

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

МАКАШОВА ОЛЕНА ЄВГЕНІВНА

УДК: 611.018.5:618.48:57.086.13:547.569.2:678.048

**ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА СТАН ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН
КОРДОВОЇ КРОВІ ПІД ЧАС КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З
КРІОПРОТЕКТОРОМ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бабійчук Любов Олександрівна,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
завідувач відділу кріоцитології.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Малова Наталія Георгіївна,
Державна установа «Інститут проблем ендокринної
патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків
завідувач лабораторією фармакології;

кандидат біологічних наук, доцент
Денисова Ольга Миколаївна,
Харківська державна зооветеринарна академія
України,
доцент кафедри хімії та біохімії імені професора
О. В. Чечоткіна.

Захист відбудеться « 3 » липня 2018 року о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий « 1 » червня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради.....О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Застосування гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) міцно увійшло в практичну медицину розвинутих країн світу, як ефективний метод лікування різних патологій (Burt R. K., 2008; Ballen K. K., 2010; Цуцаева А. А., 2001). На сьогоднішній день одним із джерел для отримання ГПК є кордова кров (КК) людини. Завдяки її унікальним властивостям, відносній простоті та безпеці заготівлі, КК стала одним із найбільш затребуваних джерел ГПК (Rocha V., 2009; Гольцев А. Н., 1998). Підвищення частоти застосування КК в клінічній практиці зумовили необхідність створення її запасів і тривалого зберігання. Розрив у часі між моментом заготівлі КК і введенням її в організм реципієнта визначає необхідність застосування технологій кріоконсервування. Найбільш широко для кріоконсервування ядровмісних клітин (ЯВК) КК використовується проникаючий кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) у концентраціях 7,5÷10% (Hunt C. J., 2003). Проте окрім цитопротекторного впливу, ДМСО має й токсичну дію, що може проявлятися збільшенням кількості активних форм кисню (АФК) в клітинах, викликаючи порушення енергетичного стану, пошкодженням структурних елементів через перекисне окислення ліпідів, а також пошкодженням ДНК, призводячи до апоптозу або некрозу клітин (Paasch U., 2004; Xia Xu, 2010). Слід відзначити, що апоптоз, викликаний кріоконсервуванням, може розвиватися в клітинах не відразу після розморожування, а через деякий проміжок часу, що значно ускладнює визначення реальної кількості функціонально активних клітин. Виходячи з цього, перспективним напрямком може бути додавання до середовища кріоконсервування антиоксидантів (АО), які були б здатні «перехоплювати» вільні радикали та знижувати інтенсивність вільнорадикального окислення на всіх стадіях заморожування-відігрівання. Одними з таких АО є глутатіон (GSH) (Pastore A., 2003), N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) (Rushworth G. F., 2014) і аскорбінова кислота (АК) (Harrison F. E., 2009).

У зв'язку з цим виникає необхідність проведення фундаментальних досліджень з вивчення збереженості, життєздатності, кількості клітин із надлишковим вмістом АФК та шляхів розвитку апоптозу, викликаних технологічним процесом кріоконсервування з метою покращення результатів кріоконсервування та забезпечення довгострокової виживаності ядровмісних, у тому числі й гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота виконана в рамках відомчих НДР відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України № 47: «Вивчення механізмів структурно-функціональних змін ядровмісних клітин кордової крові і еритроцитів під впливом екзо- і ендоцелюлярних кріопротекторів та низьких температур» (шифр – 2.2.6.47, № державної реєстрації 0109U00278); № 90: «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровмісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур»(шифр – 2.2.6.90, № державної реєстрації 0114U001320).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було визначення збереженості, життєздатності та кількості ядровмісних клітин кордової крові

людини із надлишковим вмістом активних форм кисню, а також вивчення розвитку їх апоптозу під час кріоконсервування в розчинах, які містять ДМСО та речовини з антиоксидантними властивостями.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання:

1. Визначити збереженість та життєздатність ЯВК, у тому числі ГПК КК, до та після кріоконсервування в розчинах, які містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів.

2. Методом проточної цитофлуориметрії визначити кількість клітин із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування в розчинах, які містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів.

3. Оцінити збереженість, життєздатність та кількість клітин із надлишковим вмістом АФК, кріоконсервованих в розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні.

4. Провести оцінку стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК, у тому числі ГПК, після заморожування-відігріву, а також після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні.

5. Розробити методичні підходи для підвищення збереженості та довгострокової життєздатності ЯВК КК, у тому числі ГПК, після розморожування.

Об'єкт дослідження – вплив ендоцелюлярного кріопротектору ДМСО та різних антиоксидантів (глутатіон, N-ацетил-L-цистеїн та аскорбінова кислота) і низьких температур на структурно-функціональні властивості ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові людини.

Предмет дослідження – стан ядровмісних клітин кордової крові людини, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, до та після кріоконсервування, а також після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні.

Методи дослідження. У роботі були використані наступні методи досліджень: світлова мікроскопія; проточна цитофлуориметрія з використанням флуоресцентномічених моноклональних антитіл (CD45 FITC/CD34 PE, CD45 PE) та барвників (7AAD, Annexin V FITC, DCFH₂-DA); виділення ядровмісних клітин кордової крові за допомогою поліглюкіну; кріоконсервування. За допомогою статистичних методів проведено аналіз отриманих експериментальних даних.

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше встановлено, що внесення до середовища кріоконсервування, яке містить ДМСО, антиоксидантів АК, АЦ або глутатіону, дозволяє значно підвищити кількість життєздатних клітин КК після розморожування. Зокрема, вперше показано, що додавання АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ, АЦ – 10 та 15 мМ та глутатіону – 1 та 3 мМ до кріозахисних середовищ є найбільш ефективним. Виявлено, що внесення ефективних концентрацій АЦ та глутатіону до зразків із різним вмістом ДМСО на етапі обробки кріопротектором сприяє зменшенню негативного впливу факторів кріоконсервування на ЯВК КК, у тому числі ГПК, що виражається в зниженні кількості клітин із надлишковим вмістом АФК і, відповідно, підвищенні їх збереженості та життєздатності після розморожування та, особливо, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. При вивченні стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК вперше встановлено, що додавання АО в ефективних концентраціях дозволяє зберігати до 84,7% неушкоджених ЯВК після

розморожування, і до 77,7% при їх перенесенні до умов, які моделюють фізіологічні, в той час як у зразках, кріоконсервованих без додавання АО, отримано 72,7 та 58,1% AnnexinV/7AAD⁺клітин, відповідно. При цьому найбільш виражений ефект спостерігається в зразках, кріоконсервованих із глутатіоном. Вперше показано, що використання АО в ефективних концентраціях під час кріоконсервування ЯВК КК, у тому числі ГПК, дозволяє знизити ефективну концентрацію ДМСО до 5%, що забезпечує зменшення токсичного ефекту на клітини, та при цьому отримати збереженість та життєздатність на рівні зразків, кріоконсервованих з 7,5 та 10% ДМСО без застосування АО.

Практичне значення отриманих результатів. Проведене в процесі дослідження комплексне вивчення стану ЯВК КК, у тому числі ГПК, дозволило розробити метод кріоконсервування даних клітин із додаванням до кріозахисного середовища АО, який забезпечує підвищення збереженості та життєздатності клітин КК після розморожування та, особливо, після перенесення до умов, наближених до фізіологічних. Отримані результати досліджень захищені Патентом України (№ 108501) і мають велике науково-практичне значення в аспекті створення запасів ЯВК КК, у тому числі ГПК, для довгострокового зберігання з метою подальшого клінічного застосування. Результати роботи можуть бути рекомендовані для розробки нових і вдосконалення існуючих технологій кріоконсервування клітинних суспензій, а також – у навчальному процесі при читанні курсів лекцій та під час проведення практичних занять студентам вищих навчальних закладів біологічного та медичного профілю.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням, основні результати якого отримані безпосередньо здобувачем. Автором було проведене патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, спільно із керівником визначені мета та завдання роботи, а також способи їхнього вирішення. Здобувачем особисто одержані експериментальні дані в усіх розділах досліджень, проведені їхня статистична обробка та первинний аналіз, зроблені попередні висновки. Спільно з науковим керівником здійснена інтерпретація отриманих результатів і сформульовані остаточні висновки. У наукових працях відображені результати спільного планування, проведення експериментів та обговорення результатів.

