

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МИКРОСОМАЛЬНЫХ РЕДУКТАЗ ТКАНИ ЯИЧНИКОВ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ МЕТОДОМ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Проскурнина Е.В.¹, Созарукова М.М.², Федорова М.В.³, Киселева М.В.⁴

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: proskurnina@gmail.com

² Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова РАН
Ленинский просп., 31, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: s_madinam@bk.ru

³ Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
ул. Новогиреевская, 3а, г. Москва, 111123, РФ; e-mail: theklazontag@yandex.ru

⁴ МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ
2-й Боткинский пр., 3, г. Москва, 125284, РФ; e-mail: oxiscience@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0540

Аннотация. Цель исследования — изучить активность НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы (СУВ5R) и НАДФН-зависимой цитохром Р450-редуктазы (СУРОR) в тканях яичника после криоконсервации методом люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами НАДН и НАДФН, соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что в криоконсервированных тканях яичников сохраняется как активность митохондрий, так и микросомальных редуктаз. После криоконсервации уровень выработки митохондриями супероксидного анион-радикала падает в 3–10 раз, при этом наличие или отсутствие химиотерапии влияния не оказывает, также на этот параметр не оказывает влияния тяжесть заболевания. По сравнению с группой контроля (пациентки с доброкачественными новообразованиями), активность СУВ5R и СУРОR ткани яичников при злокачественном онкологическом процессе уменьшается в 1,5–10 раз в зависимости от тяжести заболевания, и наличие химиотерапии резко влияет на эти показатели — при химиотерапии активность микросомальных редуктаз падает в 50–100 раз по сравнению с группой контроля. Таким образом, активность микросомальных редуктаз является более информативным параметром для оценки функциональности криоконсервированной ткани яичников, чем супероксид-продуцирующая способность митохондрий, поскольку, во-первых, зависит от стадии заболевания и предшествующей химиотерапии, и во-вторых, аналитический сигнал НАДН/НАДФН стимулированной хемилюминесценции характеризуется примерно в 30 раз более высокой интенсивностью, чем митохондриальная хемилюминесценция, что обуславливает более высокую аналитическую чувствительность методики.

Ключевые слова: цитохром b5-редуктаза, цитохром Р450-редуктаза, яичники, криоконсервация, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее время методы диагностики и лечения рака значительно улучшились, но химиотерапия и лучевая терапия оказывают необратимое цитотоксическое воздействие на мужские и женские половые железы, что в конечном итоге приводит к гормональной и репродуктивной недостаточности. Криоконсервация и аутотрансплантация ткани яичников представляют собой наиболее эффективный вариант сохранения фертильности у детей, подростков и пациенток, которые не могут отложить противораковое лечение до проведения стимуляции яичников и забора ооцитов [1,2]. В области криоконсервации эмбрионов, ооцитов и ткани яичников достигнут значительный прогресс, и в некоторых странах криоконсервация ткани яичников выведена за рамки экспериментальных программ сохранения фертильности [3]. Согласно исследованиям, риск рецидива рака вследствие реимплантации ткани яичника низок, и восстановление эндокринной функции наблюдается практически у всех женщин, перенесших трансплантацию ткани яичников. На сегодняшний день в мире родилось более двухсот детей у женщин после аутотрансплантации яичниковой ткани [1,2].

Во всем мире ведутся исследования, направленные на решение главных проблем трансплантации ткани яичников, таких как наличие раковых клеток в аутотрансплантационной ткани [4], а также массивной потери фолликулов в раннем посттрансплантационном периоде из-за раннего ишемического повреждения, возникающего между трансплантацией и ревазуляризацией в течение нескольких дней. При этом разработка методов жизнеспособности размороженной ткани яичников является одной из ведущих стратегий поскольку раннее реперфузионное повреждение приводит к оксидативному повреждению тканей, и как следствие апоптозу ооцитов и гранулезных клеток [5]. В результате процессов криоконсервации-оттаивания тканей яичников также происходит изменение клеточного метаболизма, повреждение митохондрий и эндоплазматического ретикулума, такие как потеря митохондриями крист, набухание митохондрий и дилатация эндоплазматического ретикулума [1]. Жизнеспособность размороженных тканей, как и наличие онкологических клеток, оценивают гистологическим методом с помощью оптической или электронной микроскопии, жизнеспособные фолликулы подсчитывают с помощью флуоресцентной микроскопии [6,4].

