

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДУ І ГІДРОКСИЕТИЛКРОХМАЛЮ ЯК ЗАМІННИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ КЛІТИН ІНТЕРСТИЦІЮ СІМ'ЯНИКІВ МИШЕЙ

ВСТУП

Клітини Лейдіга, які синтезують та секретують тестостерон, є важливими з точки зору розвитку чоловічої статевої системи і підтримання її нормальної функції. Різноманітні аномалії чоловічої статевої системи (наприклад, крипторхізм) та шкідливі фактори навколишнього середовища обумовлюють дисфункцію клітин Лейдіга, що в свою чергу призводить до захворювань, пов'язаних із недостатністю андрогенів [1]. Наприклад, було продемонстровано, що аналоги естрогенів, такі як бісфенол А, можуть знижувати продукцію сперматозоїдів, порушуючи функцію клітин Лейдіга і пригнічуючи секрецію тестостерону [2]. Ожиріння також може знижувати кількість клітин Лейдіга і секрецію тестостерону та погіршувати репродуктивну функцію [3].

Сьогодні замісна гормональна терапія використовується для лікування захворювань, пов'язаних зі зниженням секреції чоловічих гормонів. Однак терапія гормональними засобами має низку недоліків. По-перше, концентрація екзогенних гормональних препаратів не контролюється ні гіпофізом, ні гіпоталамусом. Після введення екзогенного тестостерону його концентрація в крові значно перевищує фізіологічну норму, а перед уведенням наступної дози зменшується до дуже низького рівня [4]. Також відсутні добові цикли вивільнення гормонів [5].

В деяких дослідженнях показано, що ізольовані клітини інтерстицію (KI) яєчка, імплантовані до яєчка реципієнта, сприяли відновленню рівня тестостерону [6, 7]. Однак через нестачу джерел цих клітин та етичні проблеми популяризація і застосування клітинної трансплантації в клінічній практиці дуже обмежена [8]. Використання кріоконсервованих клітин і створення низькотемпературних запасів клітин для трансплантації може сприяти їх застосуванню в клінічній практиці, а також дає можливість тестувати клітинні препарати на предмет вірусної або бактеріальної контамінації перед використанням.

Існуючі методи кріоконсервування клітин базуються на використанні ксеногенних компонентів – сироватки або сироваткового альбуміну [9, 10]. Це може бути серйозною

перешкодою для застосування цих клітин у практиці, оскільки ксеногенні компоненти пов'язані з високим ризиком перенесення інфекції [11–14]. Сироватка та її похідні можуть призводити до варіювання складу розчинів при виготовленні різних партій кріоконсерванта [15].

Таким чином, для кріоконсервування KI сім'яників необхідно розробити ефективний і безпечний кріоконсервант. Для цього, по-перше, необхідно виключити ксеногенні компоненти (сироватку та її похідні), а, по-друге – знизити концентрацію кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО), який також чинить токсичну дію [16]. Перспективним рішенням цієї проблеми є використання у складі кріозахисного середовища високомолекулярних сполук, що було показано у ряді робіт [17–19]. Такими сполуками можуть бути поліетиленоксид (ПЕО) та гідроксиетилкрохмаль (ГЕК), використання та низьку токсичність яких було показано при кріоконсервуванні деяких біологічних об'єктів [20–22].

Метою дослідження стало вивчення впливу ГЕК і ПЕО на показники збереженості клітин інтерстицію сім'яників мишей під час кріоконсервування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для отримання KI сім'яників 25 дорослих мишей-донорів виводили з експерименту за допомогою цервікальної дислокації та занурювали у 70% етанол (Vishpha, Україна) на 5 хв. Після цього діставали сім'яники з черевної порожнини, видаляли їхню білкову оболонку та кровоносні судини. Вміст сім'яників поміщали в центрифужні пробірки об'ємом 15 мл, які мали ферментний розчин з розрахунку 4 мл розчину на кожний сім'яник. Ферментний розчин містив 0,2 мг/мл колагенази типу I (Sigma-Aldrich, США) і 0,1 мг/мл ДНКазу (Sigma-Aldrich) на середовищі Ham's/F12 (PAA, Австрія). Сім'яники витримували на водяній бані при температурі 34 °C протягом 10 хв. Після інкубування у кожну пробірку додавали 10 мл середовища Ham's/F12, сім'яні каналці видаляли за допомогою фільтрації через подвійну нейлонову сітку з діаметром пор близько 100 мкм. Фільтрати, що містили клітини інтер-

