

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

УДК: 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

Вплив різних концентрацій криопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові при криоконсервуванні **О.Є.Макашова, Л.О.Бабійчук, О.Л.Зубова, П.М.Зубов**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)
pmzubov@mail.ru*

В роботі представлені результати досліджень щодо відпрацювання підходів з оцінки кількості ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові з надмірним вмістом активних форм кисню (АФК) при використанні флуоресцентного барвника 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату методом проточної цитофлуориметрії. Показано, що як еквибірація ЯВК протягом однієї години з різними концентраціями проникаючого криопротектора ДМСО, так і їх криоконсервування призводять до зниження збереженості та життєздатності клітин, що може бути викликано пригніченням антиоксидантної системи клітин і, як наслідок, накопиченням надмірної кількості АФК. Отримані результати продемонстрували необхідність розробки технологій криоконсервування з додаванням в криозахисне середовище антиоксидантів з метою запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Ключові слова: *кордова кров, ядровмісні клітини, криоконсервування, активні форми кисню.*

Влияние различных концентраций криопротектора ДМСО на сохранность, жизнеспособность и содержание активных форм кислорода в ядродержащих клетках кордовой крови при криоконсервировании **Е.Е.Макашова, Л.А.Бабийчук, О.Л.Зубова, П.М.Зубов**

В работе представлены результаты исследований по отработке подходов по оценке количества ядродержащих клеток (ЯСК) кордовой крови с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК) при использовании флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата методом проточной цитофлуориметрии. Показано, что как эквилибрация в течение одного часа ЯСК с различными концентрациями проникающего криопротектора ДМСО, так и криоконсервирование приводят к снижению сохранности и жизнеспособности клеток, что может быть вызвано угнетением антиоксидантной системы клеток и, как следствие, накоплением избыточного количества АФК. Полученные результаты показали необходимость разработки технологий криоконсервирования с добавлением в криозащитную среду антиоксидантов с целью предотвращения развития окислительного стресса в клетках.

Ключевые слова: *кордовая кровь, ядродержащие клетки, криоконсервирование, активные формы кислорода.*

Effect of various concentrations of the cryoprotectant DMSO on safety, viability and content of reactive oxygen species in cord blood nucleated cells during cryopreservation **E.E.Makashova, L.A.Babijchuk, O.L.Zubova, P.M.Zubov**

The paper presents the results of the study of development of approaches to assess the number of cord blood nucleated cells (NC) with excessive reactive oxygen species (ROS) content with the fluorescent dye 2',7'-dihloridigidrofluorestsein diacetate by flow cytometry. Both exposure of NC for one hour with various concentrations of penetrating cryoprotectant DMSO and their cryopreservation resulted in reduced cell safety and viability that may be caused by inhibition of cell antioxidant system with the following accumulation of excessive content of ROS in cells. The results obtained showed the necessity of the addition of antioxidants into cryoprotective medium to prevent oxidative stress inside cells for improving cryopreservation techniques.

Key words: *cord blood, nucleated cells, cryopreservation, reactive oxygen species.*

Вступ

Медичні центри різних країн все частіше використовують аутологічні та алогенні гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК). Кордова кров (КК) є одним з основних джерел отримання стовбурових клітин. Трансплантація ГСК, отриманих з КК, розвивається найбільш швидкими темпами. Тільки в одному американському реєстрі (National Marrow Donor Program) зберігається понад 50000 зразків стовбурових клітин, отриманих з КК. Широкого поширення набуло використання стовбурових клітин кордової крові людини для лікування пацієнтів при цілому ряді онкологічних, імунологічних захворювань, а також гемоглобінопатіях, порушеннях кровотворення та інших патологічних станах. Наукові центри активно вивчають біохімічні особливості, терапевтичну ефективність КК та отриманих з неї клітинних і безклітинних препаратів (Khomenko et al., 2014; Passweg et al., 2014).

Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до використання КК призвела до необхідності створення банків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані при температурі -196°C без втрати їх біологічних властивостей. Проте ефективність криоконсервованих препаратів КК в значній мірі залежить від кількості збережених клітин та їх функціональної активності після розморожування. Ці показники повністю віддзеркалюють, наскільки оптимальними були методи сепарації, обробка криопротектором, криоконсервування, зберігання в замороженому стані та розморожування. Тому особливу увагу науковці приділяють безпосередньо підготовці КК до тривалого зберігання й вибору оптимальних технологій криоконсервування її зразків (Armitage, 2015).

Для заморожування ядровмісних клітин (ЯВК) КК, до складу яких входять і стовбурові гемопоетичні, найбільш широко використовується криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) в концентраціях 7,5–15 % (Nayakawa et al., 2010; Yamaguchi et al., 2014). Однак еквілібрація клітинної суспензії з ДМСО здатна викликати порушення структурно-функціональних і метаболічних властивостей клітин, призводячи до втрати їх збереженості і життєздатності, що зумовлено його токсичністю. Одним із проявів токсичного ефекту, окрім руйнування плазматичної мембрани з наступним некрозом, викликаним формуванням внутрішньоклітинного льоду й дією осмотичного стресу, може бути накопичення високих концентрацій активних форм кисню (АФК), які здатні призвести до ініціації апоптозу та загибелі клітин як до, так і після криоконсервування (Kim et al., 2015). В результаті збільшення в клітинах вільних радикалів може відбуватися порушення енергетичного стану та пошкодження мембран клітин через перекисне окислення ліпідів, а також пошкодження ДНК, що призводить до апоптозу. Тому дуже важливим є запобігання їх накопиченню вже на етапі еквілібрації з криопротектором, що дозволить уникнути або сповільнити розвиток окислативного стресу.

Виходячи з вище наведеного, метою роботи була оцінка збереженості, життєздатності та кількості клітин з надмірним вмістом активних форм кисню до та після криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові з різними концентраціями ДМСО.

Об'єкти та методи дослідження

Використовувалася КК людини, отримана після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі. Матеріал заготовляли на консерванті "CPD". Клітинну суспензію ядровмісних клітин отримували шляхом седиментації еритроцитів КК з використанням 6% розчину декстрану з молекулярною масою 60000 (поліглюкін). Для криоконсервування використовували проникаючий криопротектор ДМСО у концентраціях 2,5; 5; 7,5; 10 та 15%. Заморожування проводили в програмному заморожувачі "Cryoson" (Німеччина) зі швидкістю $1-3^{\circ}\text{C}$ в хвилину до -80°C , з наступним зануренням у рідкий азот. Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва згідно стандартної методики (Basic Cell Culture, 2002). Для оцінки CD45⁺-клітин і їх життєздатності використовували стандартний протокол імунофенотипування з використанням CD45FITC і 7AAD (Schmid et al., 1992). АФК в клітинах визначали методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD, США) по накопиченню високолюмінесцентного 2',7'-дихлорофлуоресцеїну (ДСФ). Приготування розчину ДСФ проводили на ДМСО. Додаткова концентрація ДМСО після внесення ДСФ в пробу не перевищувала 0,025%. Після внесення розчину ДСФ клітинну суспензію інкубували 30 хв. на водяній бані при 37°C у темряві. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми BD - CELLQuest Pro (Soh, 2006). Для моделювання трансфузії частину клітин після розморожування переносили у розчин Хенкса та інкубували при 37°C протягом 1 години. Розведення складало 1:10.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера, з використанням програми Excel.

Результати та обговорення

Як вже було зазначено вище, внаслідок впливу на ядровмісні клітини фізико-хімічних факторів кріоконсервування при сепарації, еквілібрації з кріопротектором, програмному заморожуванні та відігріванні відбувається порушення метаболічних процесів, одним з проявів якого може бути збільшення в клітинах кількості активних форм кисню.