В качестве другого перспективного подхода оценки жизнеспособности живых систем может быть контроль за функциями ключевых клеточных органелл, например, митохондрий с помощью измерения продукции ими супероксидного анион-радикала [7]. Помимо митохондрий, основными источниками активных форм кислорода в клетке являются микросомальные цепи окисления цитохрома b5 и P450. НАДН-зависимая цитохром b5-редуктаза (CYB5R) которая принимает участие в синтезе холестерина, элонгации жирных кислот, гидроксигировании ксенобиотиков и стероидных гормонов, поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат и коэнзим Q10, защищая клетку от апоптоза [12]. НАДФН-зависимая цитохром P450-редуктаза (CYPOR) восстанавливает цитохром P450, цитохром b5, гемоксигеназу, сквален-монооксигеназу, 7-дегидрохолестерол редуктазу, при этом побочными продуктами являются активные формы кислорода (АФК, супероксидный анион-радикал и пероксид водорода) [8].

Перспективным методом исследования активности CYB5R и CYPOR является люцигенин-активированная хемилюминесценция в присутствии НАДН и НАДФН, соответственно. В этом случае люцигенин напрямую восстанавливается указанными ферментами, далее в присутствии кислорода образуется супероксидный анион-радикал и возникает хемилюминесценция, интенсивность которой пропорциональна активности CYB5R и CYPOR [9,10-12].

Цель настоящего исследования — изучение возможностей определения активности микросомальных редуктаз ткани яичников после криоконсервации методом люцигенин-активированной хемилюминесценции для оценки жизнеспособности тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ткани яичников пациенток, получавших противоопухолевую терапию, были предоставлены биобанком МРНЦ им. А.Ф. Цыба филиалом ФГБУ «НМИРЦ» МЗ России, г. Обнинск. В исследование включали 17 женщин в возрасте от 28 до 45 лет с подтвержденными злокачественными новообразованиями (рак молочной железы, рак влагалища, рак матки) и доброкачественными новообразованиями, сопоставимых по возрасту ($n = 20$, группа контроля). Критерии исключения: возраст старше 45 лет, рак яичников любой стадии. Пациенткам была проведена лапароскопия, биопсия кортикального слоя яичниковой ткани с последующей криоконсервацией методом витрификации [13].

Для группы контроля образцы исследовали без криоконсервации, не позднее чем через 4 часа после интраоперационного забора материала. Для исследуемой группы образцы анализировали после размораживания.

Для регистрации активности CYB5R и CYPOR был разработан протокол, основанный на измерении хемилюминесценции ткани в присутствии люцигенина и НАДН или НАДФН, соответственно. Регистрацию хемилюминограмм проводили на приборе Lum-1200 с программным обеспечением сбора и обработки сигнала PowerGraph 3.0 (ДИСофт, Россия). Прибор позволяет регистрировать хемилюминесценцию в 12 кюветах, таким образом НАДН- и НАДФН-зависимая хемилюминесценция в трех параллельных измерениях для каждой пробы была зарегистрирована одновременно, что обеспечивало высокую воспроизводимость и сопоставимость хемилюминограмм.

В качестве буферного раствора использовали раствор Кребса-Рингера (рН 7,4), который готовили в день эксперимента. В качестве хемилюминесцентного зонда использовали люцигенин (динитрат 10,10-диметил-9,9-биакридиния, «Sigma-Aldrich» США), исходный раствор концентрацией 1 мМ готовили растворением навески в дистиллированной воде. В качестве источников восстановленных эквивалентов использовали НАДН и НАДФН («Sigma-Aldrich» США), 10 мМ растворы готовили растворением навесок в дистиллированной воде.