О.В. ПАХОМОВ

к. біол. н., старший науковий співробітник, старший дослідник відділу кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, доцент кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, доцент кафедри фундаментальних та загальнонаукових дисциплін ПВНЗ «Харківський міжнародний медичний університет», м. Харків
ORCID: 0000-0002-7494-654X

Є.Р. ГРАБОВЕЦЬКА

к. біол. н., доцент кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, м. Харків
ORCID: 0000-0001-6456-0646

Н.І. ФІЛІМОНОВА

д. мед. н., професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків
ORCID: 0000-0001-7447-6579

Н.В. ДУБІНІНА

к. мед. н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків
ORCID: 0000-0002-0022-6830

О.Г. ГЕЙДЕРІХ

к. мед. н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків
ORCID: 0000-0002-5244-6632

Контакти:

Пахомов Олександр Віталійович
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, відділ кріоендокринології
61016, Харків, Переяславська 23
Тел.: +38 (099) 764 29 96
email: aleksandr.pakhomov2017@gmail.com

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

стицію, центрифугували при 325 г 3 хв при кімнатній температурі. Супернатант видаляли, а осад клітин ресуспендували у 10 мл Ham's/F12 з 10 МО/мл пеніциліну (Корпорація «Артеріум», Україна) і 100 мкг/мл стрептоміцину (Корпорація «Артеріум», Україна). Процедуру седиментації повторювали двічі.

Для кріоконсервування використовували кріоконтейнери (Nunc, Данія) об'ємом 1,8 мл. Об'єм клітинної суспензії складав 1 мл. Кількість клітин у кожному зразку складала 2×10^6 . ДМСО, ГЕК (М.м. 200 000 Да), ПЕО (М.м. 400 000 Да), фетальну телячу сироватку (ФТС) (Biowest, Франція) використовували як кріозахисні сполуки. Для приготування кріозахисних розчинів використовували середовище Ham's/F12.

Охолодження зразків здійснювали за допомогою програмного охолоджувача ЗП-10 (Дослідне виробництво при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України) до температури -80°C зі швидкістю $1^\circ\text{C}/\text{хв}$. Після цього їх витримували при температурі -80°C протягом 15 хв і занурювали в рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 37°C до зникнення кристалічної фази.

Розморожені клітинні суспензії відмивали від кріозахисного розчину шляхом його поступового розведення середовищем Ham's/F12. Після розведення суспензію центрифугували при 325 г 3 хв та видаляли супернатант. Клітини ресуспендували у Ham's/F12 та знову проводили процедуру центрифугування. Після відмивання кінцевий об'єм суспензії доводили до 1 мл середовищем Ham's/F12.

Життєздатність КІ вимірювали за допомогою барвника трипанового синього (Sigma-Aldrich, США), який додавали до клітин у співвідношенні 1:1 (кінцева концентрація 2 мг/мл). Кількість клітин підраховували в камері Горяєва.

Загальне збереження (З) клітин визначали за формулою:

$$Z = K_1/K_2 \times 100\%$$

де K_1 – загальна кількість клітин після кріоконсервування; K_2 – загальна кількість клітин перед кріоконсервуванням.

Збережену життєздатність клітин (ЗЖ) визначали за формулою:

$$ZJ = K_1/K_2 \times 100\%$$

де K_1 – кількість клітин, які не були забарвлені трипановим синім після кріоконсервування; K_2 – кількість клітин, які не були забарвлені трипановим синім перед кріоконсервуванням.

Гістохімічне дослідження активності 3β -гідроксистероїддегідрогенази (ГСД) проводили за методом, описаним G.R. Klinefelter et al. [23]. Цей фермент необхідний для синтезу стероїдних гормонів, а отже, може слугувати маркером стероїдопродукуючих клітин сім'яника (клітин Лейдіга). Для дослідження 50 мкл клітинної суспензії наносили на предметне скло і висушували не менш ніж 1 годину при кімнатній температурі. Після повного висихання клітини вкривали сумішшю розчинів 1 і 2. Розчин 1 містив 1 мг нітросинього тетразолію, який розчиняли у 0,6 мл розчину дегідроепіандростерону (1 мг/мл) на основі ДМСО. Розчин 2 містив 10 мг β -нікотинамідаденіндинуклеотиду, який розчиняли у 9,5 мл теплового натрій-фосфатного буфера. Безпосередньо перед використанням ці два розчини змішували. Клітини забарвлювали протягом 2 годин, після чого скло ополіску-

вали водою. Клітини фіксували у 10% розчині формаліну в натрій-фосфатному буфері з 5% сахарозою протягом 1 хв. Далі на них наносили суміш гліцерину з натрій-фосфатним буфером у співвідношенні 1:1, покривали покривним склом та підраховували клітини у полі зору за допомогою мікроскопу (Olimpus IX 71, США) при збільшенні окуляра $\times 10$ і збільшеннях об'єктива $\times 20$, $\times 40$ та $\times 60$.

