

## АНТИОКСИДАНТ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕЇН ЯК ФАКТОР ПІДВИЩЕННЯ ЗБЕРЕЖЕНОСТІ ТА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ З ДМСО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

pzmzubov@mail.ru

Дана робота виконана у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи відділу кріоцитології та кількісної морфології «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур», № державної реєстрації 0114U001320.

**Вступ.** Довгий час трансплантація клітин кісткового мозку була єдиним загальноновизнаним методом лікування багатьох злоякісних захворювань системи кровотворення [16]. Однак у зв'язку зі складністю підбору HLA-сумісного донора виникла необхідність пошуку альтернативного джерела гемопоетичних клітин попередників (ГКП) [10]. Перша успішна трансплантація ГКП кордової крові (КК) дитині з анемією Фанконі [6] стала відправною точкою для збільшення обсягів її трансплантації і створення мережі кріобанків [1]. На даний час трансплантація ГКП КК визнана стандартною практикою лікування більше 80 тяжких захворювань, зокрема хвороби крові, імунної системи та ін. На сьогодні проводяться активні дослідження з розробки протоколів лікування дитячого церебрального паралічу, хвороби Альцгеймера, діабету, захворювань серця й печінки, м'язової дистрофії, хвороби Паркінсона, розсіяного склерозу, пошкодження хребта та інших захворювань [2].

Використання КК для трансплантації ГКП має значні переваги в порівнянні з кістковим мозком або мобілізованою периферичною кров'ю: легкість забору, відсутність ризику для матері та новонародженого, мінімізація ймовірності інфікування при трансплантації, а також зниження ризику розвитку реакції «трансплантат проти хазяїна» [8].

Зі збільшенням частоти клінічного використання КК виникла необхідність накопичення великої кількості доз. Вирішення цього завдання можливе лише за умови довгострокового зберігання клітин в замороженому стані. Слід зазначити, що методи кріоконсервування ядровісних клітин (ЯВК) КК, в тому числі і гемопоетичних клітин попередників, були розроблені емпірично і базувалися на технологіях, що застосовуються для кісткового мозку з використанням проникаючого кріопротектора ДМСО в кінцевих концентраціях 5-10% [9]. Однак кріоконсервування за цими протоколами може призводити до загибелі до 50% популяції клітин, а враховуючи обмежений обсяг КК при заготівлі, такі втрати не-

прийнятні і можуть призвести до «неспроможності» трансплантата [3]. Такі значні втрати в процесі заморожування-відігрівання можуть бути пов'язані з розвитком метаболічних порушень, які є наслідком накопичення в клітинах високих концентрацій активних форм кисню (АФК) [12]. Тому технології кріоконсервування ЯВК КК необхідно оптимізувати для даного типу клітин, що дозволить уникнути або сповільнити розвиток окисного стресу. Одним із шляхів запобігання накопичення великої кількості АФК може бути внесення до кріозахисного середовища антиоксидантів, одним з яких є N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) [5].

Виходячи з цього, **метою** даного **дослідження** була оцінка впливу N-ацетил-L-цистеїну на вміст активних форм кисню, збереженість та життєздатність ядровісних клітин кордової крові після кріоконсервування в кріозахисних середовищах з різними концентраціями ДМСО.

**Об'єкт і методи дослідження.** У роботі використовували КК людини, отриману після нормальних пологів, при наявності інформованої згоди породіллі. Матеріал було заготовлено на консерванті «Глюгіцир» («Біофарма», Україна). Фракцію ЯВК КК виділяли методом седиментації з використанням 6%-го розчину поліглюкіну з м. в. 60000 (ВАТ «Біохімік», Росія). Виділені клітини обробляли 25%-м розчином ДМСО, приготованому на поліглюкіні, до кінцевих концентрацій в пробі 5%, 7,5% і 10%, відповідно. Клітинні суспензії, оброблені відповідними концентраціями ДМСО, переносили до кріопробірок фірми «NUNC» (Данія) обсягом 1,8 мл. Зразки кріоконсервували в програмному заморожувачі «Cryoson» (Німеччина) зі швидкістю 1-3 град/хв до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснювали при 37°C на водяній бані при постійному погодюванні до зникнення твердої фази. У роботі використовували антиоксидант N-ацетил-L-цистеїн («Sigma») в концентраціях 5; 10; 15 і 30 ммоль/л.

Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно стандартної методики [4]. Збереження клітин в досліджуваному зразку обчислювали як відношення кількості клітин в досліджуваному зразку до кількості клітин у контролі, помноженому на 100. Життєздатність CD45<sup>+</sup>-клітин оцінювали за стандартним ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) протоколом з використанням моноклонального антитіла CD45FITC і ДНК-барвника 7-аміноактіноміціна D (7AAD) [14].

Відсоток життєздатних клітин (CD45<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) визначали за цитограмами в координатах CD45FITC і 7AAD. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення CELLQuest Pro («BD», США). Кількість клітин з надмірним вмістом АФК в клітинах визначали на проточному цитофлуориметрії FACS Calibur («BD», США) за накопиченням в них високолюмінесцентного 2',7'-діхлорофлуоресцеїна (DCF) («Sigma»). Клітинами з надмірним вмістом АФК вважалися події з інтенсивністю флуоресценції на FL1-каналі, що перевищує значення 10<sup>2</sup> по логарифмічній шкалі цитограми.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера з використанням програми Excel («Microsoft», США).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для кріоконсервування ЯВК КК використовували кріозахисні розчини, що містять ДМСО в кінцевих концентраціях 5, 7,5 і 10%. Результати експериментів продемонстрували найвищі показники збереженості та життєздатності при заморожуванні суспензії клітин з 7,5%-м розчином ДМСО (табл. 1), що відповідає даним інших кріобанків [11].

Таблиця 1.

### Збереженість та життєздатність ЯВК КК після заморожування з ДМСО різної концентрації

Концентрація ДМСО, %	Збереженість, %	Життєздатність, %
5	63,2±2,5	75,2±3,9
7,5	72,1±3,2*	78,5±4,2
10	73,4±2,1*	76,9±3,1

**Примітка:** \* – значимо по відношенню до розчину ДМСО 5% з рівнем p<0,05.

На наступному етапі роботи оцінювали кількість клітин, що містять надмірну кількість АФК. Дані сполуки являють собою проміжні метаболіти, що беруть участь як у фізіологічних, так і патологічних процесах. Генерація помірних кількостей АФК необхідна для підтримки фізіологічного стану клітин всіх типів [12]. Однак, якщо кількість АФК досягає певної критичної позначки, то у силу своєї високої реакційної здатності, вони стають досить небезпечними для клітин, що може призвести до оксидативного стресу. Причинами цього явища може бути як порушення функції мітохондрій, так і пригнічення ендогенних антиоксидантних систем, що нейтралізують вільні радикали. Утворені активні форми кисню викликають переокисну модифікацію ліпідів, що призводить до утворення вільнорадикальних форм ненасичених жирних кислот

з ушкоджувальними властивостями і токсичних продуктів окислення. У результаті відбувається деструкція внутрішньоклітинних органел та загибель клітин [17].

Проведені нами дослідження з визначення кількості ЯВК КК з надмірним вмістом АФК до та після кріоконсервування показали, що при додаванні ДМСО зміщується прооксидантно-антиоксидантна рівновага в клітинах з розвитком стрес-реакції у вигляді утворення надлишкової кількості АФК, причому цей процес безпосередньо залежить від концентрації ДМСО (табл. 2).

Таблиця 2.

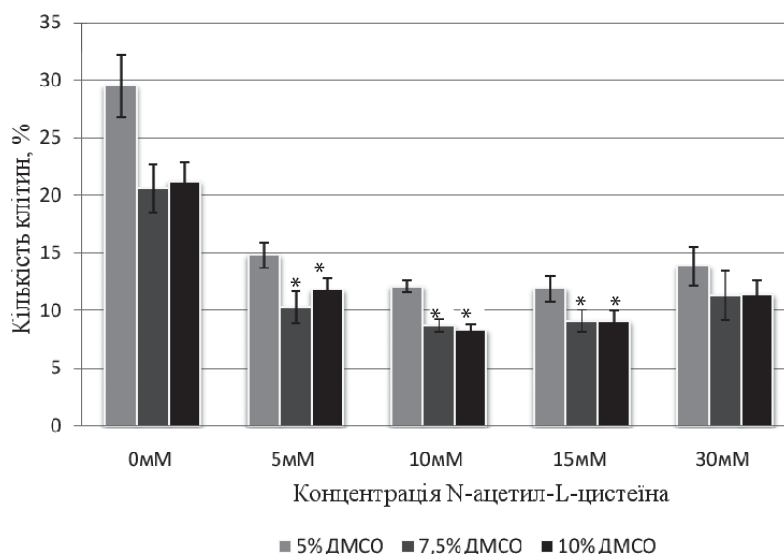
### Кількість клітин з надмірним вмістом АФК до та після заморожування-відігріву в залежності від концентрації ДМСО