У опублікованих спільно зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

– у роботах [3, 14, 16] – у вивченні впливу різних концентрацій кріопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування;

– у роботах [4, 10, 13, 15, 25, 28] – у вивченні впливу АК на збереженість, життєздатність та кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування з ДМСО;

– у роботах [1, 2, 4, 7, 9, 11, 12, 18, 19, 22, 23, 28] – у вивченні впливу АЦ на збереженість, життєздатність та кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування з ДМСО;

– у роботах [4, 8, 24, 26, 28] – у проведенні досліджень з вивчення впливу глутатіону на стан ЯВК КК до та після кріоконсервування з ДМСО;

– у роботах [2, 5, 6, 20, 28, 30] – у вивченні впливу кріоконсервування в захисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та АО на стан ЯВК КК після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні;

– у роботах [16, 17, 21, 27, 29, 30] – у вивченні кількості ЯВК КК, що перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування з ДМСО та антиоксидантами та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на науково-практичних конференціях з міжнародною участю: «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє» (Київ, 2014); «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» (Росія, Пушино, 2014); «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (Росія-Україна, Сиктивкар, 2014); «Актуальные вопросы трансфизиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Росія, Кіров, 2015, 2017); «Advances in Cell Biology and Biotechnology» (Львів, 2015); X-й Parnas конференції молодих вчених «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine» (Польща, Вроцлав, 2016); «SLTB Symposium 2016» (Німеччина, Дрезден, 2016), «Cold Applications in Life Sciences» (Німеччина, Дрезден, 2016); конференції молодих вчених «CYS-2015» (Київ, 2015); LXXI міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017» (Республіка Білорусь, Мінськ, 2017); 40-й та 41-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині» (Харків, 2016, 2017); XI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2017); IV міжнародній конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, 2017) та інших.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 30 наукових праць, серед них 6 статей у наукових фахових виданнях України (1 – входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 5 – у зарубіжних збірниках матеріалів конференцій (1 – входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 1 – у збірнику наукової конференції України, 1 – патент на корисну модель та 17 тез доповідей на конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 240 сторінках (з яких 156 сторінок основної частини) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень і їх обговорення, узагальнення, висновків, списку літератури та 2-х додатків. Список літератури містить 352 джерела, у тому числі 291 зарубіжних, розміщених на 43 сторінках тексту. Робота ілюстрована 21 таблицею та 46 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз літературних даних, які стосуються сучасного стану проблеми кріоконсервування ЯВК КК та ролі окисного стресу в розвитку їхнього кріоушкодження та загибелі шляхом апоптозу або некрозу. Розкрито основні механізми впливу антиоксидантів на попередження розвитку окисного стресу в клітинах під час кріоконсервування. На підставі результатів аналізу літературних даних доведено актуальність і перспективність застосування антиоксидантів під час кріоконсервування ЯВК КК.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження виконані на КК людини, заготовленої на консерванті "Глюгіцир" після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі згідно до вимог комісії з біоетики ІПКіК НАН України.

Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біофарма», Україна) з молекулярною масою 60 000) (Kernan N. A., 1993, Broxmeyer H. E., 1992) у співвідношенні 1:1.

Обробку ЯВК ДМСО здійснювали шляхом крапельного внесення в клітинну суспензію 25%-го розчину ДМСО, приготованого на 6% розчині поліглюкіну, до кінцевих концентрацій в зразку 2,5; 5; 7,5; 10 та 15%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за низької позитивної температури (0-4°C). Час еквілібрації з ДМСО становив 30 хв.

У роботі застосовували антиоксиданти фірми «Sigma-Aldrich» (США) в наступних кінцевих концентраціях: АК – 0,05; 0,1; 0,15 та 0,2 мМ; АЦ – 5; 10; 15 та 30 мМ; глутатіон – 0,5; 1; 3 та 5 мМ. Розчини АО готували на фізіологічному розчині. Після обробки концентратів клітин відповідною концентрацією ДМСО до суспензії клітин додавали АО та заморожували.

Кріоконсервування ЯВК КК проводили на програмному заморожувачі Cryoson (Німеччина) зі швидкістю 1-3°C у хвилину до -80°C, з наступним зануренням до рідкого азоту (Абдулкадіров К.М., 2006). Зразки відтаювали при 37÷40°C на водяній бані при постійному погодюванні.

Визначення збереженості ЯВК. Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою (Davis J. M., 2002). Збереженість клітин визначали як відсоток кількості клітин у досліджуваному зразку по відношенню до початкової їх кількості до будь-якого впливу. Абсолютну кількість ГПК в зразках визначали як добуток абсолютної кількості ЯВК на відсоток ГПК, визначений методом проточної цитофлуориметрії. Збереженість ГПК визначали за тією ж формулою, що і для ЯВК.

Імунофенотипування та визначення життєздатності ЯВК (CD45⁺) і ГПК (CD34⁺) проводили за допомогою проточного цитофлуориметра «FACS Calibur» фірми «BD» (США), з використанням реагентів «BD» за міжнародним ISHAGE протоколом (Schmid I. et al., 1992).

Визначення виходу життєздатних ядровмісних (CD45⁺-) та гемопоетичних прогеніторних (CD34⁺) клітин після кріоконсервування та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні проводили за формулою:

$$\text{Вихід життєздатних клітин після кріоконсервування, \%} = \frac{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин після кріоконсервування}}{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин до кріоконсервування}} \times 100\%$$

$$\text{Вихід життєздатних клітин після моделювання трансфузії, \%} = \frac{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин після моделювання трансфузії}}{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин після кріоконсервування}} \times 100\%$$

Визначення кількості ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК проводили з використанням флуоресцентного зонду дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату (DCFH₂-DA) («Sigma-Aldrich», США) методом проточної цитофлуориметрії.

Визначення стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК проводили за допомогою проточного цитофлуориметра з одночасним використанням AnnexinV FITC і 7-AAD (7-аміноактіноміцин D) (Koopman G., 1994, Vermes I., 1995).

Результати вимірів на цитофлуориметрі аналізували за допомогою програмного забезпечення фірми BD – «CELLQuest Pro».

Перенесення деконсервованих ЯВК КК до умов, які моделюють фізіологічні. Частину клітин після розморожування переносили до розчину Хенкса з підтриманням температури інкубації (37°C) (Scott K. L., 2005) протягом години. По завершенню інкубації проводили центрифугування при 1000 об/хв (800g) протягом 5 хв з подальшим видаленням супернатанту. Після цього визначали збереженість, життєздатність, вміст АФК у клітинах методом проточної цитофлуориметрії та вихід життєздатних клітин по відношенню до початкового їх рівня після кріоконсервування.

Отримані результати статистично обробляли за методом Стюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft Office», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка збереженості, життєздатності та кількості ЯВК, у тому числі ГПК, КК із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування з ДМСО та АО в різних концентраціях. Проведена оцінка впливу різних концентрацій ДМСО на збереженість та життєздатність ЯВК/ГПК КК на етапі еквілібрації з кріопротектором показала, що при збільшенні концентрації ДМСО (від 2,5 до 15%) відбувається зниження збереженості, як CD45⁺, так і CD34⁺- клітин КК, при цьому життєздатність (за 7-AAD) у різних експериментальних групах значуще не відрізнялася (рис. 1).

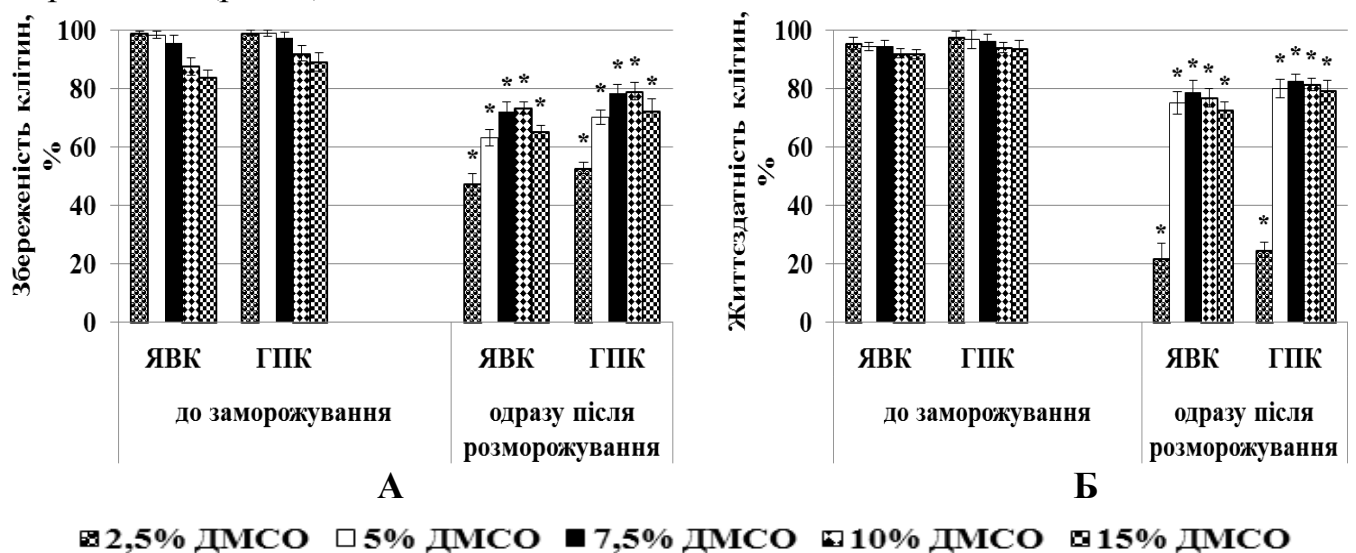


Рис. 1. Збереженість (А) та життєздатність (Б) ЯВК та ГПК КК до та після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від відповідної групи клітин до кріоконсервування ($p < 0,05$).