Збереженість ГСД⁺-клітин (ЗГ) визначали за формулою:

$$ZG = K_1/K_2 \times 100\%$$

де K_1 – кількість ГСД⁺-клітин після кріоконсервування; K_2 – кількість ГСД⁺-клітин перед кріоконсервуванням.

Усі дані на діаграмах представлені як медіана, 25%, 75% проценти, мінімальне та максимальне значення. Для визначення відмінностей використовували критерій Краскала-Волліса. Додатково дані ранжували, після чого використовували критерій Ньюмена-Кейлса для множинних порівнянь. Усі розрахунки було здійснено за допомогою пакета програм Statistica 6.0 (Tulsa, OK, USA).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що ДМСО є одним із найпоширеніших кріопротекторів, що використовуються для кріоконсервування ендокринних тканин, зокрема для клітин сім'яника, але оптимальні концентрації ДМСО, необхідні для захисту клітин під час кріоконсервування, різняться [9, 10]. У роботах J. Tai та G.R. Chen et al. була також запропонована швидкість охолодження клітин Лейдіга $1^\circ\text{C}/\text{хв}$. Тому першим етапом роботи було виявлення впливу різних концентрацій проникального кріопротектора ДМСО на показники збереженості КІ при використанні швидкості охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ (рис. 1).

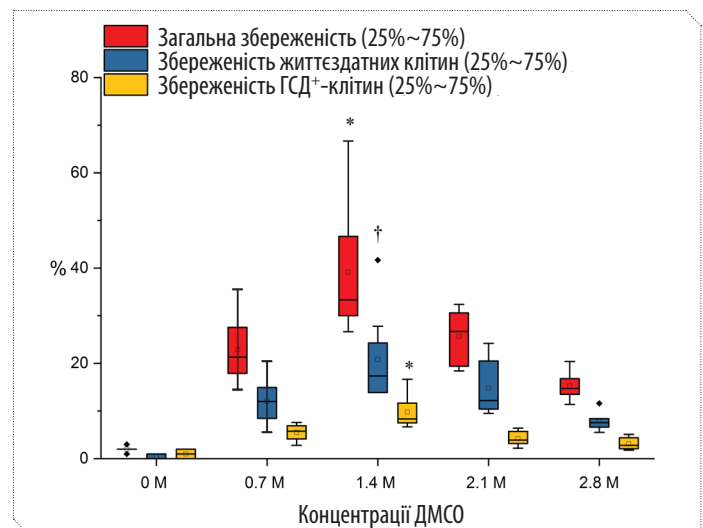


Рисунок 1. Збереженість клітин інтерстицію сім'яника після кріоконсервування з різними концентраціями ДМСО

*розбіжності значущі відносно розчинів з 0; 0,7; 2,1; 2,8 М ДМСО, $p \leq 0,05$;

†розбіжності значущі відносно розчинів з 0; 0,7; 2,8 М ДМСО, $p \leq 0,05$

З представлених даних видно, що використання ДМСО достовірно збільшувало загальну збереженість, збереженість життєздатних і ГСД⁺-клітин у зразку. Найкращий ефект мав ДМСО у концентрації 1,4 М. При використанні цих концентрацій ДМСО загальна збереженість, збереженість життєздатних і ГСД⁺-клітин сягала 33,3 (30,0; 46,7), 17,4 (13,9; 24,3), 8,3 (7,5; 11,7) % відповідно. Менші концентрації ДМСО

(0; 0,7 М) були малоефективні, більші (2,1, 2,8 М) – знижували збереженість КІ. Це зниження пов'язано з широко відомою токсичною дією кріопротекторів у концентраціях, що перевищують оптимальну [24].

Наступним етапом була оцінка впливу добавок до кріопротекторного розчину – сироватки та її потенційних замінників – ГЕК, ПЕО (рис. 2).