Концентрація ДМСО, %	До заморожування	Після розморожування
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*

**Примітка:** \* – значимо по відношенню до розчину ДМСО 5% з рівнем p<0,05.

Після заморожування-відігрівання спостерігається більш виражене збільшення вмісту АФК в ЯВК КК порівняно з даними, отриманими до кріоконсервування. Максимальна кількість клітин з надмірним вмістом АФК була при кріоконсервуванні з ДМСО в концентрації 5%. Дані, отримані при заморожуванні з 7,5 і 10% ДМСО, достовірно не відрізнялися.

Антиоксидантна система клітини містить сполуки, здатні гальмувати або знижувати інтенсивність вільнорадикального окислення і нейтралізувати його шляхом обміну свого атома водню на кисень вільних радикалів (реакція відновлення). Антиокси-



**Рис. 1.** Кількість ЯВК КК з надмірним вмістом АФК після кріоконсервування в залежності від концентрації ДМСО та N-ацетил-L-цистеїну

**Примітка:** \* – значимо по відношенню до розчину ДМСО 5% з рівнем p<0,05.

данти можуть «знешкоджувати» вільні радикали ще до розвитку ефекту ушкодження біомолекул, і їх дія спрямована проти всіх видів радикалів, що утворюються в клітині [7]. Одним з таких антиоксидантів є попередник глутатіону N-ацетил-L-цистеїн. Це головний клітинний відновник, а його вміст у клітині вищий, ніж більшість інших органічних речовин. Він прямо відновлює АФК, перекисні сполуки і знешкоджує вторинні метаболіти окислення [13].

Отримані нами результати вказують на те, що при криоконсервуванні ЯВК КК з ДМСО збільшується вміст АФК, тому було доцільно внести до криозахисного середовища антиоксидант. У зв'язку з цим на наступному етапі була проведена серія експериментів з визначення оптимальної концентрації АЦ. Ми використовували АЦ в концентраціях 5; 10; 15 і 30 мМ. Встановлено, що АЦ, який було додано до середовища криоконсервування, сприяє зниженню внутрішньоклітинного вмісту АФК в криоконсервованих клітинах порівняно з даними без додавання антиоксиданту (рис. 1).

Слід зазначити, що концентрація АЦ 5 мМ при додаванні до суспензії клітин з різними концентраціями ДМСО була найменш ефективною при криоконсервуванні ЯСК КК. При цьому АЦ в концентрації 30 мМ, незалежно від концентрації криопротектора, виявляв меншу ефективність щодо зниження внутрішньоклітинного вмісту АФК порівняно з розчинами АЦ 10 і 15 мМ. Це може бути пов'язано з порушенням рівноваги між окисленою та відновленою формами, в результаті чого знижується антиоксидантна активність відновленого глутатіону, що сприяє генерації АФК в клітинах. Аналіз отриманих результатів показав, що найменша кількість ЯВК КК з надмірним вмістом АФК була при криоконсервуванні в криозахисному розчині, що містить 10 та 15 мМ АЦ в поєднанні з 7,5% або 10%-м розчином ДМСО. Таким чином, можна вказати на активацію АЦ антиоксидантних процесів у клітинах, що сприяє запобіганню розвитку окисного стресу і зниженню рівня АФК в клітинах.