У фізіологічних умовах шкідливі ефекти АФК мінімізуються захисними механізмами антиоксидантної системи, яка інактивує їх і запобігає надмірному накопиченню. Однак, дисбаланс в прооксидантно/антиоксидантній рівновазі здатний приводити до окислювального стресу (Schieber, Chandel, 2014). Отже, дуже важливим завданням для науковців є моніторинг їх вмісту під час впливу фізико-хімічних факторів кріоконсервування.

Рядом авторів було показано, що флуоресцентні зонди особливо ефективні для цих цілей. У зв'язку з цим багато барвників було синтезовано і використано для вимірювання АФК (Bartosz, 2006). Однак тільки деякі зонди пройшли комплексну оцінку і отримали широке визнання у дослідників. Одним з найбільш популярних є 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат (DCFH2-DA) (Chen et al., 2010). Проте навіть при широкому застосуванні в біологічних дослідженнях існують суперечливі дані щодо методичних підходів по визначенню АФК в різних клітинах: немає єдиної думки в питанні пробопідготовки перед аналізом на проточному цитофлуориметрі (оптимальна концентрація ДСФ, використовувана для аналізу, умови інкубації клітин із зондом, необхідність відмивання клітин від флуоресцентного барвника) (Wardman, 2007).

Виходячи з вище сказаного, нами була проведена серія експериментів з відпрацювання оптимальної методики визначення АФК в ЯВК КК за допомогою ДСФ.

Оскільки найчастіше використовують концентрації ДСФ від 3 до 30 мкМ, нами були проаналізовані результати, отримані при використанні наступних концентрацій барвника: 2,5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ і 35 мкМ (Kalyanaraman et al., 2012; Rhee et al., 2010; Shen et al., 2013; Tetz et al., 2013). Аналіз проводився в наступних експериментальних групах (рис. 1):

- А. Контроль – клітини, виділені декстраном (експ. група – «контр.»);
- Б. Клітини, виділені декстраном і оброблені 7,5% ДМСО (експ. група – «ДМСО»);
- В. Клітини, виділені декстраном, оброблені 7,5% ДМСО і кріоконсервовані зі швидкістю 1–3°C/хв. (експ. група – «3°C/хв.»);
- Г. Клітини, виділені декстраном, оброблені 7,5% ДМСО і кріоконсервовані прямим зануренням у рідкий азот (експ. група – «LN₂»).

Результати експериментів представлені на рис. 1.

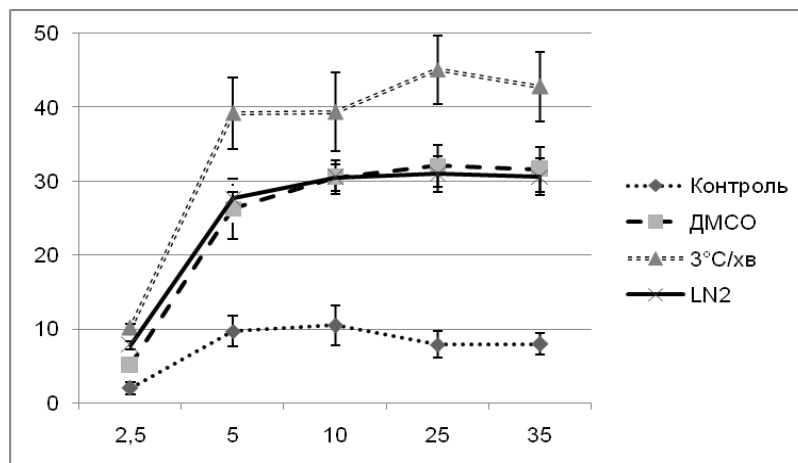


Рис. 1. Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню залежно від концентрації ДСФ в пробі, %

Із рис. 1 видно, що при внесенні ДСФ в концентрації 2,5 мкМ спостерігалася мінімальна кількість ДСФ⁺-клітин. Зі збільшенням концентрації до 5 мкМ відбувалося різке їх збільшення. Подальше зростання концентрації ДСФ не призводило до достовірних змін досліджуваного показника.