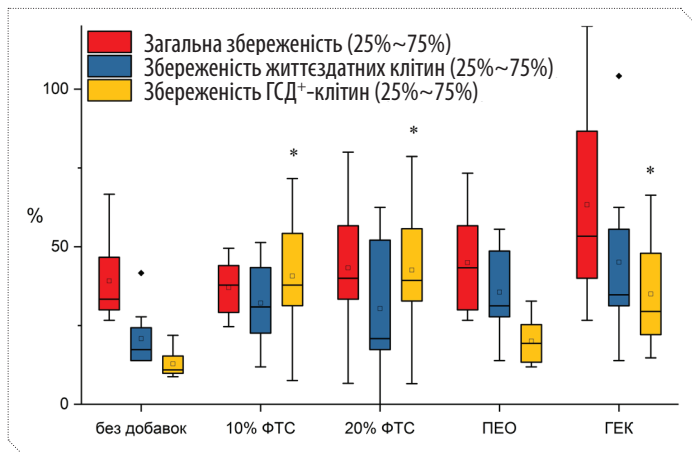


Рисунок 2. Збереженість КІ сім'яника після кріоконсервування з 1,4 М ДМСО та добавками

*розбіжності значущі відносно розчину без добавок, $p \leq 0,05$

Як видно з представлених даних, додавання до розчину кріоконсервування з 1,4 М ДМСО 10% ФТС, 20% ФТС або 10 мг/мл ГЕК мало позитивний вплив на показники збереженості КІ, особливо збереженість ГСД⁺-клітин – клітин Лейдіга.

Використання ФТС та ГЕК впливало на якість гістохімічного забарвлення цих клітин, що опосередковано відображає збереженість активності ферменту ГСД (рис. 3 А–Г).

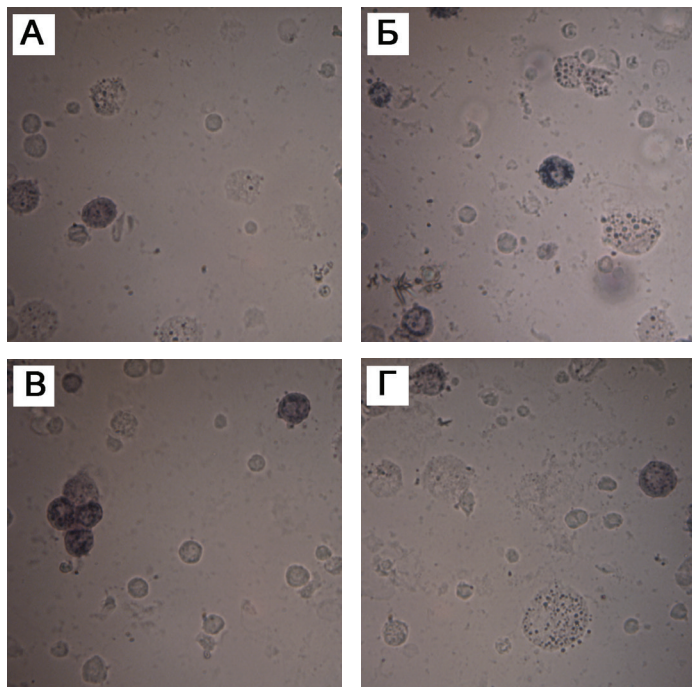


Рисунок 3 А–Г. Гістохімічне забарвлення КІ сім'яників після кріоконсервування у розчинах 1,4 М ДМСО з добавками. А – без добавок; Б – 20% ФТС; В – 10 мг/мл ГЕК; Г – 10 мг/мл ПЕО

Збільшення окуляра $\times 10$, об'єктива $\times 40$

Поширеною думкою є твердження, що сироватка «стабілізує» мембрани під час кріоконсервування, попереджує їхнє осмотичне пошкодження, захищає клітини від дії вільних радикалів, проте механізм цього захисту залишається нез'ясованим [25]. Механізм кріопротекторної дії сироватки пов'язують із наявністю протеїнів плазми, що мають дію непроникальних кріопротекторів під час кріоконсервування [26, 27].

Існують роботи, в яких 6–7% ГЕК розглянуто як замінник протеїнів сироватки крові для кріоконсервування еритроцитів [28, 29]. Нами також використаний цей підхід при обранні концентрацій полімерних сполук – ПЕО та ГЕК, які потенційно можуть заміщувати дію протеїнів сироватки під час кріоконсервування [30], але ПЕО за даних концентрацій виявився неефективним.

Відомо, що ДМСО, навіть у низьких концентраціях, може зменшувати товщину мембрани клітин та індукувати формування тимчасових пор, а у великих – призводити до повної дезінтеграції ліпідного бішару [16]. При використанні ДМСО в клінічній практиці описана велика кількість можливих побічних ефектів, таких як нудота, запаморочення, гарячка [19, 31], а також нейротоксичні ефекти (енцефалопатія) [6, 32]. Тому зменшення концентрації ДМСО у кріозахисному середовищі з одного боку та виключення компонентів сироватки з іншого є доцільним з точки зору зниження негативних ефектів кріозахисного середовища. Через це наступним етапом роботи стало вивчення можливості зменшення концентрацій ДМСО.