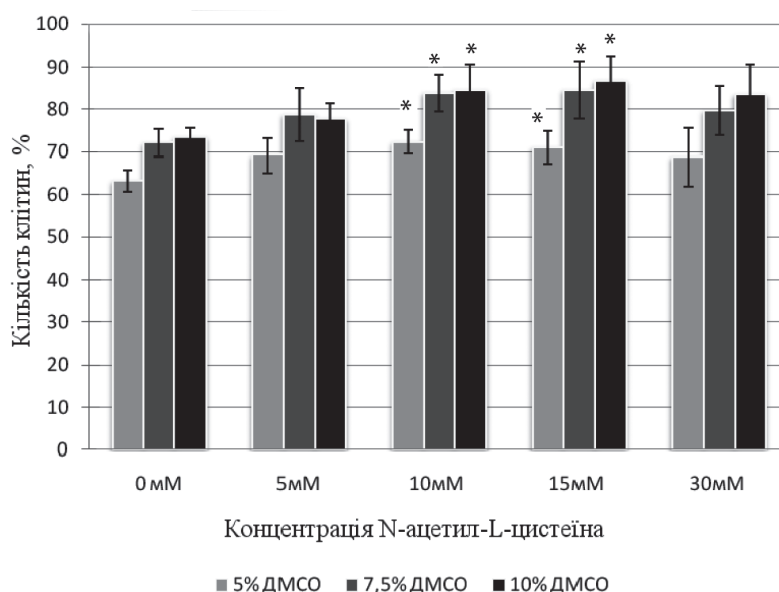
Відомо, що процес криоконсервування здатний призводити до втрати клітин і порушення їх структурно-функціонального стану, що викликає зниження життєздатності [15,18]. Тому на наступному етапі була проведена серія експериментів з оцінки залежності цих параметрів від концентрації АЦ і ДМСО в середовищі криоконсервування.

Отримані нами дані з визначення збереженості (рис. 2) і життєздатності (рис. 3) ЯВК КК показали найкращі показники після криоконсервування з використанням комбінації 7,5% -го розчину ДМСО і 10-15 мМ АЦ, хоча у випадку життєздатності це лише тенденція.

Таким чином, антиоксидантна дія АЦ, що викликає зниження надмірного вмісту АФК, сприяє підвищенню кількості збережених і життєздатних ЯВК КК.

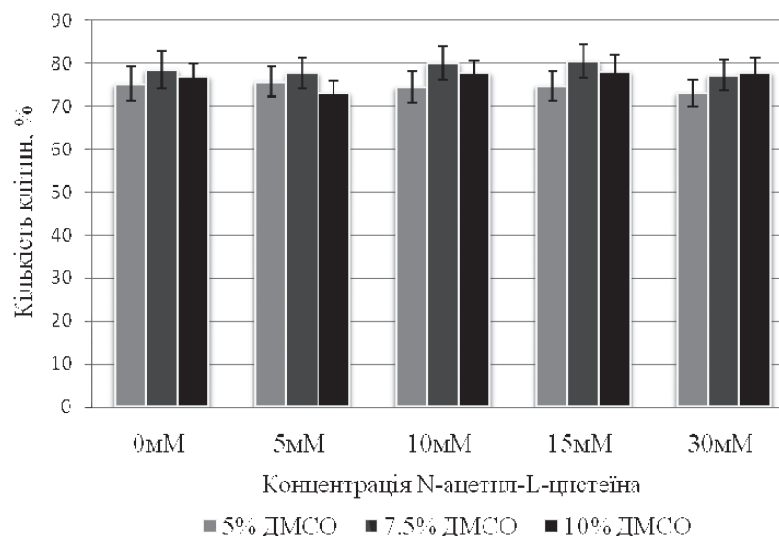
### Висновки

1. Отримані нами дані з визначення кількості ЯВК КК з надмірним вмістом АФК при різних концентраціях ДМСО показали, що заморожування-відігрівання призводить до збільшення даного показника, що



**Рис. 2. Збереженість ЯВК КК після заморожування-відігрівання залежно від концентрації ДМСО і N-ацетил-L-цистеїну**

Примітка: \* – значимо по відношенню до клітин, криоконсервованих без додавання розчину N-ацетил-L-цистеїну з рівнем  $p < 0,05$ .