Анализ проводили не позднее, чем через 30 минут после размораживания. Перед измерением хемилюминесценции образцы трехкратно промывали раствором Кребса-Рингера, из образцов биопсийной иглой 20G («GTA», Италия) производили забор трех порций массой $15,5 \pm 0,5$ мг, каждую из которых помещали в кюветы с предварительно внесенным раствором Кребса-Рингера (1860 мкл) и 120 мкл 1 мМ люцигенина. Производили регистрацию хемилюминесценции при 37 °С в течение 5 минут, далее добавляли 10 мкл 10 мМ НАДН или НАДФН и регистрировали сигнал еще 20 мин. Из хемилюминограмм рассчитывали интенсивность стимулированного свечения $I_{\text{НАДН}}$ и $I_{\text{НАДФН}}$. Для трех параллельных измерений каждой пробы рассчитывали среднее значение указанных параметров.

Для регистрации образования митохондриального супероксидного анион-радикала использовали хемилюминометр SmartLum-100 («ДИСофт», Россия), дополнительно оснащенный перистальтическим насосом Pumps 323 (Watson Marlow, Великобритания). К насосу были подключены резервуары, содержащие кислородную газовую смесь (75% N₂, 20% O₂, 5% CO₂). Образец ткани яичника массой $15,5 \pm 0,5$ мг помещали в кювету хемилюминометра, содержащую 1880 мкл раствора Кребса-Рингера и 120 мкл раствора люцигенина в конечной концентрации 1 мМ. Фоновую хемилюминесценцию регистрировали в течение нескольких минут, после чего включали аэрацию (скорость потока 6 об/мин) и регистрировали хемилюминесценцию в течение 20 минут.

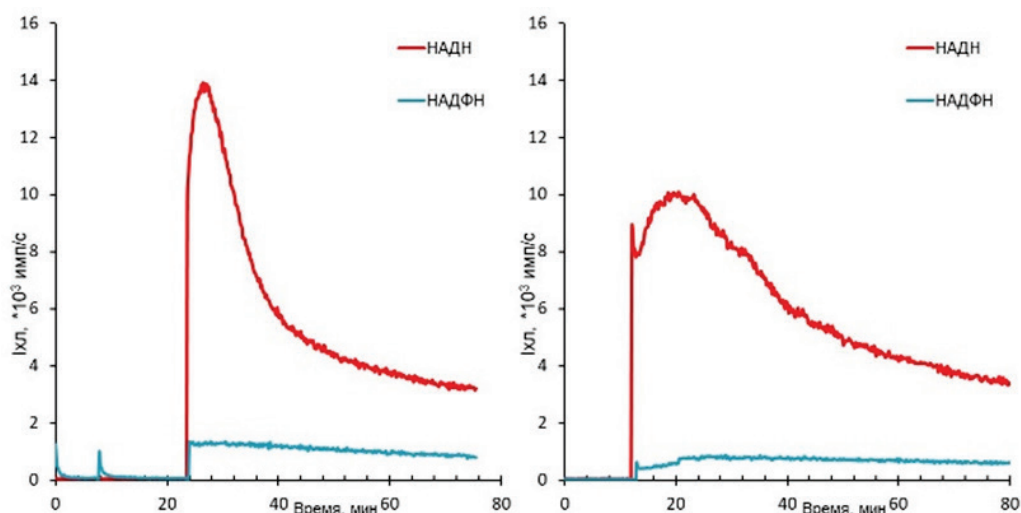


Рисунок 1. Хемиллюминограммы НАДН- и НАДФН-зависимого свечения для ткани яичника из группы контроля. Слева – до криоконсервации, справа – после размораживания криоконсервированной ткани

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение НАДН- и НАДФН-зависимой хемиллюминесценции ткани яичника с сохранной функцией (пациентка из группы контроля) до и после криоконсервации свидетельствует о том, что качественно характер свечения сохраняется, но интенсивность обоих сигналов падает примерно на треть (рис. 1).

Качественно, НАДФН-зависимое свечение носит стационарный характер, НАДН-зависимое свечение характеризуется на порядок большей интенсивностью и имеет вид кривой с максимумом. Такой вид хемиллюминограмм сохранялся для всех изученных образцов.