Крім втрати кількості клітин, яка спостерігається вже на етапі виділення та еквілібрації з ДМСО, процес кріоконсервування здатний викликати порушення структурно-функціональних властивостей CD45⁺, у тому числі CD34⁺-клітин, що в

подальшому може призвести до їх пошкодження та загибелі. Аналіз збереженості та життєздатності ЯВК/ГПК показав (рис. 1), що після кріоконсервування з ДМСО відбувається зниження даних показників. І чим менше оптимізоване кріозахисне середовище (2,5; 5 або 15% ДМСО), тим ці зміни більш виражені.

Однією з причин цього можуть бути АФК, які накопичуються в клітинах під час заморожування (Kim K. M., 2015). Тому визначення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК може бути одним із важливих параметрів оцінки стану ЯВК при кріоконсервуванні (Thannickal V. J., 2000).

Проведені дослідження з визначення кількості ЯВК із надлишковим вмістом АФК (рис. 2) показали, що інкубація клітин із ДМСО викликала збільшення кількості DCF⁺-клітин в усіх зразках у 2-5 разів (в залежності від концентрації ДМСО) порівняно з даними, отриманими після виділення поліглюкіном із цільної КК (5,2%). При цьому збільшення концентрації ДМСО до 10-15% підвищувало відсоток CD45⁺DCF⁺-клітин, що вказує на розвиток окисного стресу та/або пригнічення антиоксидантних систем, які нейтралізують вільні радикали.

Кріоконсервування ЯВК викликало збільшення кількості DCF⁺-клітин на 2-18% порівняно з даними, отриманими до заморожування. Мінімальна кількість клітин із надлишковим вмістом АФК була в зразках, кріоконсервованих із 7,5 і 10% ДМСО, де рівень збереженості та життєздатності був найвищий. Низький відсоток DCF⁺-клітин у зразках із 2,5% ДМСО можна пояснити значною руйнацією клітин. При цьому максимальна кількість DCF⁺-клітин була в зразках, кріоконсервованих із 5 та 15% ДМСО.

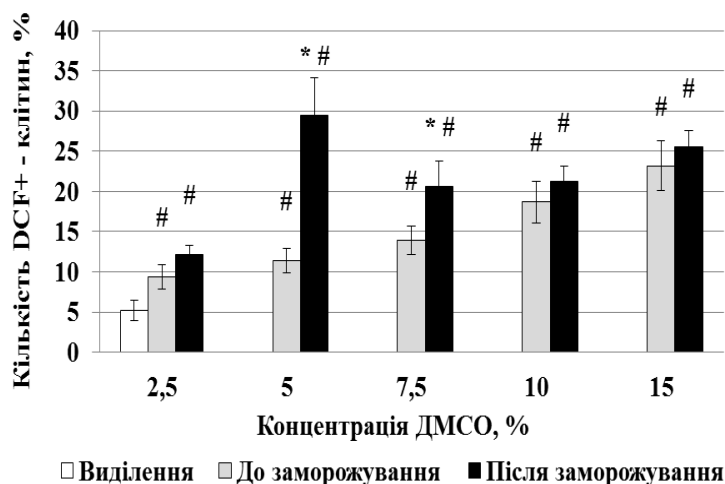


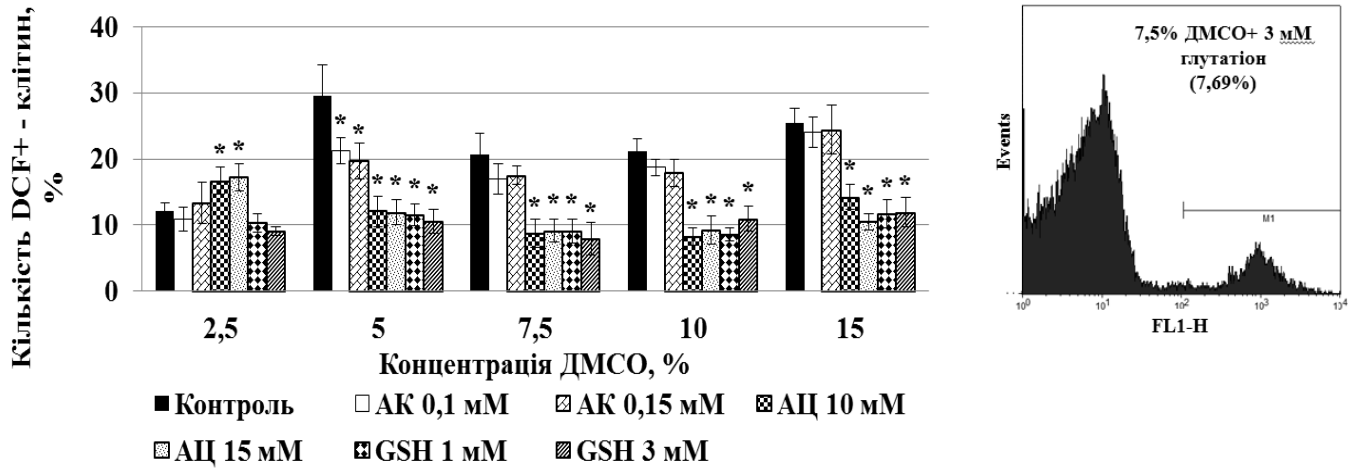
Рис. 2. Кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. *, # – значущі відмінності (від відповідної групи клітин до кріоконсервування (*), від зразка після виділення поліглюкіном (#)), $p < 0,05$.

Таким чином, під час кріоконсервування ЯВК КК зазнають значного стресорного впливу, в результаті чого утворюються надлишкові концентрації АФК, здатні ініціювати зниження збереженості та життєздатності клітин. Виходячи з цього, доцільно було вивчити вплив антиоксидантів (АО) на ЯВК як до так і після кріоконсервування. В роботі проводили дослідження впливу аскорбінової кислоти (АК), N-ацетил-L-цистеїну (АЦ) та глутатіону.

Вивчення збереженості та життєздатності ЯВК КК після еквілібрації з різними концентраціями ДМСО та АО не виявив значущих відмінностей порівняно зі зразками, в які не вносили АО. Визначення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК показало, що додавання АК не змінювало досліджуваний показник, в той час як у зразках із застосуванням АЦ та глутатіону у кінцевих концентраціях 10-15 мМ

та 1 і 3 мМ, відповідно, спостерігалася тенденція до зниження кількості CD45⁺DCF⁺-клітин на 2-5%. Після кріоконсервування було виявлено, що використання АЦ (10 і 15 мМ) та глутатіону (1 та 3 мМ) забезпечувало зниження відсотка DCF⁺-клітин у 2-2,5 рази (окрім зразка з 2,5% ДМСО). В зразках, кріоконсервованих із застосуванням АК (0,1 і 0,15 мМ) спостерігалася значуще зниження даного показника тільки в групі з 5% ДМСО – на 8-10% (рис. 3).



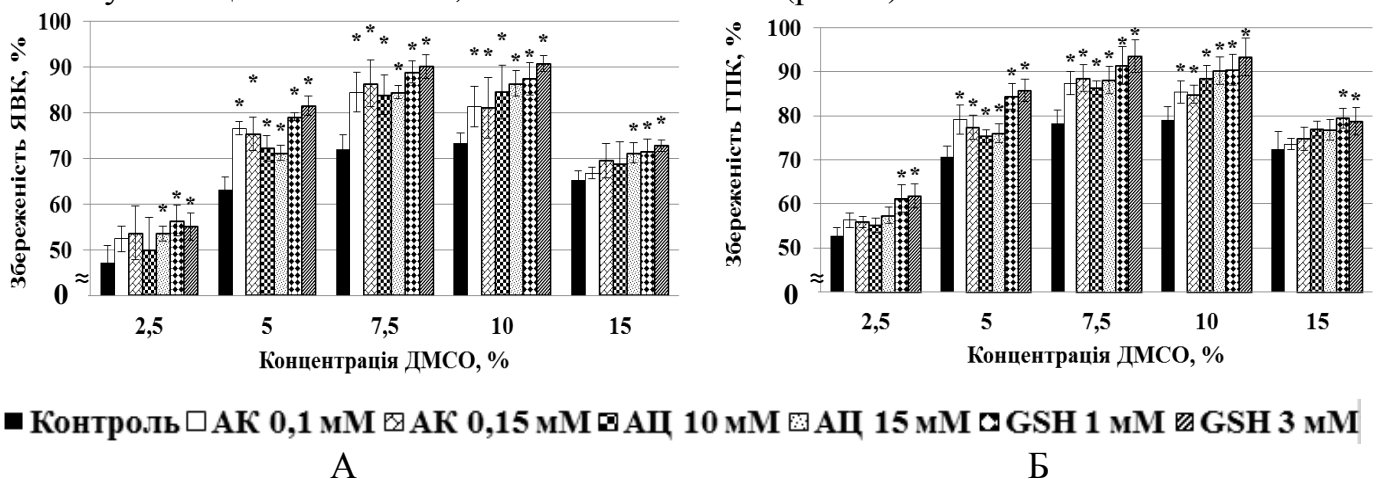
А

Б

Рис. 3. Кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та АО (А). Б – гістограма кількості DCF⁺CD45⁺-клітин (дані типового експерименту)

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників без додавання АО ($p < 0,05$).