**Рис. 3. Показники життєздатності ЯВК КК після заморожування-відігрівання залежно від концентрації ДМСО і N-ацетил-L-цистеїну**

Примітка: сумарна статистика оцінена з рівнем значущості  $p < 0,05$ .

може вказувати як на розвиток окисного стресу, так і на інгібування антиоксидантної системи.

2. Внесення до криозахисного середовища антиоксиданта N-ацетил-L-цистеїна в концентрації 10-15 мМ сприяє зниженню рівня АФК внаслідок активації антиоксидантної системи і, як наслідок, збільшенню збереженості та життєздатності ЯВК КК після криоконсервування.

### Перспективи подальших досліджень

Наступним нашим завданням буде оцінка ефективності криоконсервування ЯВК КК в криозахисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО, а також при використанні антиоксиданта N-ацетил-L-цистеїну після моделювання трансфузії, що дасть можливість визначити відстрочений у часі стан клітин після розморожування.

### Література

1. Broxmeyer H. E. Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation / H. E. Broxmeyer // *Current. Opinion. in Pediatrics.* – 1995. – Vol. 7. – P. 47–55.
2. Ballen K. K. New trends in umbilical cord blood transplantation / K. K. Ballen // *Blood.* – 2005. – Vol. 105. – P. 3786-3792.
3. Cornetta K. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT) / K. Cornetta, M. Laughlin, S. Carter [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2005. – Vol. 11, № 2. – P. 149-160.
4. Davis J. M. Basic Cell Culture. A Practical Approach. / J. M. Davis. – Oxford: Oxford University Press, 2002. – 382 p.
5. Dodd S. N – acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility / S. Dodd, O. Dean, D. L. Copolov [et al.] // *Expert Opin Biol Ther.* – 2008. – Vol.8, № 12. – P. 1955-1962.
6. Gluckman E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling / E. Gluckman, H. A. Broxmeyer, A. D. Auerbach [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol.321, №17. – P. 1174-1178.
7. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view / B. Halliwell // *Nutr Rev.* – 2012. – Vol.70, № 5. – P. 257-265.
8. Hayani A. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia / A. Hayani, E. Lampeter, D. Viswanatha [et al.] // *Pediatrics.* – 2007. Vol. 119, № 1. – P. 296-300.
9. Hunt C. J. Cryopreservation of umbilical cord blood: Tolerance of CD34<sup>+</sup> cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing / C. J. Hunt, S. E. Armitage, D. E. Pegg // *Cryobiology.* – 2003. – Vol.46, № 1. – P. 76-87.
10. Iafolla M. A. Transplantation of umbilical cord blood – derived cells for novel indications in regenerative therapy or immune modulation: a scoping review of clinical studies / M. A. Iafolla, J. Tay, D. S. Allan // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 20-25.
11. Mitrus I. A faster reconstitution of hematopoiesis after autologous transplantation of hematopoietic cells cryopreserved in 7.5% dimethyl sulfoxide if compared to 10% dimethyl sulfoxide containing medium / I. Mitrus, A. Smagur, S. Giebel [et al.] // *Cryobiology.* – 2013. – Vol.67, №3. – P. 327-331.
12. Ray P. D. Reactive oxygen species (ROS): homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji // *Cell Signal.* – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 981-990.
13. Rushworth G. F. Existing and potential therapeutic uses for N – acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits / G. F. Rushworth, I. L. Megson. // *Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 141, № 2. – P. 150-159.
14. Schmid I. Dead cell discrimination with 7 – amino – actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry / I. Schmid, W. J. Krall, C. H. Uittenbogaart // *Cytometry.* – 1992. – Vol. 13. – P. 204-208.
15. Thannickal V. J. Reactive oxygen species in cell / V. J. Thannickal, B. L. Fanburg // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2000. – Vol.279. – P. 1005-1028.
16. Thomas E. D. Bone marrow transplantation: a review / E. D. Thomas // *Semin Hematol.* – 1999. – Vol.36, N 4. – P. 95-103.
17. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.] // *Biochem Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44-84.
18. Wang L. L. Correlation between reactive oxygen species of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells and expression of homing adhesion molecules on peripheral blood hematopoietic stem/progenitor cells / L. L. Wang, L. Jin, H. M. Xu, Y. W. Hao // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol.20, № 6. – P. 1452-1456.