В ходе исследования пациентки были разделены на подгруппы: без сопутствующей химиотерапии ($n = 10$) и при наличии сопутствующей химиотерапии ($n = 7$). Результаты обработки хемиллюминограмм приведены в таблице 1: интенсивности собственного люцигенин-активированного свечения, отражающего продукцию супероксидного анион-радикала митохондриями, и интенсивности НАДН- и НАДФН-стимулированной хемиллюминесценции, отражающие активность СУВ5R и СУРOR, соответственно.

Результаты свидетельствуют о том, в криоконсервированных тканях яичников сохраняется как активность митохондрий, так и микросомальных редуктаз. После криоконсервации уровень выработки митохондриями супероксидного анион-радикала падает в 3–10 раз, при этом наличие или отсутствие химиотерапии оказывает слабое влияние, также на этот параметр не оказывает влияния тяжесть заболевания. По сравнению с группой контроля, активность СУВ5R и СУРOR ткани яичников при злокачественном онкологическом процессе уменьшается в 1,5–10 раз в зависимости от тяжести заболевания, и наличие химиотерапии резко влияет на эти показатели — при химиотерапии активность микросомальных редуктаз падает в 50–100 раз по сравнению с группой контроля.

Таблица 1. Параметры хемиллюминограмм, определенные для исследуемых подгрупп и группы контроля, данные представлены в виде медианы и значений первого и третьего квартилей Me (Q1; Q3)

	$I_{\text{собств}}$, усл.ед. (митохондриальное свечение)	$I_{\text{НАДН}}$, усл.ед. (активность СУВ5R)	$I_{\text{НАДФН}}$, усл.ед. (активность СУРOR)
Группа контроля, доброкачественные новообразования ($n = 20$)	0,75 (0,30;1,02)	21,9 (15,12;28,50)	3,5 (3,02;5,45)
Пациентки со злокачественными новообразованиями без химиотерапии ($n = 10$)	0,15 (0,07;0,25)	9,09 (2,53; 14,10)	1,57 (0,84;3,10)
Пациентки со злокачественными новообразованиями, прошедшие химиотерапию ($n = 7$)	0,09 (0,02;0,19)	0,36 (0,15; 2,32)	0,12 (0,08; 0,90)

ОБУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитохром b5-редуктаза является флавопротеином, существующим в двух изоформах. Функцией этого фермента является восстановление цитохрома b5 – конечной точки НАДН-зависимой микросомальной дыхательной цепи. Микросомальная изоформа встроена в цитоплазматическую мембрану и мембраны эндоплазматического ретикулума и митохондрий, аппарата Гольджи, пероксисом, ядра, саркоплазматического ретикулума и нейрональных синапсов. Совместно с цитохромом b5 этот фермент выполняет огромное число метаболических функций, включая окисление ксенобиотиков и канцерогенов, биодеградацию противоопухолевых препаратов, элонгацию жирных кислот, анаболизм холестерина, редокс-сигнализацию в нейронах [14]. Хотя основным субстратом восстановления является цитохром b5, в его отсутствие CYP5R переносит электроны на другие акцепторы, поддерживая коэнзим Q10 и аскорбат в восстановленном состоянии [15]. При помощи аскорбата система НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы защищает гормоны от оксидативной деградации [16], а восстановленный коэнзим Q10 предотвращает липидную пероксидацию в плазматических мембранах и, как следствие, апоптоз [15]. Таким образом, можно считать систему НАДН-зависимой цитохром b5-редуктазы звеном внутриклеточной антиоксидантной системы.

Цитохром P450-редуктаза переносит электроны от НАДФН на цитохром P450, однако акцепторами электронов могут быть другие вещества: хиноны, [17], цитохром b5, гемоксигеназа и другие ферменты [8]. НАДФН-зависимую систему цитохрома P450 считают основным внутриклеточным источником АФК (супероксидный анион-радикал и пероксид водорода) наряду с митохондриальной дыхательной цепью. Нарушения в работе цитохром P450-зависимой цепи приводят к серьезному изменению АФК-гомеостаза, вызывая липидную пероксидацию и апоптоз, поэтому работа этой системы жестко контролируется экспрессией генов, белковыми взаимодействиями, окислительным стрессом по механизму обратной связи [18]. АФК, продуцируемые НАДФН-зависимой системой цитохрома P450, играют значимую роль в канцерогенезе [19]. Важно, что повышение экспрессии CYPOR сопровождается повышением продукции АФК [20]. Таким образом, как CYP5R, так и CYPOR принимают участие в ключевых биохимических процессах жизнедеятельности клетки, и есть основания считать их активность маркером функциональности клеточной системы в целом.