Визначення кількості збережених ЯВК, кріоконсервованих у розчинах із 5-10% ДМСО в комбінації з АК (0,1 та 0,15 мМ) або АЦ (10 та 15 мМ) показало збільшення даного показника. Найбільша збереженість клітин спостерігалася в зразках, заморожених із 7,5% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіону: кількість збережених ЯВК була вищою на 14-18%, а ГПК – на 11-15% (рис. 4).



А

Б

Рис. 4. Кількість збережених ЯВК (А) та ГПК (Б) КК після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та АО

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників без додавання АО ($p < 0,05$).

Визначення виходу життєздатних $CD45^+$ - та $CD45^+CD34^+$ -клітин, які зберігалися в цих зразках (7,5% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіону) після розморожування продемонструвало значуще підвищення кількості життєздатних клітин на 20-21%, що вказує на значний вклад глутатіону в захист клітин при кріоконсервуванні. Слід відзначити, що вихід життєздатних $CD45^+$ - та $CD34^+$ -клітин після кріоконсервування в зразках із 5% ДМСО та АО в ефективних концентраціях був на рівні зразків із 7,5 або 10% ДМСО, до яких не додавали АО.

Результати проведених експериментів показали, що додавання 0,05 мМ АК, 5 мМ АЦ та глутатіону в концентрації 0,5 мМ не здійснювали цитопротекторного ефекту. У зразках, кріоконсервованих із АК у концентрації 0,2 мМ, АЦ - 30 мМ та глутатіоном у концентрації 5 мМ спостерігалася тенденція до зниження рівня збереженості та життєздатності клітин порівняно зі зразками, до яких було додано ефективні концентрації антиоксидантів. Це може бути пов'язано з тим, що у високих концентраціях дані речовини можуть проявляти прооксидантні властивості.

Вплив різних концентрацій ДМСО та АО на збереженість, життєздатність та кількість клітин із надлишковим вмістом АФК в ЯВК, у тому числі ГПК, КК після кріоконсервування та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. Аналіз результатів збереженості та життєздатності ЯВК після годинної інкубації клітин у розчині Хенкса показав, що дані показники були мінімальні в зразках, кріоконсервованих із ДМСО у концентраціях 2,5% та 15%. Найбільш стійкими виявилися клітини, кріоконсервовані з ДМСО у концентрації 7,5% та 10%. Хоча й у цих групах показники були на 15-20% значуще нижчими порівняно з даними відразу після кріоконсервування (рис. 5).

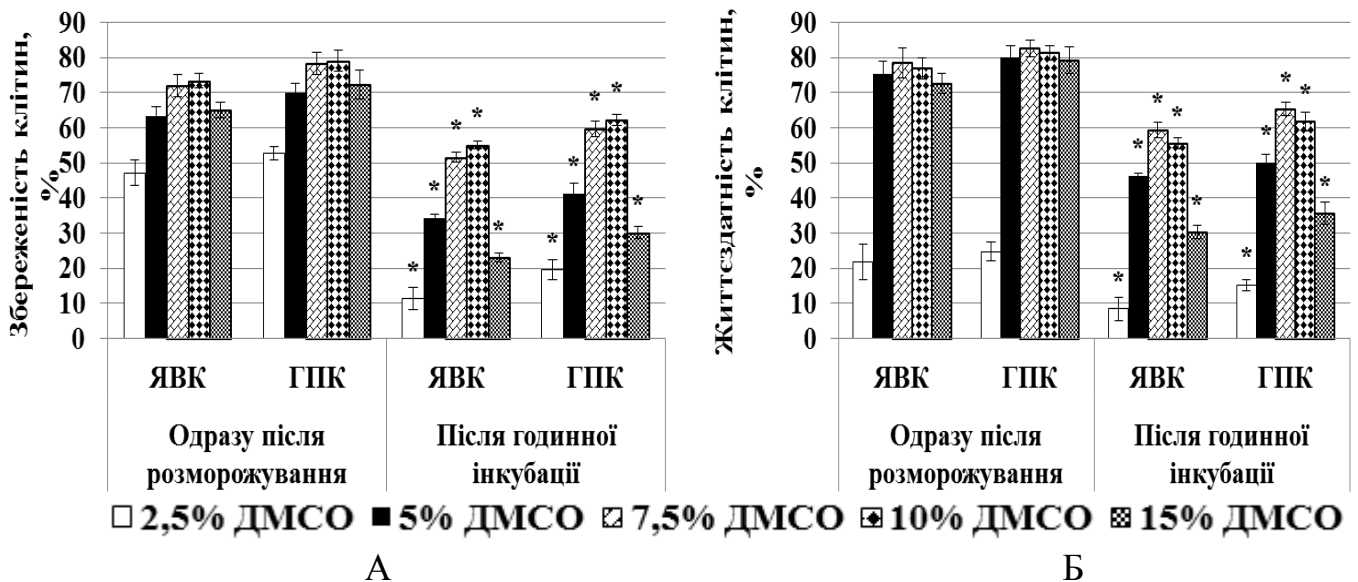


Рис. 5. Збереженість (А) та життєздатність (Б) ЯВК та ГПК КК, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні

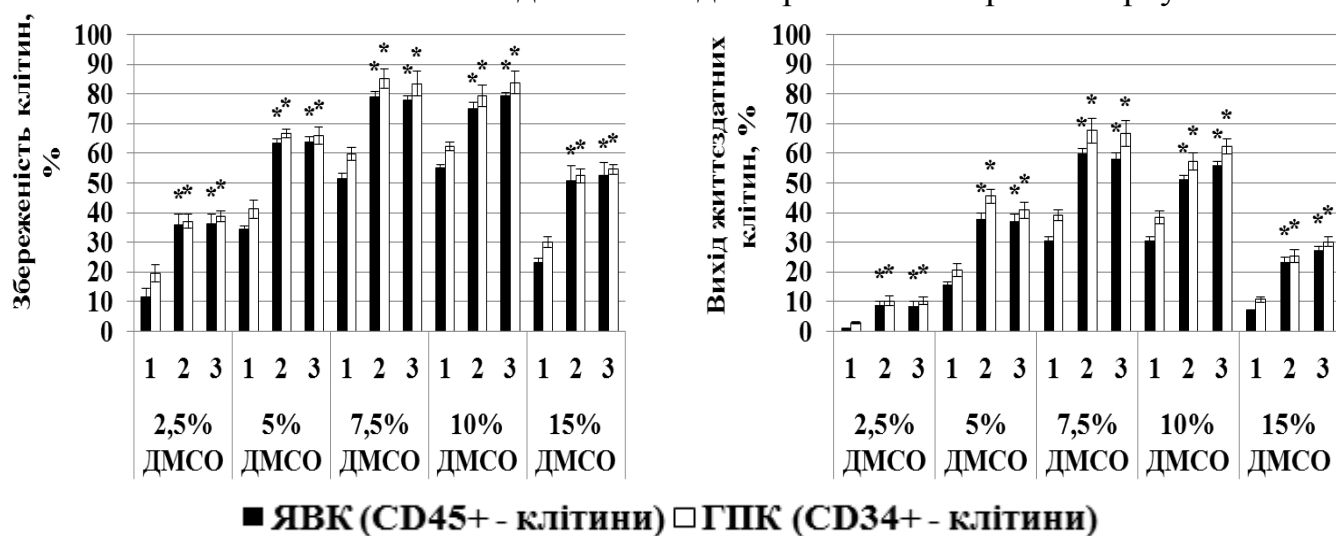
Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від відповідної групи клітин одразу після розморожування ($p < 0,05$).

Кріоконсервування ЯВК КК під захистом ДМСО в концентрації 7,5-10% і АК в ефективних концентраціях (0,1 та 0,15 мМ) та подальше перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, продемонстрували значуще підвищення як загальної

кількості збережених клітин, так і виходу життєздатних на 5-10% по відношенню до їх вихідної кількості після розморожування порівняно зі зразками без додавання АО. Проте, збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК у зразках із АК та ДМСО у концентрації 2,5; 5 та 7,5% свідчить про подальший розвиток окисного стресу. Ці дані вказують на те, що АК не здатна ефективно попереджати надмірне накопичення АФК в клітинах після перенесення їх до фізіологічних умов, що може стати причиною зниження ефективності препарату ЯВК КК.

Годинна інкубація ЯВК, у тому числі ГПК, кріоконсервованих із 7,5-10% ДМСО та антиоксидантом N-ацетил-L-цистеїн в концентраціях 10 та 15 мМ, продемонструвала підвищення кількості збережених CD45⁺- та CD34⁺-клітин на 15-19% та 12-17%, відповідно, порівняно з даними, отриманими без додавання антиоксиданту. У даних зразках спостерігалось й підвищення виходу життєздатних ЯВК на 12-14% та ГПК на 13-15%.

Аналіз впливу глутатіону на деконсервовані ЯВК КК в умовах, які моделюють фізіологічні, продемонстрував підвищення рівня збереженості в усіх експериментальних групах та, особливо, з 7,5 і 10% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіоном, де спостерігалось збільшення кількості збережених ЯВК на 20-28% та ГПК – на 17-26% порівняно зі зразками до яких не було додано АО (рис. 6). Слід зазначити, що в даних зразках спостерігалось й значуще збільшення виходу життєздатних ЯВК на 25-30% та ГПК – на 22-28% по відношенню до їх рівня після кріоконсервування.



