МАТЕРІАЛИ
МІЖНАРОДНОЇ
СПЕЦІАЛІЗОВАНОЇ
НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ



Міжнародний Центр Наукових Досліджень

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

19 БЕРЕЗНЯ 2021 РІК
м. Тернопіль, Україна

Вінниця, Україна
«Європейська наукова платформа»
2021

УДК (60+61)+159.9
Б 63

https://doi.org/10.36074/mcnd-19.03.2021.medicine

Організація, від імені якої випущено видання:
ГО «Міжнародний центр наукових досліджень»

Голова оргкомітету: Рабей Н.Р.

Верстка: Білоус Т.О.
Дизайн: Бондаренко І.В.

Конференцію зареєстровано Державною науковою установою «УкрІНТЕІ» в базі даних науково-технічних заходів України та інформаційному бюлетені «План проведення наукових, науково-технічних заходів в Україні» (Посвідчення № 48 від 18.01.2021).

Матеріали конференції знаходяться у відкритому доступі на умовах ліцензії Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Роботи, що містять цифровий ідентифікатор DOI індексуються в ORCID, CrossRef та OUCI (Український індекс наукового цитування).

Б 63 **Біологія людини та медицина XXI: сучасний стан, проблеми та перспективи**: матеріали міжнародної спеціалізованої наукової конференції, м. Тернопіль, 19 березня, 2021 р. / Міжнародний центр наукових досліджень. — Вінниця: Європейська наукова платформа, 2021. — 60 с.

ISBN 978-617-7991-27-3
DOI 10.36074/mcnd-19.03.2021.medicine

Викладено матеріали учасників міжнародної спеціалізованої наукової конференції «Біологія людини та медицина XXI: сучасний стан, проблеми та перспективи», яка відбулася у місті Тернопіль 19 березня 2021 року.

УДК (60+61)+159.9

© Колектив учасників конференції, 2021
ГО «Європейська наукова платформа», 2021
© ГО «Міжнародний центр наукових досліджень», 2021

ISBN 978-617-7991-27-3

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ДМСО ТА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ НА РОЗВИТОК АПОПТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ В ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИНАХ КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

НАУКОВО-ДОСЛІДНА ГРУПА:

Бабійчук Любов Олександрівна
доктор біол. наук, проф., зав. відділом кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

Зубов Павло Михайлович
канд.біол.наук, ст.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

Зубова Оксана Леонідівна
канд.біол.наук, ст.н.с. відділу кріоцитології
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

Зменшення активності антиоксидантної системи, порушення впорядкованості структури мембрани під час кріоконсервування можуть призводити до збільшення рівня АФК у клітинах після перенесення їх у кровоносне русло та викликати розвиток перекисного окислення ліпідів [1]. У літературі показано, що у відповідь на загрозливий рівень оксидантів клітини здатні за допомогою сигнального каскаду додатково продукувати антиоксиданти і активувати ферментні захисні системи, такі як відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза та ін. [2]. Якщо екстремальні умови продовжують свій вплив, резервів цих систем саморегуляції для підтримки гомеостазу стає недостатньо і клітина переходить в режим функціонування в стресових умовах [3]. Тому, для зведення до мінімуму дії згубних впливів на клітини під час кріоконсервування, актуальним є включення до середовища з кріопротектором додаткових речовин, які мають цитопротекторні властивості, такі як антиоксиданти.

В останні роки використання антиоксидантів під час кріоконсервування

різних біологічних об'єктів (сперма, ембріони, гепатоцити) стало предметом серйозних досліджень, спрямованих на поліпшення якості даних клітин після розморожування [4]. Проте застосування антиоксидантів й інгібіторів апоптозу для кріоконсервування ЯВК КК активно не досліджувалось. Однією зі сполук з антиоксидантною дією є аскорбінова кислота (АК). У літературі існують дані, згідно яких додавання до культури клітин АК здатне зменшувати кількість апоптичних клітин, оскільки крім прямої антиоксидантної дії, яка полягає в інактивації АФК за рахунок ефективного зниження дисульфідних зв'язків у білках, АК перешкоджає передачі сигналів апоптозу шляхом пригнічення виходу цитохрому С з мітохондрій і таким чином інгібує процес активації каспази 9 (каскаду протеаз цистеїнового типу, які ініціюють апоптоз) [5]. Тому мета даної роботи полягає в тому, щоб вивчити вплив АК на кількість клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в кріопротекторних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО.

У роботі використовували КК людини. 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 7,5 та 10%. У роботі використовували аскорбінову кислоту («Sigma-Aldrich», США) у кінцевій концентрації 0,1 та 0,15 мМ, які перед кріоконсервуванням вносили в зразки з ДМСО. Проби кріоконсервували в програмному заморожувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°С із наступним зануренням у рідкий азот (–196°С). Відігрівання здійснювали при 37°С на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази. Для оцінки кількості та життєздатності ЯВК КК ($CD45^+$-клітини) використовували стандартний ISHAGE протокол. Оцінку стадій апоптозу ядровмісних клітин проводили з одночасним внесенням до зразків маркерів AnnexinV FITC, CD45 PE і 7-AAD. Вимірювання проводили методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD») при довжині хвилі збудження 488 нм.