Таким чином, ми встановили, що оптимальною концентрацією ДСФ для оцінки числа ядерних клітин кордової крові, що містять надмірну кількість АФК, є 5 мкМ.

Ще одним дискусійним питанням залишається необхідність відмивання клітинної суспензії від даного флуоресцентного зонда. Ряд авторів вказує на необхідність проведення даної маніпуляції, інші її виключають, обґрунтовуючи свій вибір можливістю елімінації частини клітин з аналізу внаслідок видалення їх з супернатантом і, як наслідок, викривлення «реальної картини». У зв'язку з цим нами була проведена перевірка необхідності відмивання клітин від даного флуоресцентного барвника. З цією метою після інкубації клітинної суспензії з ДСФ було проведено м'яке осадження клітин центрифугуванням при 800 об/хв. протягом 5 хв. з подальшим видаленням супернатанта і внесенням 1 мл фізіологічного розчину. Як видно з рис. 2, у невідмитій суспензії ЯВК спостерігаються підвищені показники неспецифічної флуоресценції, що унеможливує коректний аналіз цитограм і дозволяє зробити висновок про необхідність відмивання суспензії клітин від ДСФ, оскільки після відмивання на логарифмічній шкалі цитограм спостерігається чітка межа між забарвленими і незабарвленими клітинами.

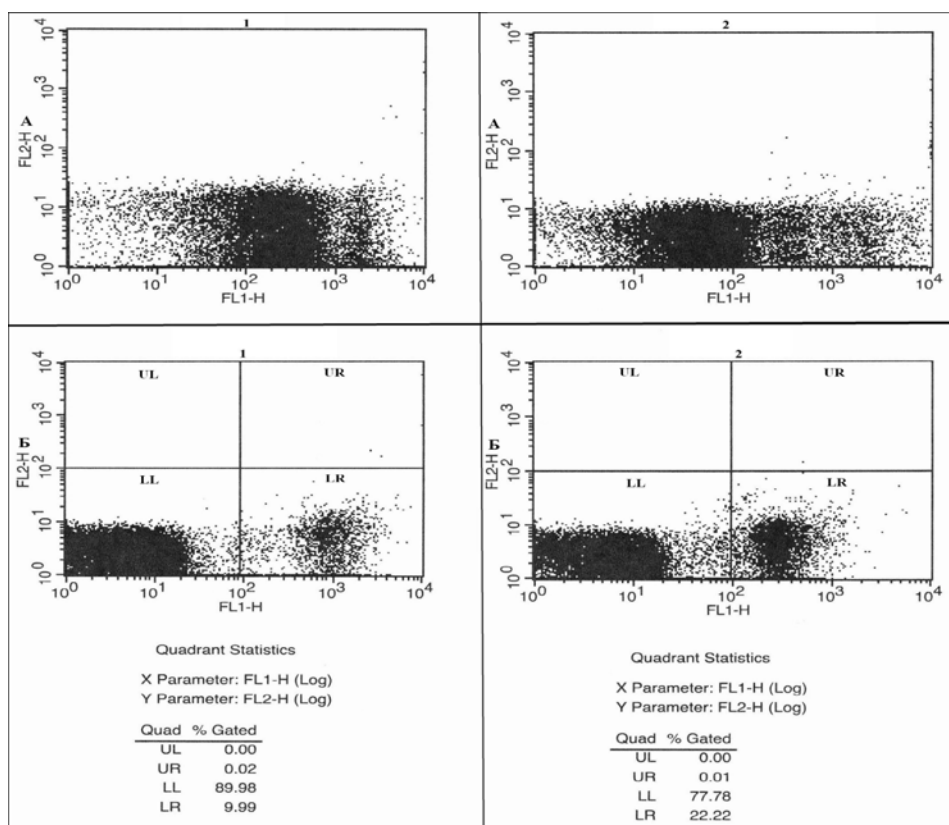


Рис. 2. Цитограми ядровмісних клітин невідмитих (А) та відмитих від ДСФ (Б). 1. ядровмісні клітини, виділені декстраном. 2. ядровмісні клітини, оброблені 5% ДМСО