■ ЯВК (CD45+ - клітини) □ ГПК (CD34+ - клітини)

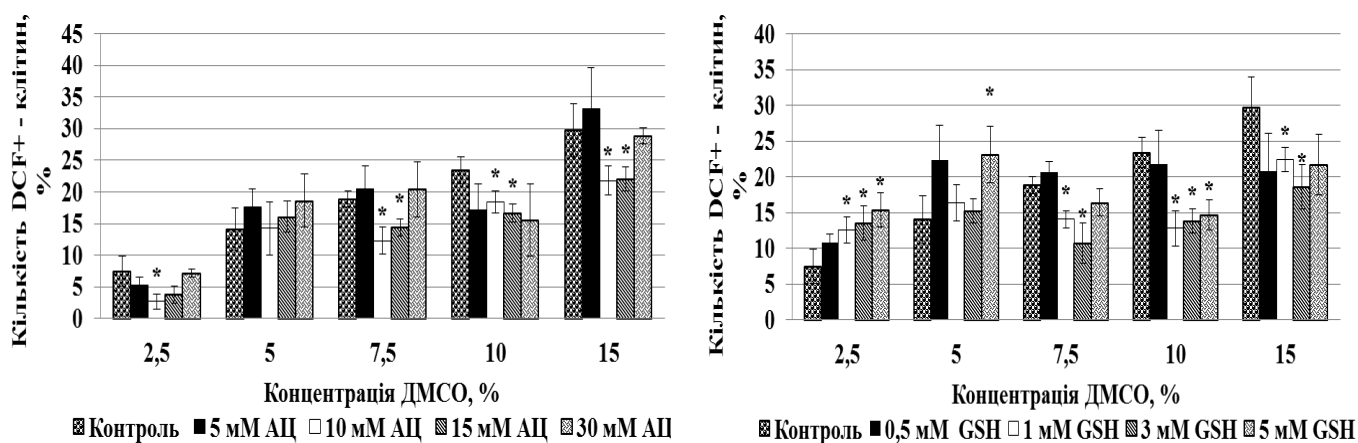
А

Б

Рис. 6. Збереженість (А) та життєздатність (Б) ЯВК та ГПК КК, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО та глутатіону, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні: 1 – Контроль; 2 – 1 мМ глутатіон; 3 – 3 мМ глутатіон

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників, кріоконсервованих без додавання АО ($p < 0,05$).

Таке збільшення збереженості та життєздатності ЯВК у зразках із АЦ та глутатіоном може бути пов'язано з вираженими антиоксидантними властивостями даних речовин, які, в ефективних концентраціях сприяли зниженню рівня АФК у клітинах та запобігали розвитку окисного стресу (рис. 7).



А

Б

Рис. 7. Кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК після криоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО і N-ацетил-L-цистеїна (А) або глутатіона (Б) та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників без додавання АО ($p < 0,05$).

Таким чином, перенесення ЯВК до умов, які моделюють фізіологічні, продемонструвало, що кількість життєздатних клітин суттєво менша, ніж одразу після розморожування, що має враховуватися у клінічній практиці при розрахунку терапевтичної дози препарату. Додавання антиоксидантів в ефективних концентраціях до криозахисних розчинів, які містять 7,5 або 10% ДМСО забезпечує підвищення збереженості та життєздатності ЯВК в цих умовах. Найбільш ефективним антиоксидантом виявився глутатіон, який сприяв значущому зменшенню кількості АФК та попереджав розвиток окисного стресу, що підвищувало рівень збереженості та життєздатності ЯВК.

Оцінка стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК після криоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та АО і перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. Оскільки наслідком процедур заморожування-відігрівання може бути загибель клітин в результаті апоптозу, початкова стадія якого супроводжується втратою ліпідної асиметрії плазматичної мембрани, що призводить до експонування фосфатидилсерина (ФС) на поверхні клітини, нами була проведена оцінка стадій апоптозу/некрозу клітин (Abrahamsen J. F., 2002).

Проведені дослідження показали, що до 30% ЯВК КК після криоконсервування в криопротекторних розчинах із ДМСО знаходяться на різних стадіях апоптозу/некрозу, з переважанням некрозу ($AnnexinV^{-}7AAD^{+}$). Тобто, основні втрати клітин відбуваються в результаті прямого впливу ушкоджуючого фізичного та/або хімічного фактору (у тому числі збільшення рівня АФК у клітинах) в процесі заморожування-відігрівання, на які клітини не можуть або ж не встигають відреагувати за допомогою своїх захисних систем, що призводить до їх загибелі. Невеликий відсоток із усіх пошкоджених в процесі криоконсервування ЯВК складають клітини, які знаходяться на першій ($AnnexinV^{+}7AAD^{-}$) – 1,2% та пізній стадії апоптозу/некрозу ($AnnexinV^{+}7AAD^{+}$) – 6-7%.

Аналіз деконсервованих клітин виявив, що додавання до криозахисного середовища АК та АЦ у ефективних концентраціях призводило до значущого

зменшення кількості некротичних (AnnexinV⁺7AAD⁺) клітин на 5-7%, а також незначному підвищенню відсотка клітин, які знаходяться на початковій та пізній стадіях апоптозу/некрозу в зразках, кріоконсервованих із АК. У зразках, заморожених із 7,5% ДМСО з додаванням 1 та 3 мМ глутатіону, відсоток некротичних клітин був значуще нижчим у 2 та 2,5 рази. При цьому в групах, які знаходяться на першій стадії апоптозу та пізній стадії апоптозу/некрозу, спостерігалася відсутність значущих відмінностей порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксиданту. Слід відзначити, що заморожування ЯВК із АК та АЦ в ефективних концентраціях сприяло підвищенню відсотка живих клітин (AnnexinV⁻7AAD⁻) у зразках із 7,5 та 10% ДМСО, проте найбільша кількість неушкоджених клітин спостерігалася у групі з глутатіоном (1 та 3 мМ) - на 11-12% (рис. 8).

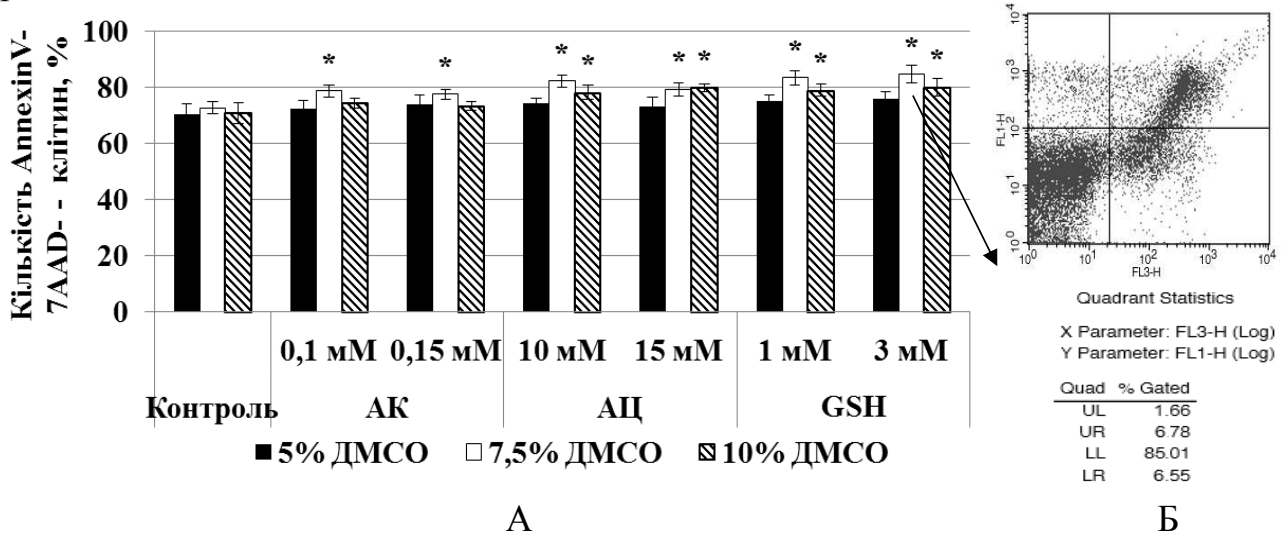


Рис. 8. Кількість AnnexinV⁻7AAD⁻-клітин після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та АО (А). Б – цитограма кількості клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в розчині з 7,5% концентрацією ДМСО та 3 мМ глутатіону (дані типового експерименту)

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників без додавання АО ($p < 0,05$).

Після годинної інкубації в розчині Хенкса було вивлено збільшення кількості некротичних клітин в усіх зразках у 2 рази порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування.

Зміни в кількості клітин, які знаходилися на початковій та пізній стадії апоптозу незначні та не перевищували 0,9-1,8% та 2,7-3,4%, відповідно. При цьому кількість неушкоджених клітин (AnnexinV⁻7AAD⁻) в усіх експериментальних групах була нижчою на 10-30% ніж одразу після розморожування. Найбільша кількість живих клітин спостерігалася в зразках із 7,5 та 10% ДМСО.

