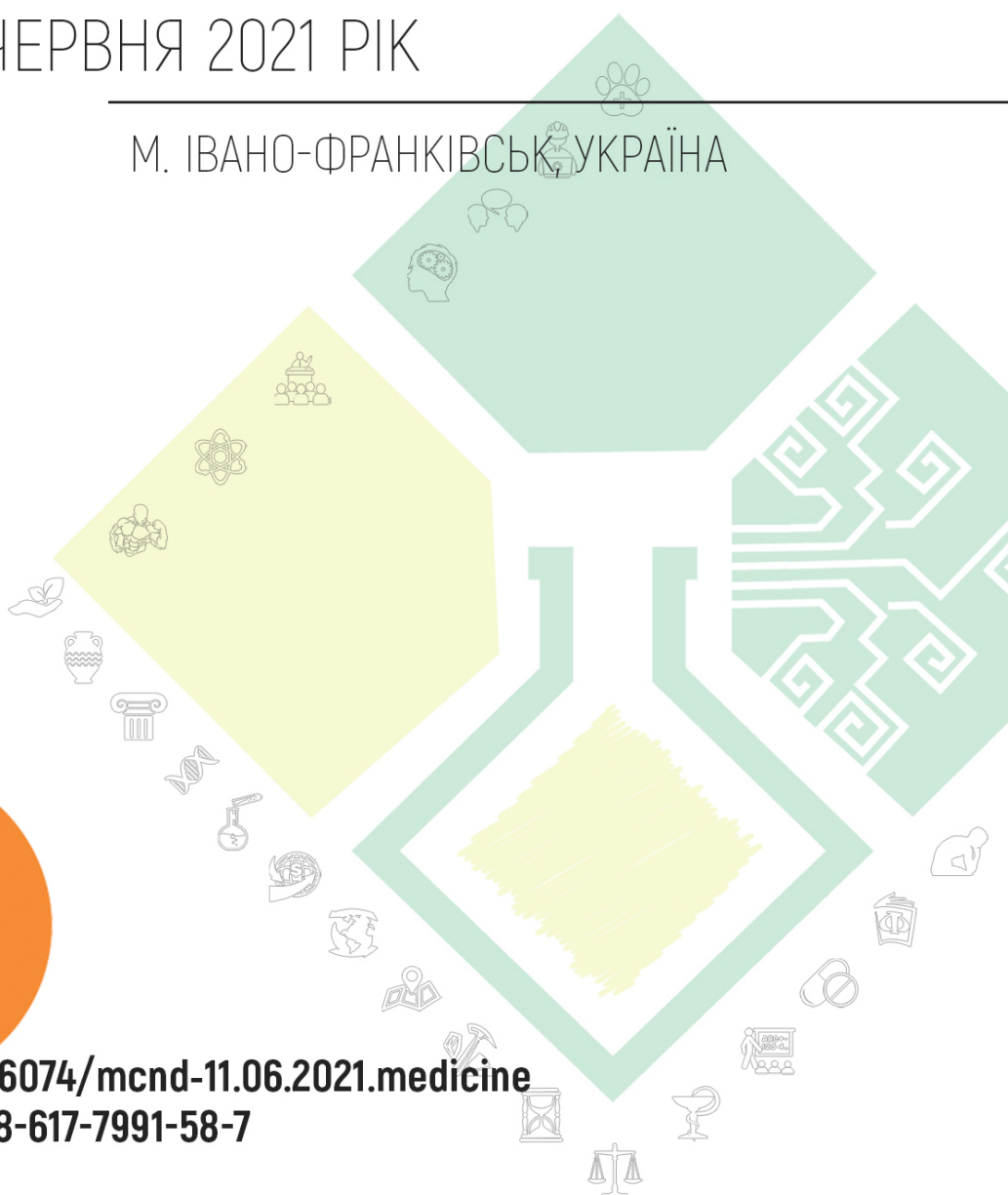
БІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА МЕДИЦИНА ХХІ: СУЧАСНИЙ СТАН, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