Найбільш часто для криоконсервування ЯВК КК використовується проникаючий криопротектор ДМСО. Його захисна дія ґрунтується на високій швидкості проникнення через клітинну мембрану та утворенні великої кількості водневих зв'язків з молекулами рідкої фази клітини. Це призводить до зниження ймовірності утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, а також до зниження ефекту концентрування внутрішньоклітинних солей при негативних температурах, що зменшує ступінь крипошкодження клітини (Chen et al., 2016). Однак, крім криозахисних властивостей, ДМСО має токсичну дію по відношенню до біооб'єктів, викликаючи порушення структурно-функціональних і метаболічних властивостей клітин, призводячи до втрати їх збереженості і життєздатності (Fry et al., 2015). Слід зазначити, що ступінь токсичного ефекту безпосередньо залежить від концентрації ДМСО, а також температурних режимів еквілібрації. Крім того, наявні в даний час протоколи

кріоконсервування ЯВК КК використовують концентрацію ДМСО, час еквілібрації з ним та програму кріоконсервування, встановлену для прогеніторних клітин кісткового мозку та периферичної крові. Кріоконсервування за цими протоколами може призводити до втрат до 50% популяції ядерних клітин КК, а враховуючи обмежений обсяг при заготівлі, такі втрати неприйнятні.

Виходячи з цього, нашим наступним завданням була оцінка впливу різних концентрацій проникаючого кріопротектора ДМСО на структурно-функціональні властивості і життєздатність ЯВК КК на етапі еквілібрації. У нашій роботі ми використовували ДМСО в концентраціях 2,5–15 % і час інкубації 0–60 хвилин.

При дослідженні впливу різних концентрацій ДМСО і часу еквілібрації з ним на збереження ЯВК, можна констатувати той факт, що збільшення як концентрації кріопротектору, так і часу еквілібрації з ним (особливо після 30 хв.) викликає зниження кількості клітин (табл. 1). Ці зміни більш виражені при підвищенні концентрації ДМСО, особливо до 10 і 15%.

Таблиця 1.
Збереженість та життєздатність ядровмісних клітин кордової крові залежно від концентрації ДМСО і часу еквілібрації

Концентрація ДМСО, %		Час інкубації, хв.				
		0	15	30	45	60
2,5	А	99,6±2,4	99,2±1,09	98,8±0,91	98,8±1,23	97,6±1,63
	Б	97,2±1,48	96,1±1,42	95,6±1,58	95,0±1,74	95,8±0,92
5	А	98,8±0,96	98,8±0,92	98,4±0,76	96,4±1,41	95,6±0,76*
	Б	97,0±0,8	95,3±0,64*	94,5±1,42*	94,6±0,98*	96,0±1,17
7,5	А	96,4±1,38	95,6±0,76	95,6±2,8	91,6±0,75*	87,6±2,37*
	Б	96,6±0,64	95,3±1,8	94,4±2,13	94,7±1,31	96,2±1,45
10	А	96,4±0,78	96,0±0,86	87,6±2,92*	83,7±2,15*	71,7±2,92*
	Б	95,5±0,92	94,6±0,78	92,0±1,74*	92,8±1,45*	95,5±1,4
15	А	95,6±2,12	91,6±1,98	83,7±2,48*	72,5±2,98*	65,3±2,54м
	Б	95,3±2,32	94,7±1,91	91,8±1,62	92,9±1,74	95,0±0,68

*Примітка: А – збереженість (%); Б – життєздатність (%). Дані представлені у відсотках, у вигляді М±SE. * – результати відрізняються від нульвої точки інкубації з ДМСО з рівнем p<0,05.*

Аналіз життєздатності показав (табл. 1), що до 30 хв. інкубації з ДМСО відбувається недостовірне зниження даного параметра, але подальше збільшення числа життєздатних клітин вказує лише на відносність цього показника, пов'язаного з руйнуванням частини клітин, що йдуть в аналіз (про що свідчать дані зі збереженості).