Работы по изучению влияния витрификации на эндоплазматический ретикулум единичны, например, в [21] продемонстрировано отсутствие влияния витрификации на экспрессию генов маркеров стресса эндоплазматического ретикулума. Существенно больше работ касаются функции митохондрий ооцитов. Так, показано, что в процессе витрификации/оттаивания ооцитов митохондриальный потенциал может временно динамически изменяться в течение 2 ч после оттаивания, но полностью восстанавливается после 4 ч культивирования в среде [22]. В исследовании более чем 600 ооцитов человека показано, что витрификация смещает внутриклеточный редокс-потенциал в сторону окисления, но не изменяет митохондриальный потенциал или уровень внутриклеточных активных форм кислорода, что подтверждают и наши данные. Однако есть подтверждения тому, что витрификация вызывает частичное повреждение митохондрий, обусловленное оксидативным стрессом, которое может быть снижено добавлением ресвератрола или N-ацетилцистеина в среду инкубирования [23-25]. Несмотря на то, что экспрессия мРНК ряда генов, связанных с функцией митохондрий, была снижена в результате витрификации, авторы отмечают, что это не повлияло на потенциал развития ооцитов [26]. В целом, при оценке жизнеспособности можно ориентироваться на функционал митохондрий, однако по нашим данным аналитическая чувствительность метода невысока, поэтому более перспективным является оценка активности микросомальных редуктаз.

Ограничением исследования является отсутствие катамнестической информации о последующей трансплантации ткани и ее приживаемости, а также отсутствие данных, полученных независимыми гистологическими методами. При последующих исследованиях мы планируем учесть эти аспекты и расширить выборку.

ВЫВОДЫ

Таким образом, люцигенин-активированная хемиллюминесценция в присутствии доноров электронов может быть использована для оценки активности систем микросомального окисления ткани после криоконсервации, поскольку ткань после криоконсервации сохраняет активность микросомальных систем. По сравнению с супероксид-продуцирующей способностью митохондрий, активность микросомальных редуктаз является более информативным параметром для оценки функциональности криоконсервированной ткани яичников, поскольку, во-первых, зависит от стадии заболевания и предшествующей химиотерапии, и во-вторых, аналитический сигнал НАДН/НАДФН стимулированной хемиллюминесценции характеризуется примерно в 30 раз более высокой интенсивностью, чем митохондриальная хемиллюминесценция, что обуславливает более высокую аналитическую чувствительность методики, при этом активность CYP5R является более чувствительным параметром, чем активность CYPOR.

Список литературы / References:

1. Rodrigues A.Q., Picolo V.L., Goulart J.T., Silva I.M.G., Ribeiro R.B., Aguiar B.A., Ferreira Y.B., Oliveira D.M., Lucci C.M., de Bem A.F. et al. Metabolic activity in cryopreserved and grafted ovarian tissue using high-resolution respirometry. *Sci Rep*, 2021, vol. 11, p. 21517, doi: 10.1038/s41598-021-01082-z.
2. Wietcovsky L., Til D., Salvador R.A., Amaral N.L.L., Senn, A.P., Amaral V.L.L. Ovarian tissue vitrification and heterotopic autologous transplantation in prepubertal Wistar rats. *JBRA Assist Reprod*, 2018, vol. 22, pp. 116-122, doi: 10.5935/1518-0557.20180019.
3. Poirot C., Fortin A., Lacorte J.M., Akakpo J.P., Genestie C., Vernant J.P., Brice P., Morice P., Leblanc T., Gabarre J. et al. Impact of cancer chemotherapy before ovarian cortex cryopreservation on ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod*, 2019, vol. 34, pp. 1083-1094, doi: 10.1093/humrep/dez047.
4. Nguyen T.Y.T., Cacciottola L., Camboni A., Ravau J., De Vos M., Demeestere I., Donnez J., Dolmans M.M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with central nervous system tumours. *Hum Reprod*, 2021, vol. 36, pp. 1296-1309, doi: 10.1093/humrep/deaa353.
5. Wang D., Geng M., Gan D., Han G., Gao G., Xing A., Cui Y., Hu Y. Effect of resveratrol on mouse ovarian vitrification and transplantation. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, vol. 19, no. 54, doi: 10.1186/s12958-021-00735-y.
6. Cheng J., Ruan X., Zhou Q., Li Y., Du J., Jin F., Gu M., Mueck A.O. Long-time low-temperature transportation of human ovarian tissue before cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 2021, vol. 43, pp. 172-183, doi: 10.1016/j.rbmo.2021.05.006.
7. Matveeva N.S., Liubitskii O.B., Osipov A.N., Vladimirov Iu A. Lucigenin-enhanced chemiluminescence of the animal tissues. *Бiofizika*, 2007, vol. 52, pp. 1120-1127.
8. Wisniewska A., Jagiello K., Mazerska Z. NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450. *Postepy Biochem*, 2009, vol. 55, pp. 272-278.
9. Schepetkin I.A. Lucigenin as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases. *Biochemistry (Mosc)*, 1999, vol. 64, pp. 25-32.
10. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., Hetherington L., Aitken R.J. Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biol Reprod*, 2005, vol. 73, pp. 334-342, doi: 10.1095/biolreprod.104.037960.
11. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., McLaughlin E.A., Aitken R.J. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biol Reprod*, 2004, vol. 71, pp. 307-318, doi: 10.1095/biolreprod.104.027748.
12. Rezende F., Prior K.K., Lowe O., Wittig I., Strecker V., Moll F., Helfinger V., Schnutgen F., Kurrle N., Wempe F., et al. Cytochrome P450 enzymes but not NADPH oxidases are the source of the NADPH-dependent lucigenin chemiluminescence in membrane assays. *Free Radic Biol Med*, 2017, vol. 102, pp. 57-66, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.019.
13. Yuzhakov V.V., Malinova I.V., Kiseleva M.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Komarova E.V., Sevan'kaeva L.E., Ingel I.E., Yakovleva N.D., Kaprin A.D. Effect of Vitrification on Functional Morphology and Viability of the Ovarian Tissue. *Bull Exp Biol Med*, 2018, vol. 164, pp. 502-507, doi: 10.1007/s10517-018-4021-1.
14. Elahian F., Sepehrizadeh Z., Moghimi B., Mirzaei S.A. Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, vol. 34, pp. 134-143, doi: 10.3109/07388551.2012.732031.
15. Villalba J.M., Navarro F., Gomez-Diaz C., Arroyo A., Bello R.I., Navas P. Role of cytochrome b5 reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane. *Mol Aspects Med*, 1997, vol. 18, pp. 7-13.
16. Nakamura M., Ohtaki S. Formation and reduction of ascorbate radicals by hog thyroid microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1993, vol. 305, pp. 84-90, doi: 10.1006/abbi.1993.1396.
17. Shimamoto N. A pathophysiological role of cytochrome p450 involved in production of reactive oxygen species. *Yakugaku Zasshi*, 2013, vol. 133, pp. 435-450, doi: 10.1248/yakushi.12-00263.
18. Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, vol. 199, pp. 316-331, doi: 10.1016/j.taap.2004.01.018.
19. Hrycay E.G., Bandiera S.M. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*, 2015, vol. 74, pp. 35-84, doi: 10.1016/bs.apha.2015.03.003.
20. Pillai V.C., Snyder R.O., Gumaste U., Thekkumkara T.J., Mehvar R. Effects of transient overexpression or knockdown of cytochrome P450 reductase on reactive oxygen species generation and hypoxia reoxygenation injury in liver cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, vol. 38, pp. 846-853, doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05622.x.
21. Frank L.A., Rose R.D., Anastasi M.R., Tan T.C.Y., Barry M.F., Thompson J.G., Brown H.M. Artificial blastocyst collapse prior to vitrification significantly improves Na(+)/K(+)-ATPase-dependent post-warming blastocoele re-expansion kinetics without inducing endoplasmic reticulum stress gene expression in the mouse. *Reprod Fertil Dev*, 2019, vol. 31, pp. 294-305, doi: 10.1071/RD17500.
22. Chen C., Han S., Liu W., Wang Y., Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 2012, vol. 29, pp. 1045-1050, doi: 10.1007/s10815-012-9848-1.
23. Hara T., Kin A., Aoki S., Nakamura S., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *PLoS One*, 2018, vol. 13, p. 0204571, doi: 10.1371/journal.pone.0204571.