І 11 ЧЕРВНЯ 2021 РІК

М. ІВАНО-ФРАНКІВСЬК, УКРАЇНА



DOI 10.36074/mcnd-11.06.2021.medicine
ISBN 978-617-7991-58-7



СЕКЦІЯ VI.
НАНОМЕДИЦИНА, БІОТЕХНОЛОГІЇ,
БІОМЕДИЧНА ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ

ВПЛИВ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ НА КІЛЬКІСТЬ
ЖИТТЄЗДАТНИХ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ
КРОВІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ З ДМСО ТА
ГЛУТАТІОНОМ

НАУКОВО-ДОСЛІДНА ГРУПА:

Бабійчук Любов Олександрівна

д-р. біол. наук, професор, зав. відділом кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Зубов Павло Михайлович

канд. біол. наук, с.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Макашова Олена Євгенівна

канд. біол. наук, м.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Зубова Оксана Леонідівна

канд. біол. наук, с.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Рязанцев Володимир Васильович

канд. біол. наук, с.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Вступ. Якість препаратів кордової крові (КК) залежить від багатьох чинників: об'єму отриманої з пуповини КК, правильної її підготовки до заморожування, виділення ядровмісних клітин, а також вибору ефективних кріопротекторів та оптимальних режимів кріоконсервування. Саме двом останнім факторам науковці приділяють особливу увагу, оскільки під час кріоконсервування відбувається зміщення прооксидант-антиоксидантної рівноваги в бік збільшення рівня активних форм кисню (АФК), у результаті чого може відбуватися порушення енергетичного стану та пошкодження мембран клітин через перекисне окислення ліпідів, а також пошкодження ДНК [1]. І чим більш не оптимізована технологія кріоконсервування, тим ці прояви значніші. Оскільки ключова роль у захисті клітин від окисного стресу відводиться системі глутатіону, яка нейтралізує перекиси ліпідів і підтримує у відновленому стані SH-групи білків, доцільним може бути додавання екзогенного глутатіону до кріозахисного середовища [2]. До того ж існують дані, що кріоконсервування призводить до збіднення відновленого глутатіону в мітохондріях через дефектне функціонування носія, відповідального за перенесення його з цитоплазми до мітохондріального матриксу [3]. Тому метою даної роботи було визначити кількість ядровмісних клітин (ЯВК) із надлишковим вмістом АФК та оцінити вплив АФК на кількість життєздатних ЯВК КК після кріоконсервування з ДМСО та антиоксидантом глутатіоном.

Матеріали досліджень. У роботі використовували КК людини, збір якої проводили після отримання інформованої згоди у вагітної, з попереднім проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біофарма», Україна) з молекулярною вагою 60000). У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій у зразку 5; 7,5 та 10%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за температури 0...4°C крапельним шляхом при постійному перемішуванні. У роботі використовували глутатіон (GSH) («Sigma-Aldrich», США) у кінцевій концентрації 1 та 3 мМ, який перед кріоконсервуванням вносили в зразки. Проби кріоконсервували у заморожувачі «Cryoson» (Німеччина) зі швидкістю 1 град/хв до -80°C із наступним зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснювали за температури 37-40°C на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази. Для оцінки кількості CD45⁺-клітин використовували

стандартний ISHAGE протокол. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur фірми Becton Dickinson («BD», США). Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми «BD» – «CELLQuest Pro». Для визначення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК (DCF⁺- клітини) використовували високоспецифічний барвник дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCFH₂-DA) («Sigma-Aldrich») [4]. Вимірювання проводили методом проточної цитофлуориметрії. Оцінку стадій апоптозу ЯВК проводили з одночасним внесенням до зразків маркерів Annexin V FITC, CD45 PE і 7-AAD.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft», США) після встановлення нормальності розподілу. Дані представлені як $M \pm m$. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати досліджень.

Аналіз отриманих результатів показав, що процес заморожування-відігрівання ЯВК КК призводив до збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК, порівняно з даними, отриманими до кріоконсервування, в усіх експериментальних зразках. Проте, значущі відмінності спостерігалися в групах з 5 та 7,5% ДМСО. Так, високий рівень АФК спостерігався в клітинах, кріоконсервованих під захистом 5% ДМСО ($29,5 \pm 4,7\%$), що, ймовірно, пов'язано з недостатньою кількістю кріопротектора. В той час як найменша кількість DCF⁺-клітин була отримана після кріоконсервування ЯВК із 7,5 ($20,6 \pm 3,2\%$) та 10% ($21,2 \pm 1,9\%$) ДМСО.