Як вже говорилося раніше, одним із проявів токсичності кріопротектора може бути накопичення високих концентрацій АФК, які здатні привести до розвитку апоптозу і загибелі клітин, як на стадії обробки кріопротектором, так і при заморожуванні-відігріванні. Виходячи з цього, визначення їхнього вмісту може бути одним з ключових інтегральних параметрів оцінки стану ЯВК КК.

Отримані дані по визначенню кількості клітин з надмірним вмістом АФК показали, що зі збільшенням концентрації ДМСО і часу еквілібрації з ним відбувається достовірне збільшення даного показника (рис. 3), що може вказувати як на розвиток окисного стресу, так і на інгібування антиоксидантної системи в клітинах.

Найбільш небезпечними етапами для клітин при кріоконсервуванні є стадії безпосередньо заморожування і розморожування. Основна маса ушкоджень клітинних структур в період заморожування прямо або опосередковано пов'язана з утворенням кристалів льоду, в результаті чого живі системи піддаються впливу комплексу факторів. Серед них суттєве значення мають внутрішньоклітинна кристалізація і, як наслідок, гіперконцентрація солей, зміна іонної сили розчину, зміна величини рН, дегідратація та фазові перетворення біополімерів і надмолекулярних структур. Всі ці зміни здійснюють дуже сильний «стресовий вплив» на клітини, в результаті яких змінюються властивості мембранної поверхні, структурної впорядкованості ліпідів, конформації периферичних та інтегральних білків, відбувається дисбаланс прооксидант-антиоксидантної системи клітини та інші зміни. Тому основним завданням кріобіологів при розробці технологій кріоконсервування є мінімізація факторів, що призводять до розвитку патологічних і незворотних процесів в клітинах.

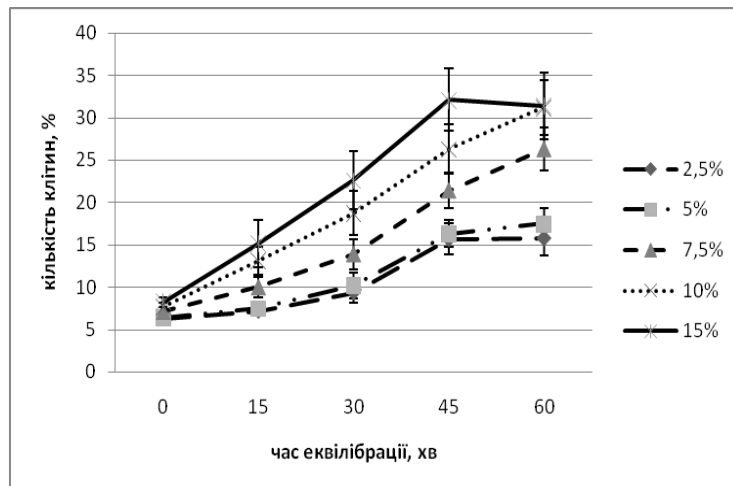


Рис. 3. Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові залежно від концентрації ДМСО і часу еквілібрації

Виходячи з цього, наступним нашим завданням було оцінити ефективність криоконсервування ЯВК КК в криозахисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО, за визначенням збереженості, життєздатності клітин і кількості ЯВК з надмірним вмістом АФК.

Результати проведених експериментів показали (табл. 2), що найвищі показники збереженості та життєздатності спостерігалися при заморожуванні суспензії клітин з 7,5% розчином ДМСО, що відповідає даним криобанків, які криоконсервують кордову кров.