24. Matilla E., Martin-Cano F.E., Gonzalez-Fernandez L., Sanchez-Margallo F.M., Alvarez I.S., Macias-Garcia B. N-acetylcysteine addition after vitrification improves oocyte mitochondrial polarization status and the quality of embryos derived from vitrified murine oocytes. *BMC Vet Res*, 2019, vol. 15, no. 31, doi: 10.1186/s12917-018-1743-2.

25. Gao Z., Yao G., Zhang H., Liu H., Yang Z., Liu, C., Li W., Zhao X., Wei Q., Ma, B. Resveratrol protects the mitochondria from vitrification injury in mouse 2-cell embryos. *Cryobiology*, 2020, vol. 95, pp. 123-129, doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.05.007.

26. Saadeldin I.M., Moulavi F., Swelum A.A., Khorshid S.S., Hamid H.F., Hosseini S.M. Vitrification of camel oocytes transiently impacts mitochondrial functions without affecting the developmental potential after intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, vol. 27, pp. 44604-44613, doi: 10.1007/s11356-020-11070-x.

ANALYSIS OF MICROSOMAL REDUCTASE ACTIVITY IN OVARIAN TISSUE AFTER CRYOPRESERVATION BY ENHANCED CHEMILUMINESCENCE

Proskurnina E.V.¹, Sozarukova M.M.², Fedorova M.V.³, Kiseleva M.V.⁴

¹ Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechye St, 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: proskurnina@gmail.com

² Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Leninsky av., 31, Moscow, 119991, Russia; e-mail: s_madinam@bk.ru

³ Central Research Institute for Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Novogireevskaya str., 3a, Moscow, 111123, Russia; e-mail: theklazontag@yandex.ru

⁴ National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation

Botkinskii pr-d, 3, Moscow, 125284, Russia; e-mail: oxiscience@mail.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0540

Abstract. The aim of the study was to investigate the activity of NADH-dependent cytochrome b5 reductase (CYB5R) and NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CYPOR) in ovarian tissues after cryopreservation by lucigenin-enhanced chemiluminescence with NADH and NADPH stimulation, respectively. The results indicate that both mitochondrial and microsomal reductase activities are preserved in cryopreserved ovarian tissues. After cryopreservation, the level of production of superoxide anion radical by mitochondria drops by 3–10 times, while the presence or absence of chemotherapy has no effect, and this parameter is also not affected by the severity of the disease. Compared to the control group (patients with benign tumors), the activity of CYB5R and CYPOR of ovarian tissue in a malignant cancer process decreases 1.5–10 times depending on the disease severity, and the presence of chemotherapy dramatically affects these parameters — the activity of microsomal reductases decreases by 50–100 times in chemotherapy compared to the control group. Thus, microsomal reductase activity is a more informative parameter for assessing the functionality of cryopreserved ovarian tissue than superoxide-producing capacity of mitochondria, because, firstly, it depends on the stage of disease and prior chemotherapy, and secondly, the analytical signal of NADH/NADPH stimulated chemiluminescence is characterized by approximately 30 times higher intensity than mitochondrial chemiluminescence, which leads to higher analytical sensitivity of the technique.

Key words: cytochrome b5 reductase, cytochrome P450 reductase, ovaries, cryopreservation, chemiluminescence.