Додавання до кріозахисного середовища глутатіону та подальше кріоконсервування сприяло достовірному зниженню кількості клітин із надлишковим вмістом АФК в усіх експериментальних групах порівняно зі зразками, до яких не було додано антиоксидант. Найменша кількість DCF⁺-клітин була отримана після кріоконсервування ЯВК із 7,5% ДМСО та 1 або 3 мМ глутатіону. Даний кріоконсервант попереджав утворення надлишкової кількості АФК в клітинах та сприяв зниженню кількості DCF⁺-клітин на 13% порівняно з контрольними значеннями і таким чином запобігав розвитку окисного стресу.

Аналіз кількості клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування з ДМСО показав, що після розморожування до 30% ЯВК мали структурні порушення. При цьому

незалежно від концентрації кріопротектора, велика їх частина характеризувалася пошкодженням цілісності мембрани (при збереженні впорядкованості ліпідів) та фрагментацією ДНК в ядрі, що характерно для клітин, які перебувають на стадії некрозу (AnnexinV-7AAD⁺). Тобто в процесі заморожування-відігрівання основні втрати клітин відбуваються в результаті прямого впливу пошкоджуючих фізичних та/або хімічних факторів, на які клітини не можуть або ж не встигають відреагувати за допомогою своїх захисних систем. Слід зазначити, що найбільша кількість AnnexinV-/7AAD⁺-клітин була в зразках, кріоконсервованих із 5% ДМСО, а найнижча – з 7,5% ДМСО. Таким чином, отримані результати демонструють, що чим більш незбалансований чи неадаптований спосіб кріоконсервування застосовується для ЯВК, тим буде більше некротичних клітин.

Аналізуючи результати з дослідження кількості клітин, які перебували на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та глутатіону (табл. 1), можна відзначити зниження кількості клітин із дезорганізованою мембраною (AnnexinV-/7AAD⁺) в усіх групах.

Таблиця 1

Кількість клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації, %

Конц. ДМСО, %	Конц. GSH, мМ	Стадії апоптозу	
		AnnexinV-/7AAD ⁻ клітини	AnnexinV-/7AAD ⁺ клітини
5	Контроль	70,4±3,8	23,5±2,9
	1	75,3±2,1	18,1±1,5*
	3	76,0±2,3	17,9±2,0*
7,5	Контроль	72,7±2,1	16,2±2,7
	1	83,5±2,5*	8,2±1,3*
	3	84,7±3,2*	6,7±1,1*
10	Контроль	70,8±3,8	19,9±2,4
	1	79,0±2,1*	11,6±2,8*
	3	80,1±3,2*	9,3±3,1*

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

У зразках, кріоконсервованих із ДМСО у концентрації 7,5% та глутатіоном у концентраціях 1 або 3 мМ, кількість даних клітин була значуще нижчою у 2 та 2,5 рази, відповідно, порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксиданту та складала $8,2 \pm 1,3$ та $6,7 \pm 1,1\%$, відповідно.

Результати, отримані під час оцінки кількості неушкоджених клітин (AnnexinV-/7AAD-) показали, що додавання глутатіону у концентрації 1 або 3 мМ до кріозахисного середовища з 7,5% ДМСО дозволяло зберігати до 84,7% життєздатних ЯВК після кріоконсервування, а при додаванні до кріозахисного середовища з 10% ДМСО – до 80,1%.

Підсумовуючи усе вищезазначене, можна зробити висновок, що процес кріоконсервування клітин супроводжується збільшенням кількості клітин із надлишковим вмістом АФК, що призводить до росту кількості пошкоджених та загиблих клітин. Додавання до кріозахисного середовища антиоксиданту глутатіон сприяє збереженню функціональної повноцінності клітин за рахунок зменшення кількості вільних радикалів, які накопичуються під час кріоконсервування.

Список використаних джерел:

1. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 373–399.
2. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology / N. Ballatori et al. *Mol Aspects Med.* 2009. Vol. 30, № 1-2. P. 13–28.
3. Reduced glutathione addition improves both the kinematics and physiological quality of post-thawed red deer sperm / L. Anel-López et al. *Anim Reprod Sci.* 2015. Vol. 162. P. 73–79.
4. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy / X. Chen. *Free Radic Res.* 2010. Vol. 44, № 6. P. 587–604.