Таблиця 2.
Збереженість і життєздатність ядровмісних клітин кордової крові після заморожування з ДМСО різної концентрації

Концентрація ДМСО, %	Збереженість	Життєздатність
2,5	47,2±3,7	21,8±5,1
5	70,5±2,7	75,2±3,9
7,5	78,0±4,1	78,5±4,2
10	77,6±3,9	76,9±3,1
15	73,0±3,7	72,1±3,8

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$.

На наступному етапі були проведені експерименти з оцінки числа клітин, що містять надмірну кількість АФК. Заморожування-відігрівання призводить до більш вираженого збільшення вмісту АФК в ЯВК КК, порівняно з даними, отриманими до криоконсервування (табл. 3).

Максимальна кількість клітин з надлишковим вмістом АФК спостерігалася при криоконсервуванні з 5% ДМСО. Дані, отримані при заморожуванні з 7,5, 10 та 15% ДМСО, достовірно не відрізнялися. Слід зазначити, що мінімальна кількість клітин з надмірним вмістом АФК була в пробі, криоконсервованій з 2,5% ДМСО. Це вказує виключно на те, що при даному методі заморожування відбувається значна втрата клітин через вкрай недостатню концентрацію криопротектора, в результаті чого залишається популяція максимально криостійких клітин.

Після отриманих нами результатів було доцільним вивчити збереженість, життєздатність і вміст АФК в клітинах ЯВК після моделювання трансфузії. Для цього використовували просту модель, відтворюючи в експерименті лише основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином в кровоносному руслі реципієнта; ізоосмотичність середовища та температуру інкубації (37°C). Підтримка температури 37°C протягом усього періоду інкубування клітин – важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму,

оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс в клітинному метаболізмі в силу уповільнення функціональної активності практично всіх процесів при зниженні температури. Так само слід зазначити, що відносна нетривалість трансфузії (1 година) все ж здатна забезпечити цілком задовільні умови для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК КК в фізіологічних умовах. Для цих цілей частину клітин після розморожування переносили в розчин Хенкса та інкубували при 37°C протягом 1 години. Як видно з табл. 4, отримані результати в значній мірі залежать від концентрації кріопротектора, яка використовувалась при заморожуванні.

Таблиця 3.

Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові до і після заморожування-відігрівання в залежності від концентрації ДМСО

Концентрація ДМСО, %	Вміст АФК до кріоконсервування	Вміст АФК після кріоконсервування
2,5	4,9±1,8	17,1±4,6
5	7,5±2,1	29,5±2,7
7,5	10,3±1,8	20,6±2,1*
10	12,4±1,3*	21,2±1,7*
15	12,8±1,6*	22,1±1,9*

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – достовірно по відношенню до проб, кріоконсервованих з 5% ДМСО.

Таблиця 4.

Збереженість, життєздатність і кількість клітин з надмірним вмістом АФК в ЯВК КК після заморожування з ДМСО різної концентрації та проведення трансфузії

Конц. ДМСО, %	Збереженість	Життєздатність	Вміст АФК
2,5	24,1±8,4	38,4±6,5	7,5±2,4
5	54,3±3,8	61,7±2,1	14,1±3,3
7,5	71,5±3,9*	75,6±5,3*	18,9±1,2
10	75,1±5,9*	72,3±4,7*	23,4±6,1*
15	70,4±4,6*	70,8±3,7*	21,5±4,2*

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – достовірно по відношенню до проб, кріоконсервованих з 2,5 та 5% ДМСО.

Найнижчі показники були в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО, а найкращі – при кріоконсервуванні з 7,5, 10 і 15% ДМСО, хоча навіть в цих експериментальних групах як абсолютні втрати клітин, так і їх життєздатність були достовірно нижчими, ніж відразу після розморожування.