Було показано, що зниження концентрацій ДМСО з 1,4 до 0,7 М позитивно впливало на загальну збереженість КІ, збереженість життєздатних клітин та достовірно підвищувало збереженість ГСД⁺-клітин (рис. 4) порівняно з розчином, що містив 1,4 М ДМСО – 57,1 (40,2; 70,3) та 35,0 (22,1; 47,9) %.

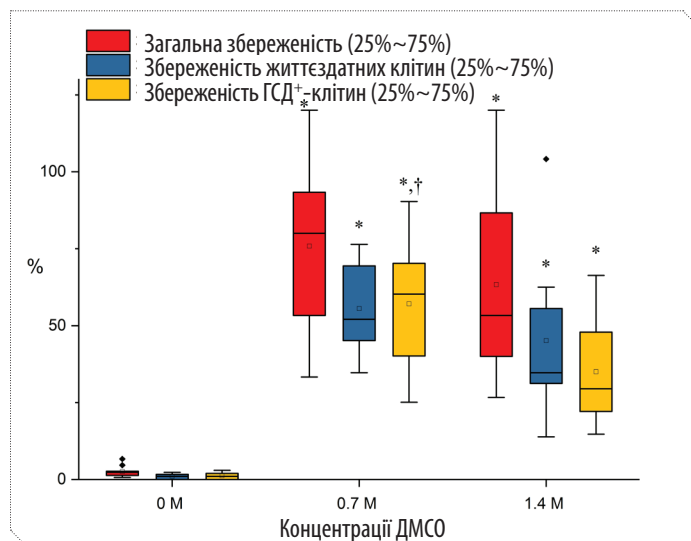


Рисунок 4. Збереженість КІ сім'яника після кріоконсервування з 10 мг/мл ГЕК та різними концентраціями ДМСО

*розбіжності значущі відносно розчину з 0 М ДМСО, $p \leq 0,05$;

†розбіжності значущі відносно розчину з 1,4 М ДМСО, $p \leq 0,05$

Кріоконсервування без ДМСО в присутності ГЕК було неефективним, що демонструє необхідність використання комбінації проникальних і непроникальних кріопротекторних сполук.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що непроникальні кріопротекторні сполуки є необхідними під час кріоконсервування КІ сім'яників щурів.

2. Використання ФТС та ГЕК підвищувало загальну збереженість клітин, збереженість життєздатних та клітин Лейдіга (ГСД⁺-клітин), при цьому використання 10 мг/мл ГЕК у комбінації з 0,7 М ДМСО мало найкращі показники – 75,8

(53,3; 93,3), 55,6 (45,1; 69,4) та 57,1 (40,2; 70,3) % відповідно, а використання ПЕО було неефективним.