Під час аналізу стадій апоптозу в зразках, кріоконсервованих із додаванням до кріозахисного середовища АО в ефективних концентраціях, та перенесених до умов, які моделюють фізіологічні, було показано, що кількість некротичних клітин зменшувалася на 2-9% при додаванні АК, на 4-13% при застосуванні АЦ та на 18-32% при застосуванні глутатіону. При цьому, під час підрахунку кількості живих неушкоджених AnnexinV⁻7AAD⁻-клітин виявилось, що додавання АК до

кріозахисного середовища не призводило до зміни кількості цих клітин, окрім групи з 5% ДМСО та 0,15 мМ АК, де спостерігалось незначне збільшення кількості неушкоджених клітин на 4%. Додавання АЦ сприяло збільшенню кількості даних клітин на 1-6%, а внесення глутатіону підвищувало їх рівень на 17-22% (рис. 9).

Додавання до кріозахисного середовища з 5% ДМСО глутатіону в кінцевих концентраціях 1 та 3 мМ, дозволяє зберегти до 62% живих клітин із неушкодженою мембраною після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, що навіть перевищує аналогічний показник після заморожування клітин із загальноновживаними концентраціями ДМСО (7,5% та 10%) без використання антиоксидантів. Тобто, додавання цієї біологічно активної речовини дозволяє отримати таку ж кількість живих і функціонально активних клітин, як і заморожування за загальноприйнятими протоколами, але при цьому знизити концентрацію ДМСО, що в кінцевому підсумку виражається в поліпшенні якості консервованих препаратів КК і може бути передумовою для розробки кріопротекторних середовищ з більш низьким вмістом ДМСО.

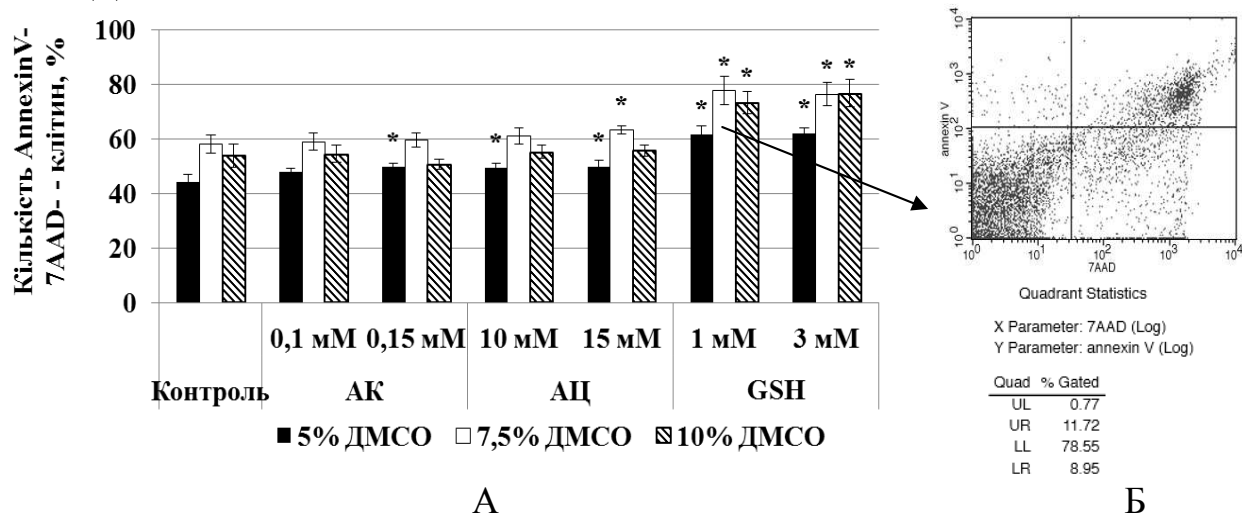


Рис. 9. Кількість AnnexinV/7AAD⁻ клітин після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО і АО та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні (А). Б – цитограма кількості клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу, кріоконсервованих в розчині з 7,5% концентрацією ДМСО і 1 мМ глутатіону, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні (дані типового експерименту)

Примітка: Дані представлені у вигляді $M \pm SE$. * – значущі відмінності від контрольних показників без додавання АО ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукового завдання, спрямованого на комплексне вивчення стану ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові, до та після кріоконсервування з проникаючим кріопротектором ДМСО та антиоксидантами, і перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, а також визначення процесів, які відбуваються в клітинах під впливом ДМСО, антиоксидантів та низьких температур. Розроблені умови для підвищення

збереженості та довгострокової життєздатності ядровмісних клітин, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, після розморожування.

1. Встановлено, що обробка ядровмісних клітин кордової крові розчинами, які містять різні концентрації ДМСО, а також подальше їх кріоконсервування призводять до накопичення в них активних форм кисню та розвитку окисного стресу, що призводить до зниження збереженості та життєздатності клітин. Найменші втрати клітин спостерігаються в зразках, кріоконсервованих під захистом 7,5% та 10% ДМСО.

2. Показано, що додавання антиоксидантів N-ацетил-L-цистеїну (у концентрації 10 та 15 мМ) та глутатіону (у концентрації 1 та 3 мМ) до зразків із різним вмістом ДМСО на етапі еквілібрації сприяє зменшенню токсичного впливу кріопротектора на ядровмісні, у тому числі гемопоетичні прогеніторні, клітини кордової крові, що виражається в зниженні кількості клітин із надлишковим вмістом АФК як до так і після кріоконсервування.

3. Показано, що використання кріопротекторних сумішів, які містять ДМСО в концентрації 7,5 та 10% і аскорбінову кислоту в концентрації 0,1 і 0,15 мМ або N-ацетил-L-цистеїн у концентрації 10 і 15 мМ, або глутатіон у концентрації 1 та 3 мМ для кріоконсервування ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові забезпечує збільшення кількості збережених та життєздатних клітин після розморожування. При цьому найбільш виражений цитопротекторний ефект спостерігається в зразках, кріоконсервованих із глутатіоном, який дозволяє зберігати в життєздатному стані до 80% ядровмісних та до 85% гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові.

4. Показано, що перенесення деконсервованих ядровмісних клітин кордової крові до умов, які моделюють фізіологічні, призводить до значущих втрат частини клітин. Найбільша збереженість ЯВК спостерігається в зразках із 7,5% та 10% ДМСО (від 51,6 до 62,3%).

5. Встановлено, що кріоконсервування ядровмісних клітин під захистом ДМСО (7,5 та 10%) та антиоксидантів в ефективних концентраціях (аскорбінової кислоти (0,1 та 0,15 мМ), N-ацетил-L-цистеїн (10 та 15 мМ), глутатіон (1 та 3 мМ)) дозволяє зберігати більшу кількість та життєздатність ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні порівняно з аналогічними умовами без використання антиоксидантів.

6. Вивчення стадій апоптозу/некрозу та впливу антиоксидантів на кількість AnnexinV⁺/7AAD⁻-клітин після кріоконсервування показало, що додавання антиоксидантів в ефективних концентраціях дозволяє зберігати до 84,7% неушкоджених ядровмісних клітин, а при перенесенні даних клітин до умов, моделюючих фізіологічні – до 77,7%. При цьому глутатіон продемонстрував найбільш виражену антиоксидантну ефективність. Основна частина пошкоджених клітин знаходиться на стадії некрозу.

7. Встановлено, що використання антиоксидантів під час кріоконсервування ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові дозволяє знизити ефективну концентрацію ДМСО до 5%, що забезпечує зменшення токсичного ефекту на клітини, та при цьому досягти показників збереженості та

життєздатності на рівні зразків, кріоконсервованих з 7,5 та 10% ДМСО без застосування антиоксидантів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах України

1. Антиоксидант N-ацетил-L-цистеїн як фактор підвищення збереженості та життєздатності ядровмісних клітин кордової крові, кріоконсервованих з ДМСО / Л. О. Бабійчук, **О. Є. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 4, Т. 2 (125). С. 121–125.

2. Оптимізація методу кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові людини з використанням комбінації кріопротектора ДМСО та антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну / **О. Є. Макашова**, Л. О. Бабійчук, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Проблеми криобиології і криомедицини*. 2016. Т. 26, № 4. С. 295–307. (*Scopus*).

3. Вплив різних концентрацій кріопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові при кріоконсервуванні / **О. Є. Макашова**, Л. О. Бабійчук, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Вісник ХНУ. Серія: Біологія*. 2016. Вип. 26. С. 157–164.

4. Кріоконсервування гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові в кріозахисних середовищах, що містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів / **О. Є. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов, Р. К. Мігунова, Л. О. Бабійчук. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. № 2 (4). С. 234–238.

5. Вплив антиоксидантів на стан кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини після перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні / **О. Є. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов, О. О. Михайлова, Л. О. Бабійчук. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т. 3, № 2 (11). С. 245–249.

6. Аналіз структурно-функціонального стану гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові людини після кріоконсервування з ДМСО і антиоксидантами та перенесення до умов, що моделюють фізіологічні / **О. Є. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов, Л. О. Бабійчук. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. Вип. 1, Т. 1 (142). С. 384–388.