З даних, представлених у таблиці 1, видно, що кріоконсервування ЯВК КК під захистом ДМСО у поєднанні з АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ, призводило до значущого зменшення кількості клітин, які знаходяться на стадії некрозу ($AnnexinV^-/7AAD^+$), порівняно з контрольними даними, що може бути пов'язано зі здатністю АК запобігати процесу окислення відновленого глутатіону (GSH) до його функціонально неактивної форми (GSSG) або робити його зворотним [6].

Таблиця 1

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

Конц. ДМСО, %	Конц. АК, мМ	Стадії апоптозу			
		AnnexinV⁻/7AAD⁻-клітини	AnnexinV⁺/7AAD⁻-клітини	AnnexinV⁺/7AAD⁺-клітини	AnnexinV⁻/7AAD⁺-клітини
5	Контроль	70,4±3,8	1,2±0,3	5,9±1,7	23,5±2,9
	0,1	72,4±3,1	1,6±0,4	9,0±1,8	18,5±1,4*
	0,15	73,9±3,4	1,2±0,2	8,2±1,1	17,9±2,2*
7,5	Контроль	72,7±2,1	0,8±0,2	7,3±1,3	16,2±2,7
	0,1	78,8±2,2*	1,9±0,4*	10,7±1,4*	9,8±2,1*
	0,15	77,6±1,7*	2,2±0,6*	10,0±2,1	11,1±1,6*
10	Контроль	70,8±3,8	0,8±0,2	7,2±0,7	19,9±2,4
	0,1	74,5±1,8	2,0±0,2*	11,5±2,1*	13,1±2,1*
	0,15	73,4±1,5	1,9±0,3*	12,6±3,2*	12,7±3,2*

Примітка: Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE.

** – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданту; p<0,05.*

Аналіз клітин, які перебували на пізній стадії апоптозу/некрозу (AnnexinV⁺/7AAD⁺) показав, що додавання 0,1 мМ розчину АК до 7,5% ДМСО та 0,1 мМ і 0,15 мМ розчинів даного антиоксиданту до 10% ДМСО підвищувало кількість цих клітин приблизно до 12% порівняно з даними, отриманими без додавання АК. Цей з першого погляду негативний факт не можна розглядати окремо від наших попередніх досліджень [7], в яких продемонстровано, що використання саме цих ефективних концентрацій АК, забезпечує збереження значуще більшої кількості життєздатних клітин. Тобто клітини в зразках, кріоконсервованих з додаванням розчинів АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ, залишаються морфологічно цілими та не руйнуються, що й викликає підвищення досліджуваного показника. Аналіз клітин, які перебували на початковій стадії апоптозу (AnnexinV⁺/7AAD⁻) у зразках, які містили ДМСО у концентрації 7,5% та АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ, також показав збільшення їх кількості (табл. 1). У пробах, кріоконсервованих із 10% ДМСО у комбінації з усіма використаними нами концентраціями антиоксиданту, спостерігалося значуще збільшення кількості клітин із порушеною асиметрією мембран, що може бути пов'язано з токсичністю кріопротектора, проте їх рівень залишався невисоким і не перевищував 2,5%.

Визначення кількості живих функціонально повноцінних клітин, які не зв'язались з жодним із використаних нами реагентів (AnnexinV⁻/7AAD⁻), у

групах, кріоконсервованих під захистом ДМСО у концентрації 7,5% та АК у концентрації 0,1 і 0,15 мМ, показало значуще більшу їх кількість. Аскорбінова кислота за даних концентрацій здатна зберігати до 78,8% клітин із неушкодженою структурою. Слід відзначити, що в усіх інших групах даний показник не відрізнявся від контрольних значень.

Таким чином, додавання аскорбінової кислоти до кріозахисного розчину з ДМСО здатне підвищити кількість неушкоджених ядровмісних клітин кордової крові. Проте, концентрація даного антиоксиданту повинна бути ретельно підібрана, оскільки відомо, що її перевищення може викликати прооксидантний ефект.

Список використаних джерел:

1. Maeshima Y, Makino H. Molecular mechanism of cell injury. Contrib Nephrol. 2003;139:32–43.
2. Paudel KP, Kumar S, Meur SK, Kumaresan A. Ascorbic acid, catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. Reprod Domest Anim. 2010 Apr;45(2):256–62.
3. Jia Soon Len,Wen Shuo Darius Koh,Shi-Xiong Tan. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. Biosci Rep. 2019 Aug 29;39(8):BSR20191601.
4. Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. Cryobiology. 2010 Jun;60(3):301–7.
5. Komang Ardi Wahyuningsih, Karina Karina, Imam Rosadi , Iis Rosliana, Wismo Reja Subroto Effect of ascorbic acid on morphology of post-thawed human adipose-derived stem cells Stem Cell Investig. 2020 Sep 2;7:16.
6. Mata AM, Carvalho RM, Alencar MV, Cavalcante AA, Silva BB. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. Rev Assoc Med Bras (1992). 2016 Oct;62(7):680–6.
7. Макашова О, Зубова О, Зубов П, Бабійчук Л. Оцінка стадій апоптозу ядровмісних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах, що містять ДМСО та аскорбінову кислоту. В: Ушакова ГО, редактор. Матеріали IV міжнар. наук. конф. Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології; 2017 жовт. 5-6; Дніпро. Дніпро: вид-во «Ліра»; 2017. с. 242–3.