3. Застосування високомолекулярних синтетичних полімерів, таких як ГЕК, може заміщувати протекторні властивості сироватки під час кріоконсервування і дозволяє знизити ефективну концентрацію проникаючих кріопротекторів, таких як ДМСО, попереджуючи їхні можливі токсичні ефекти.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Deng, B., Bondarenko, T., Pakhomov, O. "Changes in Sexual Behavior of Orchidectomized Rats Under Influence of Allograft Transplantation of Testicular Interstitial Cell Suspension." *Cell Transplantation* 26.5 (2017): 795–803.
- Pallotti, F., Pelloni, M., Gianfrilli, D., et al. "Mechanisms of Testicular Disruption from Exposure to Bisphenol A and Phthalates." *J Clin Med* 9.2 (2020).
- Kahn, B.E., Brannigan, R.E. "Obesity and male infertility." *Curr Opin Urol* 27.5 (2017): 441–5.
- Snyder, P.J., Lawrence, D.A. "Treatment of male hypogonadism with testosterone enanthate." *J Clin Endocrinol Metab* 51.6 (1980): 1335–9.
- Velázquez, E., Bellabarba Arata, G. "Testosterone replacement therapy." *Arch Androl* 41.2 (1998): 79–90.
- Lo, K.C., Lei, Z., Rao, C.V., et al. "De novo testosterone production in luteinizing hormone receptor knockout mice after transplantation of leydig stem cells." *Endocrinology* 145.9 (2004): 4011–5.
- Jiang, M.H., Cai, B., Tuo, Y., et al. "Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction." *Cell Res* 24.12 (2014): 1466–85.
- Li, X., Xu, A., Li, K., et al. "CXCR4-SF1 bifunctional adipose-derived stem cells benefit for the treatment of Leydig cell dysfunction-related diseases." *J Cell Mol Med* (2020).
- Tai, J., Tze, W.J., Johnson, H.W. "Cryopreservation of rat Leydig-cells for in-vitro and in-vivo studies." *Hormone and Metabolic Research* 26.3 (1994): 145–7.
- Chen, G.R., Ge, R.S., Lin, H., et al. "Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells." *Human Reproduction* 22.8 (2007): 2160–8.
- Dokras, A., Sargent, I.L., Redman, C.W., Barlow, D.H. "Sera from women with unexplained infertility inhibit both mouse and human embryo growth in vitro." *Fertil Steril* 60.2 (1993): 285–92.
- Kemmann, E. "Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and assisted reproductive technology (ART). Quantification of risks as part of informed consent." *Hum Reprod* 13.7 (1998): 1777.
- Leung, P.C., Gronow, M.J., Kellow, G.N., et al. "Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development." *Fertil Steril* 41.1 (1984): 36–9.
- van Os, H.C., Drogendijk, A.C., Fetter, W.P., et al. "The influence of contamination of culture medium with hepatitis B virus on the outcome of in vitro fertilization pregnancies." *Am J Obstet Gynecol* 165.1 (1991): 152–9.
- Snyman, E., Van der Merwe, J.V. "Endotoxin-polluted medium in a human in vitro fertilization program." *Fertil Steril* 46.2 (1986): 273–6.
- Gurtovenko, A.A., Anwar, J. "Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide." *J Phys Chem B* 111.35 (2007): 10453–60.
- Petrenko, Y. "Cryopreservation of Human Embryonic Liver Cells Using DMSO and High Molecular Weight Polymers." *Problems of Cryobiology and Cryomedicine* 3 (2003): 80–7.
- Liu, Y., Xu, X., Ma, X.H., et al. "Effect of various freezing solutions on cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species." *Cryo Letters* 32.5 (2011): 425–35.
- Scheinkönig, C., Kappicht, S., Kolb, H.J., Schleuning, M. "Adoption of long-term cultures to evaluate the cryoprotective potential of trehalose for freezing hematopoietic stem cells." *Bone Marrow Transplant* 34.6 (2004): 531–6.
- Graham, J.E., Meola, D.M., Kini, N.R., Hoffman, A.M. "Comparison of the effects of glycerol, dimethyl sulfoxide, and hydroxyethyl starch solutions for cryopreservation of avian red blood cells." *Am J Vet Res* 76.6 (2015): 487–93.
- Imaizumi, K., Nishishita, N., Muramatsu, M., et al. "A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol." *PLoS One* 9.2 (2014): e88696.
- Lee, Y.A., Kim, Y.H., Kim, B.J., et al. "Cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells in dimethylsulfoxide and polyethylene glycol." *Biol Reprod* 89.5 (2013): 109.
- Klinefelter, G.R., Hall, P.F., Ewing, L.L. "Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by a multistep procedure." *Biol Reprod* 36.3 (1987): 769–83.
- Best, B.P. "Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions." *Rejuvenation Res* 18.5 (2015): 422–36.
- Liu, Y., Xu, X., Ma, X., et al. "Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions." *Biotechnol Prog* 26.6 (2010): 1635–43.
- Zakharov, B., Fisyuk, A., Fitch, A., et al. "Ice Recrystallization in a Solution of a Cryoprotector and Its Inhibition by a Protein: Synchrotron X-Ray Diffraction Study." *J Pharm Sci* 105.7 (2016): 2129–38.
- Park, S., Lee, D.R., Nam, J.S., et al. "Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells." *Cryobiology* 81 (2018): 65–73.
- Lionetti, F.J., Hunt, S.M. "Cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch // *Cryobiology*." 12.2 (1975): 110–8.
- Lionetti, F.J., Hunt, S.M., Mattaliano, R.J., Valeri, C.R. "In vitro studies of cryopreserved baboon granulocytes." *Transfusion* 18.6 (1978): 685–92.
- Bruyère, P., Baudot, A., Joly, T., et al. "A chemically defined medium for rabbit embryo cryopreservation." *PLoS One* 8.8 (2013): e71547.
- Ferrucci, P.F., Martinoni, A., Cocorocchio, E., et al. "Evaluation of acute toxicities associated with autologous peripheral blood progenitor cell reinfusion in patients undergoing high-dose chemotherapy." *Bone Marrow Transplant* 25.2 (2000): 173–7.
- Chen-Plotkin, A.S., Vossel, K.A., Samuels, M.A., Chen, M.H. "Encephalopathy, stroke, and myocardial infarction with DMSO use in stem cell transplantation." *Neurology* 68.11 (2007): 859–61.