Патент України на корисну модель

7. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові: пат. 108501 Україна: МПК А01N 1/02 (2006.01) / Л. О. Бабійчук, Т. М. Гуріна, П. М. Зубов, **О. Є. Макашова**, О. Л. Зубова; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201512079; заявл. 07.12.2015; опубл. 25.07.2016, Бюл. № 14.

Статті у збірках наукових конференцій України

8. Вплив глутатіона на стан ядровмісних клітин кордової крові при кріоконсервуванні з ендоцелюлярним кріопротектором ДМСО / **О. Є. Макашова**, Л. О. Бабійчук, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології: матеріали V Наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю* (м. Харків, 18 листоп. 2016 р.). Харків, 2016. С. 387–390.

Статті у зарубіжних збірках матеріалів конференцій

9. Влияние N-ацетил-L-цистеина на сохранность, жизнеспособность и содержание активных форм кислорода в ядродержащих клетках кордовой крови в

зависимости от концентрации ДМСО и времени эквilibрации / Л. А. Бабийчук, О. Л. Зубова, **Е. Е. Макашова**, П. М. Зубов. *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: материалы межд. заочной науч.-практ. конф.* (Россия–Украина, 24 марта 2014 г.). Сыктывкар, 2014. С. 94–100.

10. Оценка антиоксидантных свойств аскорбиновой кислоты при криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови с ДМСО / Л. А. Бабийчук, О. Л. Зубова, **Е. Е. Макашова**, П. М. Зубов. *Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы: материалы науч.-практ. конф. с межд. участием* (г. Пущино, 28–30 окт. 2014 г.). Биофизика живой клетки. 2014. Т. 10. С 36–38.

11. Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина для повышения сохранности и жизнеспособности ядросодержащих клеток кордовой крови, криоконсервированных с ДМСО / Л. А. Бабийчук, **Е. Е. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участием, посвящ. 55-летию института* (г. Киров, 6–7 окт 2015 г.). Киров, 2015. С. 32–35.

12. Improving of cryoprotectant media for human cord blood nucleated cells cryopreservation / О. О. Mykhailova, **О. YE. Makashova**, P. M. Zubov, L. A. Babijchuk. *Cold Applications in Life Sciences: proceedings of the IIR Workshop* (Dresden, 08–09 Sept. 2016). Dresden, 2016. P. 131–134. (*Scopus*). DOI: 10.18462/iir.cals.2016.0009.

13. Сохранность и жизнеспособность ядросодержащих клеток кордовой крови, криоконсервированных в растворах, содержащих различные концентрации ДМСО и аскорбиновой кислоты / **Е. Е. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов, Л. А. Бабийчук. *Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участием* (г. Киров, 3–4 октября 2017 г.). Киров, 2017. С. 48–52.

Тези наукових доповідей конференцій

14. Определение активных форм кислорода в ядросодержащих клетках донорской крови до и после криоконсервирования / Л. А. Бабийчук, **Е. Е. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Загальноотерапевтична практика: нові технології та междисциплінарні питання: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю* (м. Харків, 7 листопада 2013 р.). Харків, 2013. С. 20.

15. Evaluation of the antioxidant properties of ascorbic acid at cryopreservation of cord blood nucleated cells with DMSO / L. A. Babijchuk, **Е. Е. Makashova**, O. L. Zubova, P. M. Zubov. *Transplantation – present, past and future: abstracts of International conf.* (Kyiv, 7 Nov. 2014). *Cell and Organ Transplantation*. 2014. Vol. 2, № 2. P. 166.

16. Mykhailova O. O., **Makashova O. Y.**, Zubov P. M. Cryopreservation of human cord blood nucleated cells according by different methods. *Conference for Young Scientists (CYS-2015): book of abstracts* (Kyiv, 21–25 Sept. 2015). Kyiv, 2015. P. 104.

17. Assessment of apoptosis or necrosis stages of human cord blood nucleated cells after cryopreservation by different methods / L. A. Babijchuk, O. O. Mykhailova, **О. Y. Makashova**, P. M. Zubov, V. V. Ryazantsev. *Advances in Cell Biology and Biotechnology: Book of abstracts int. conf.* (Lviv, 11–13 October 2015). Lviv, 2015. P. 77.

18. Estimation of antioxidant properties of N-acetyl-L-cysteine during cord blood nucleated cells cryopreservation with DMSO / L. A. Babijchuk, O. L. Zubova, **O. Y. Makashova**, P. M. Zubov. *Advances in Cell Biology and Biotechnology*: Book of abstracts int. conf. (Lviv, 11–13 October 2015). Lviv, 2015. P. 78.

19. **Макашова Е. Е.**, Зубова О. Л., Зубов П. М. Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови. *Холод в биологии и медицине – 2016: Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии*: материалы 40-ой ежегодн. конф. молодых ученых (г. Харьков, 23–24 мая 2016 г.). *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016. Т. 26, № 2. С. 183.

20. **Макашова О. Є.**, Зубова О. Л. Вплив кріозахисних середовищ на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові після кріоконсервування та моделювання трансфузії. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2016*: тези доп. конф.-конкурсу молодих учених (м. Київ, 26–27 травня 2016 р.). Київ, 2016. С. 31.

21. Oxidative processes, structural and functional state of cord blood nucleated cells upon cryopreservation / O. Mykhailova, **O. Makashova**, P. Zubov, O. Zubova, L. Babijchuk. *Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine*: Book of abstracts X Parnas Conference: Young Scientist Forum (Wroclaw, 10–12 July 2016). Poland, 2016. P. 8.

22. Cryopreservation and redox state of cord blood nucleated cells / O. O. Mykhailova, **O. Ye. Makashova**, P. M. Zubov, O. L. Zubova, L. A. Babijchuk. *SLTB Symposium 2016*: Book of abstracts annual meeting of the Society of Low Temperature biology (Dresden, 7 Sept. 2016). Dresden, 2016. P. 14.

23. **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. *Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2017*: сборник тезисов докл. LXXI Межд. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых (г. Минск, 17–19 апреля 2017 г.). Минск, 2017. С. 216.

24. Роль глутатиона в повышении качества криоконсервированных препаратов кордовой крови. Л. А. Бабийчук, **Е. Е. Макашова**, О. Л. Зубова, П. М. Зубов. *Щорічні терапевтичні читання: медикаментозна та не медикаментозна профілактика неінфекційних захворювань: погляд в майбутнє*: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої пам'яті академіка Л. Т. Малої (м. Харків, 20 квітня 2017 р.). Харків, 2017. С. 12.

25. **Макашова О. Є.**, Зубова О. Л. Вплив аскорбінової кислоти на збереженість та життєздатність гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали XI Всеукр. наук.-практ. конф. для студентів, аспірантів і молодих учених (м. Київ, 21 квітня 2017 р.). Київ, 2017. С. 49.

26. **Макашова Е. Е.**, Зубова О. Л. Повышение сохранности и жизнеспособности гемопоэтических прогениторных клеток кордовой крови при криоконсервировании с ДМСО с использованием глутатиона. *Наука и медицина*:

современный взгляд молодежи: материалы IV межд. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых (г. Алматы, 20–21 апр. 2017 г.). Казахстан, 2017. С. 486–487.

27. **Макашова О. Є.,** Зубова О. Л., Зубов П. М. Визначення кількості ядровмісних клітин кордової крові, що перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування з ДМСО. *Медицина наука на перетині спеціальностей: сьогодні і майбутнє: матеріали наук.-практ. конф. з участю міжнар. спеціалістів, присвяченої Дню науки (м. Харків, 19 травня 2017 р.). Харків, 2017. С. 72.*

28. **Макашова О. Є.,** Зубова О. Л., Зубов П. М. Роль антиоксидантів у підвищенні збереженості та життєздатності кріоконсервованих гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові. *Холод в біології і медицині – 2017: Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології: матеріали 41-ої щорічної конф. молодих учених (г. Харків, 24–25 мая 2017 г.). Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2017. Т. 27, № 2. С. 176.*

29. Оцінка стадій апоптозу ядровмісних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах, що містять ДМСО та аскорбінову кислоту / **О. Макашова,** О. Зубова, П. Зубов, Л. Бабійчук. *Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: IV Міжнар. наук. конф. (м. Дніпро, 5–6 жовтня 2017 р.). Дніпро, 2017. С. 242–243.*

30. Роль глутатиона при кріоконсервуванні ядродержащих клеток кордовой крови человека / **Е. Е. Макашова,** П. М. Зубов, О. Л. Зубова, Л. А. Бабійчук. *Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине (г. Москва, 15–18 нояб. 2017 г.). Гены и клетки. Т. XII, № 3. С. 152–153.*

АНОТАЦІЯ

Макашова О. Є. Вплив антиоксидантів на стан ядровмісних клітин кордової крові під час кріоконсервування з кріопротектором диметилсульфоксидом. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 «Кріобіологія». – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2018.

Дисертаційна робота присвячена визначенню збереженості, життєздатності та кількості ядровмісних клітин кордової крові людини із надлишковим вмістом активних форм кисню, а також вивченню розвитку їх апоптозу під час кріоконсервування в розчинах, які містять ДМСО та речовини з антиоксидантними властивостями.