Виходячи з отриманих результатів, нами було встановлено, що в процесі кріоконсервування відбувається зниження збереженості і життєздатності ЯВК. І чим менше оптимізоване кріозахисне середовище (не досягнута або перевищена ефективна концентрація кріопротектора), тим ці зміни більш виражені. Однією з причин цього є накопичення АФК, ймовірно в силу інгібування АОС при впливі фізико-хімічних стрес-факторів кріоконсервування.

У зв'язку із отриманими результатами доцільно буде провести дослідження з оцінки ефективності внесення антиоксидантів в кріозахисні розчини з метою зменшення накопичення АФК і запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Висновки

1. Проведені дослідження дозволили відпрацювати методичні підходи щодо оцінки кількості ядровмісних клітин кордової крові з надмірним вмістом АФК при використанні флуоресцентного барвника 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату.

2. Еквілібрація протягом однієї години ЯВК з різними концентраціями проникаючого кріопротектора ДМСО призводить до зниження збереження і життєздатності клітин. Вираженість цього процесу прямопропорційна концентрації ДМСО і часу еквілібрації з ним.

3. Описані в другому висновку зміни можуть відбуватися за рахунок накопичення в клітинах активних форм кисню, внаслідок інгібування антиоксидантної системи та розвитку окисного стресу.

4. Отримані результати по кількості збережених і життєздатних клітин, а також клітин, що містять надмірну кількість АФК, відразу після криоконсервування та після моделювання трансфузії продемонстрували необхідність розробки технологій криоконсервування з додаванням в криозахисне середовище антиоксидантів з метою запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Список літератури

Armitage S. Cord blood banking standards: autologous versus altruistic // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2015. – no 2. – P.94.

Basic cell culture. A practical approach / Ed. J.M.Davis. – Oxford: Oxford University Press. – 2002. – 382p.

Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol.368. – P. 53–76.

Chen G., Yue A., Ruan Z. et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol.2016. – Article ID 1396783.

Chen X., Zhong H.Z., Xu Z. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy // *Free Radical Research.* – 2010. – Vol.44, no 6. – P. 587–604.

Fry L.J., Querol S., Gomez S.G. et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation // *Vox Sang.* – 2015. – Vol.109, no 2. – P. 181–190.

Hayakawa J., Joyal E.G., Gildner J.F. et al. 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO // *Transfusion.* – 2010. – Vol.50 (10). – P. 2158–2166.

Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Kelvin J.A. Davies et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol.52, no 1. – P. 1–6.

Khomenko V.I., Bychkov V.V., Bazyka D.A. State of development of hematopoietic stem cell transplantation in the Europe and world // *Lik. Sprava.* – 2014. – Vol. 7–8. – P. 117–121.

Kim K.M., Huh J.Y., Hong S.S., Kang M.S. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage // *Transfusion.* – 2015. – Vol.55 (8). – P. 2017–2022.

Passweg J.R., Baldomero H., Peters C. et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – Vol.49, no 6. – P. 744–750.

Rhee S.G., Chang T.S., Jeong W., Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells // *Mol. Cells.* – 2010. – Vol.29, no 6. – P. 539–549.

Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry // *Cytometry.* – 1992. – Vol.13. – P. 204–208.

Schieber M., Chandel N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr. Biol.* – 2014. – Vol.24 (10). – P. 453–462.

Shen W.J., Hsieh C.Y., Chen C.L. et al. A modified fixed staining method for the simultaneous measurement of reactive oxygen species and oxidative responses // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol.430, no 1. – P. 442–447.

Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol.386. – P. 532–543.

Tetz L.M., Kamau P.W., Cheng A.A. et al. Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 2013. – Vol.67, no 2. – P. 56–60.

Yamaguchi R., Takanashi M., Ito M. et al. Plasticizer concentration in cord blood cryopreserved with DMSO // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – Vol.49 (1). – P. 157–158.

Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol.43. – P. 995–1022.

Представлено: Н.Г.Малова / Presented by: N.G.Malova

Рецензент: Ю.Г.Кот / Yu.G.Kot

Подано до редакції / Received: 01.04.2016