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДУ І ГІДРОКСИЕТИЛКРОХМАЛЮ ЯК ЗАМІННИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ КЛІТИН ІНТЕРСТИЦІЮ СІМ'ЯНИКІВ МИШЕЙ

О.В. Пахомов, к. біол. н., старший науковий співробітник, старший дослідник відділу кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, доцент кафедри біохімії ХНУ ім. В.Н. Каразіна, доцент кафедри фундаментальних та загальнонаукових дисциплін ПВНЗ «Харківський міжнародний медичний університет», м. Харків
Є.Р. Грабовецька, к. біол. н., доцент кафедри біохімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, м. Харків
Н.І. Філімонова, д. мед. н., професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків
Н.В. Дубініна, к. мед. н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків
О.Г. Гейдеріх, к. мед. н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету МОЗ України, м. Харків

Мета дослідження: вивчити вплив гідроксидилкромалю (ГЕК) (М.м. 200 кДа) та поліетиленоксиду (ПЕО) (М.м. 400 кДа) на показники збереженості клітин інтерстицію (КІ) сім'яників мишей під час кріоконсервування.

Матеріали і методи. При отриманні КІ мишей використовували ферменти: 0,2 мг/мл колагенази і 0,1 мг/мл ДНКазі. Отриману суспензію клітин кріоконсервували в розчинах, що містили 0; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 М диметилсульфоксиду (ДМСО) та/або 10%, 20% фетальну телячу сироватку, 10 мг/мл ПЕО чи ГЕК. Зразки об'ємом 1 мл охолоджували до -80 °С зі швидкістю 1 °С/хв, зберігали у рідкому азоті (-196 °С), відігрівали на водяній бані при температурі 37 °С. Розчин для кріоконсервування видаляли. Кількість КІ та їх збереженість оцінювали перед та після кріоконсервування у камері Горяєва. Життєздатність КІ вимірювали за допомогою барвника трипановий синій, збереженість клітини Лейдига – за допомогою гістохімічного забарвлення на активність β-гідроксистероїддегідрогенази.

Результати. Встановлено, що 1,4 М ДМСО без добавок сприяв найбільшій збереженості КІ. Додавання до розчинів для кріоконсервування 10% і 20% фетальної телячої сироватки або 10 мг/мл ГЕК збільшувало загальну збереженість КІ більш ніж на 10% та збереженість клітин Лейдига у середньому на 15%. Було показано, що при використанні 10 мг/мл ГЕК можливо знизити концентрацію ДМСО до 0,7 М. Ця комбінація мала найкращі показники загальної збереженості КІ, збереженості життєздатних клітин та клітин Лейдига – 75,8 (53,3; 93,3), 55,6 (45,1; 69,4) та 57,1 (40,2; 70,3) % відповідно. Використання ПЕО було неефективним.

Висновок. Застосування високомолекулярних синтетичних полімерів, таких як ГЕК, може заміщувати протекторні властивості сироватки під час кріоконсервування і дозволяє знизити ефективну концентрацію проникаючих криопротекторів, таких як ДМСО.

Ключові слова: кріоконсервування, клітини Лейдига, сім'яники, поліетиленоксид, гідроксидилкромаль.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА И ГИДРОКСИЭТИЛКРАХМАЛА В КАЧЕСТВЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ КЛЕТОК ИНТЕРСТИЦИЯ СЕМЕННИКОВ МЫШЕЙ

А.В. Пахомов, к. биол. н., старший научный сотрудник, старший исследователь отдела криоэндокринологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, доцент кафедры биохимии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, доцент кафедры фундаментальных и общенаучных дисциплин ЧВУЗ «Харьковский международный медицинский университет», г. Харьков, Украина
Е.Р. Грабовецкая, к. биол. н., доцент кафедры биохимии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, г. Харьков
Н.И. Филимонова, д. мед. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Национального фармацевтического университета МЗ Украины, г. Харьков
Н.В. Дубинина, к. мед. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Национального фармацевтического университета МЗ Украины, г. Харьков
О.Г. Гейдерих, к. мед. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Национального фармацевтического университета МЗ Украины, г. Харьков

Цель исследования: изучить влияние гидроксиэтилкрахмала (ГЭК) (М.м. 200 кДа) и полиэтиленоксида (ПЭО) (М.м. 400 кДа) на показатели сохранности клеток интерстиция (КИ) семенников мышей во время криоконсервирования.