Показана висока ефективність кріоконсервування ЯВК з додаванням аскорбінової кислоти (АК) в концентраціях 0,1 та 0,15 мМ, N-ацетил-L-цистеїну (АЦ) (10 та 15 мМ) або глутатіону (1 та 3 мМ) у порівнянні з відповідними групами, кріоконсервованими без застосування антиоксидантів. Найбільша збереженість та життєздатність спостерігалася в зразках, заморожених із 7,5% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіону. Виявлено, що кріоконсервування ЯВК під захистом ДМСО в концентрації 7,5-10% і антиоксидантів в ефективних концентраціях та подальше перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, сприяє значущому підвищенню як загальної кількості збережених клітин на 20-28%, так і виходу життєздатних на

25-30% по відношенню до їх вихідної кількості після розморожування порівняно зі зразками без додавання антиоксидантів. Аналіз стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК після заморожування-відігрівання показав, що додавання АК та АЦ до криозахисного середовища у ефективних концентраціях призводить до значущого зменшення кількості некротичних (AnnexinV⁻/7AAD⁺) клітин на 5-7%, а 1 та 3 мМ глутатіону у 2-2,5 рази, де спостерігалася і найбільша кількість неушкоджених ЯВК (AnnexinV⁺/7AAD⁻). Годинна інкубація в розчині Хенкса при 37°С (моделювання трансфузії) продемонструвала зменшення кількості некротичних клітин на 2-9% при додаванні АК, на 4-13% при застосуванні АЦ та на 18-32% при застосуванні глутатіону порівняно зі зразками до яких не було додано антиоксиданти. При цьому, підрахунок кількості живих неушкоджених AnnexinV⁺/7AAD⁻-клітин виявив, що додавання АЦ та глутатіону сприяло збільшенню кількості клітин даного типу на 1-6% та 17-22%, відповідно. В той час як додавання АК не впливало на кількість живих клітин.

Встановлено, що використання антиоксидантів під час криоконсервування ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові дозволяє знизити ефективну концентрацію ДМСО до 5%, що забезпечує зменшення токсичного ефекту на клітини, та при цьому досягти показників збереженості та життєздатності на рівні зразків, криоконсервованих з 7,5 та 10% ДМСО без застосування антиоксидантів.

Ключові слова: ядровмісні клітини кордової крові, гемопоетичні прогеніторні клітини, криоконсервування, ДМСО, аскорбінова кислота, N-ацетил-L-цистеїн, глутатіон, активні форми кисню, апоптоз.

АННОТАЦІЯ

Макашова Е. Е. Влияние антиоксидантов на состояние ядродержащих клеток кордовой крови при криоконсервировании с криопротектором диметилсульфоксидом. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.19 «Криобиология». – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2018.

Диссертационная работа посвящена определению сохранности, жизнеспособности и количества ядродержащих клеток (ЯСК) кордовой крови (КК) человека с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК), а также изучению развития их апоптоза при криоконсервировании в растворах, содержащих ДМСО и вещества с антиоксидантными свойствами.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности криоконсервирования ЯСК с добавлением аскорбиновой кислоты (АК) в концентрациях 0,1 и 0,15 ммоль, N-ацетил-L-цистеина (АЦ) (10 и 15 мм) и глутатиона (1 и 3 ммоль) по сравнению с соответствующими группами, криоконсервированными без применения антиоксидантов. Наибольшая сохранность и жизнеспособность наблюдалась в пробах, замороженных с 7,5% ДМСО и 1 и 3 мМ глутатиона.

Выявлено, что после переноса деконсервированных ЯСК в условия, моделирующих физиологические, происходит существенное снижение их сохранности и жизнеспособности во всех экспериментальных группах по сравнению с данными,

полученными сразу после криоконсервирования. Показано, что криоконсервирование ЯСК под защитой ДМСО в концентрации 7,5-10% и антиоксидантов в эффективных концентрациях и дальнейший перенос в условия, моделирующие физиологические, способствует достоверному повышению как общего количества сохраненных клеток на 20-28%, так и выходу жизнеспособных на 25-30% по отношению к их исходному количеству после размораживания, по сравнению с пробами без добавления антиоксидантов.

Анализ стадий апоптоза/некроза ЯСК КК после замораживания-отогрева показал, что добавление АК и АЦ в криозащитную среду в эффективных концентрациях приводит к достоверному уменьшению количества некротических (AnnexinV⁺/7AAD⁺) клеток на 5-7%, а внесение 1 и 3 мМ глутатиона в 2-2,5 раза, где наблюдалась и большое количество неповрежденных клеток (AnnexinV⁻/7AAD⁻).

Часовая инкубация в растворе Хэнкса при 37°С (моделирование трансфузии) продемонстрировала увеличение количества некротических клеток (AnnexinV⁺/7AAD⁺) во всех образцах в 2 раза по сравнению с данными, полученными сразу после размораживания. При этом количество неповрежденных клеток (AnnexinV⁻/7AAD⁻) во всех экспериментальных группах, было ниже на 10-30%. Наибольшее количество живых клеток наблюдалась в пробах с 7,5 и 10% ДМСО. В пробах, криоконсервированных с добавлением антиоксидантов в эффективных концентрациях, после переноса в условия, моделирующие физиологические, было показано, что количество некротических клеток уменьшалось на 2-9% при добавлении АК, на 4-13% при применении АЦ и на 18-32% при применении глутатиона. При этом оценка количества живых неповрежденных AnnexinV⁻/7AAD⁻-клеток показала, что добавление АЦ и глутатиона способствовало увеличению количества клеток данного типа на 1-6% и 17-22% соответственно. В то время как добавление АК не влияло на количество живых клеток.

Установлено, что использование антиоксидантов при криоконсервировании ядродержащих, в том числе гемопоэтических прогениторных, клеток кордовой крови позволяет снизить эффективную концентрацию ДМСО до 5%, что обеспечивает уменьшение токсического эффекта на клетки, и при этом достичь показателей сохранности и жизнеспособности на уровне образцов, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО без применения антиоксидантов.

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

ANNOTATION

Makashova O. Ye. Influence of antioxidants on the state of cord blood nucleated cells during cryopreservation with cryoprotectant dimethylsulfoxide. – The qualified scientific work on the right of the manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Philosophy Doctor) in specialty 03.00.19 – «Cryobiology». – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2018.

The thesis is devoted to the determination of preservation rate, viability and amount of human cord blood nucleated cells (NCs) with an excessive content of reactive oxygen species (ROS), and the study of their developing apoptosis during cryopreservation in the solutions containing DMSO and substances with antioxidant properties.

It has been shown a high efficiency of the NCs cryopreservation with addition of ascorbic acid (AA) at the concentrations of 0.1 and 0.15 mmol, N-acetyl-L-cysteine (NAC) (10 and 15 mM) and glutathione (GSH) (1 and 3 mM) as compared with the respective groups of the cells, cryopreserved with no use of antioxidants. The highest preservation rate and viability was observed in the samples frozen with 7.5% DMSO and 1 and 3 mM GSH. It has been revealed that the cryopreservation of NCs with DMSO at the concentration of 7.5-10% and antioxidants at effective concentrations and further transfer them to the conditions close to physiological ones promoted a significant rise in both the total amount of the preserved cells by 20-28% and the amount of viable cells by 25 -30% in relation to their initial number after thawing in comparison to the samples without the addition of antioxidants. Analysis of apoptosis/necrosis stages of cord blood NCs after freeze-thawing showed that the addition of AA and NAC to the cryoprotective medium at effective concentrations led to a significant decrease in amount of necrotic cells (AnnexinV⁺7AAD⁺) by 5-7%, and 1 and 3 mM GSH in 2-2.5 times, where there was a rise in the amount of living NCs (AnnexinV⁻7AAD⁻). One hour incubation in Hank's solution at 37°C (simulated transfusion) demonstrated a decreased amount of necrotic cells by 2-9% with the addition of AA, by 4-13% with the use of NAC and by 18-32% when applying GSH if compared to the samples whereto there were no antioxidants added. At the same time, counting the amount of living (intact) AnnexinV⁻7AAD⁻-cells revealed that the addition of NAC and GSH promoted an increased amount of this type of the cells by 1-6% and 17-22%, respectively. The addition of AA did not affect the number of living cells.

It has been established that the use of antioxidants during cryopreservation of cord blood nucleated cells, including hematopoietic progenitor cells, allows reducing the effective concentration of DMSO down to 5%, which diminishes a toxic effect on the cells, while achieving the preservation and viability parameters at the level of the samples cryopreserved with 7.5 and 10% DMSO without the addition of antioxidants.

Key words: cord blood nucleated cells, hematopoietic progenitor cells, cryopreservation, DMSO, ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine, glutathione, reactive oxygen species, apoptosis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

КК – кордова кров; **ЯВК** – ядровмісні клітини; **ГПК** – гемопоетичні прогеніторні клітини; **ДМСО** – диметилсульфоксид; **АФК** – активні форми кисню; **АО** – антиоксиданти; **АК** – аскорбінова кислота; **АЦ** – N-ацетил-L-цистеїн; **GSH** – глутатіон.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку р. Формат 60x84 1/16.
Папір офсетний. Друк ризографія.
Умов. друк. арк. 0,9. Тир. 100 прим.