УДК 612.649.011.87:577.151.042:615.014.41

### АНТИОКСИДАНТ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕЇН ЯК ФАКТОР ПІДВИЩЕННЯ ЗБЕРЕЖЕНОСТІ ТА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ З ДМСО

Бабійчук Л. О., Макашова О. Є., Зубова О. Л., Зубов П. М.

**Резюме.** У роботі представлено практичне обґрунтування ефективності використання антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну в криозахисних розчинах для криоконсервування ядровісних клітин кордової крові. Показано, що внесення даного антиоксиданту в концентрації 10-15 мМ сприяє значимому зниженню рівня активних форм кисню в клітинах і як наслідок до підвищення показників збереженості та життєздатності ядровісних клітин кордової крові після розморожування.

**Ключові слова:** кордова кров, ядровісні клітини, антиоксидант, диметилсульфоксид, криоконсервування.

УДК 612.649.011.87:577.151.042:615.014.41

### АНТИОКСИДАНТ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИН КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ СОХРАННОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ, КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ С ДМСО

Бабійчук Л. А., Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М.

**Резюме.** В работе представлено практическое обоснование эффективности использования антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина в криозащитных растворах для криоконсервирования ядросодержащих клеток

кордовой крови. Показано, что внесение данного антиоксиданта в концентрации 10–15 мМ способствует значимому снижению уровня активных форм кислорода в клетках и как следствие к повышению показателей сохранности и жизнеспособности ядродержащих клеток кордовой крови после размораживания.

**Ключевые слова:** кордовая кровь, ядродержащие клетки, антиоксидант, диметилсульфоксид, криоконсервирование.

UDC 612.649.011.87:577.151.042:615.014.41

### **ANTIOXIDANT N-ACETYL-L-CYSTEINE AS A FACTOR FOR ENHANCE SAFETY AND VIABILITY OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS CRYOPRESERVED WITH DMSO**

**Babiychuk L. O., Makashova O. E., Zubova O. L., Zubov P. M.**

**Abstract.** With increasing frequency of clinical use of cord blood (CB) preparations there was necessary to accumulate a large number of doses. The solution to this problem is possible only if the storage of cells is in frozen state at a temperature of liquid nitrogen. However, freezing and thawing processes lead to the development of metabolic disorders in cells, one of the reasons of which may be the accumulation of high concentrations of reactive oxygen species (ROS). Prevention the accumulation of ROS is possible by adding antioxidants to the cryoprotective medium, one of antioxidants is N-acetyl-L-cysteine (AC). Thus the purpose of this work is to evaluate the effect of different concentrations of N-acetyl-L-cysteine on the number of cord blood nucleated cells (NC) with high level of ROS, and their safety and viability before and after cryopreservation with DMSO.

Estimation of CB NCs number with excessive ROS content before and after cryopreservation showed that the addition of DMSO shifts prooxidant-antioxidant balance in cells with the development of stress reaction such as the formation of excess ROS ( $10,3 \pm 1,8\%$ ). As a result of freezing and thawing a large increase of ROS was observed in CB NCs ( $20,6 \pm 2,1$ ) as compared to those obtained before the cryopreservation. Safety and viability indexes during preservation by cell suspension freezing with 7.5% DMSO were  $78,0 \pm 2,1\%$  and  $78,9 \pm 3,2\%$ , respectively.

Adding AC to the cryopreservation environment was cause of reducing intracellular ROS content in cryopreserved cells as compared with data without adding antioxidant. The smallest CB NCs number with excessive ROS content was during cryopreservation in cryoprotective solution containing 10 or 15 mM AC (not more than 9% of the cells). It should also be noted that the CB NCs safety and viability indexes were higher by 7-10% as compared with samples without adding AC. Thus, N-acetyl-L-cysteine can activate of antioxidant processes in cells during cryopreservation, which help prevent the development of oxidative stress, reduction of ROS in cells and, consequently, improve their safety and viability.

**Keywords:** cord blood, nucleated cells, antioxidant, dimethylsulfoxide, cryopreservation.

*Рецензент – проф. Шепітько В. І.*

*Стаття надійшла 12.11.2015 року*