Материалы и методы. При получении КИ мышей использовали ферменты: 0,2 мг/мл колагеназы и 0,1 мг/мл ДНКазы. Полученную суспензию клеток кріоконсервировали в растворах, которые содержали 0; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 М диметилсульфоксида (ДМСО) и/или 10%, 20% фетальную телячью сыворотку, 10 мг/мл ПЭО или ГЭК. Образцы объемом 1 мл охлаждали до -80 °С со скоростью 1 °С/мин, сохраняли в жидком азоте (-196 °С), отогрели на водяной бане при температуре 37 °С. Раствор для кріоконсервирования удаляли. Количество КИ и их сохранность была оценена с помощью камеры Горяева. Жизнеспособность КИ измеряли с помощью красителя трипановый синий, сохранность клеток Лейдига – с помощью гистохимического окрашивания на активность β-гидроксистероиддегидрогеназы.

Результаты. Выявлено, что 1,4 М ДМСО без добавок способствовал наибольшей сохранности КИ. Добавление к растворам для кріоконсервирования 10% и 20% фетальной телячьей сыворотки или 10 мг/мл ГЭК увеличивало общую сохранность КИ более чем на 10% и сохранность клеток Лейдига в среднем на 15%. Было показано, что при использовании 10 мг/мл ГЭК можно снизить концентрацию ДМСО до 0,7 М. Эта комбинация имела наилучшие показатели общей сохранности КИ, сохранности жизнеспособных клеток и клеток Лейдига – 75,8 (53,3; 93,3), 55,6 (45,1; 69,4) и 57,1 (40,2; 70,3) % соответственно. Использование ПЭО было неэффективным.

Вывод. Применение высокомолекулярных синтетических полимеров, таких как ГЭК, может замещать протекторные свойства сыворотки во время кріоконсервирования и позволяет снизить эффективную концентрацию проникающих криопротекторов, таких как ДМСО.

Ключевые слова: кріоконсервирование, клетки Лейдига, семенники, полиэтиленоксид, гидроксиэтилкрахмал.

USE OF POLYETHYLENEOXIDE AND HYDROXYETHYLSTARCH AS BLOOD PLASMA SUBSTITUTES IN THE CRYOPRESERVATION OF TESTIS INTERSTITIUM CELLS IN MICE

O.V. Pakhomov, PhD, senior researcher, Cryoendocrinology Department, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, associate professor, Biochemistry Department, V.N. Karazin Kharkiv National University, Department of Fundamental General Scientific Disciplines, Private Higher Education Institution "Kharkiv International Medical University", Kharkiv
E.R. Grabovetskaya, PhD, associate professor, Biochemistry Department, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv
N.I. Filimonova, MD, professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, National University of Pharmacy of the MoH of Ukraine, Kharkiv
N.V. Dubinina, PhD, associate professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, National University of Pharmacy of the MoH of Ukraine, Kharkiv
O.G. Geyderikh, PhD, associate professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, National University of Pharmacy of the MoH of Ukraine, Kharkiv

Purpose of the study: to investigate the impact of hydroxyethyl starch (HES) and polyethylene oxide (PEO) on the indicators of preservation of murine testis interstitial cells (IC) under cryopreservation.

Materials and methods. To isolate IC the enzymes were used: 0.2 mg/ml collagenase and 0.1 mg/ml DNase. The obtained cell suspension was cryopreserved in the solutions that contained 0; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 M of dimethyl sulfoxide (DMSO) and/or 10%, 20% fetal cow serum, 10 mg/ml PEO or HES. The samples (1 ml) were cooled at a rate of 1 °C/min to -80 °C then stored in liquid nitrogen (-196 °C). They were warmed at 37 °C in the water bath. Cryopreservation solution was removed. The number of cells and their preservation were assessed before and after with the assistance of Goryaev's camera. Viability of IC, Leydig cell preservation and preservation of metabolic activity were measured with trypan blue dye, histochemical staining for β-hydroxysteroid dehydrogenase activity.

Results. It was shown that 1,4 M DMSO without supplements favored IC preservation. Addition to the cryopreservation solution 10% and 20% of fetal cow serum or 10 mg/ml HES increased total preservation of IC by more than 10% and Leydig cell cryopreservation by an average 15%. HES 10 mg/ml may decrease DMSO concentration to 0,7 M. This combination had the best indicators of total preservation of IC, preservation of viable cells and Leydig cells: 75,8 (53,3; 93,3), 55,6 (45,1; 69,4), 57,1 (40,2; 70,3) %, respectively. PEO was ineffective.

Conclusion. High-molecular weight synthetic polymers such as HES can substitute protective properties of blood serum under cryopreservation and allow decreasing effective concentration of permeable cryoprotective such as DMSO.

Keywords: cryopreservation, Leydig cells, testes, polyethylene oxide, hydroxyethyl starch.