

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

Макашова О. Є., Зубова О. Л., Зубов П. М., Мігунова Р. К., Бабійчук Л. О.

## КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ В КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩАХ, ЩО МІСТЯТЬ РІЗНІ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДМСО ТА АНТИОКСИДАНТІВ

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків

olena.makashova@gmail.com

У роботі проведена оцінка ефективності застосування антиоксидантів у комбінації з різними концентраціями ДМСО для кріоконсервування гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) кордової крові (КК). Показано, що додавання до кріозахисного середовища аскорбінової кислоти, N-ацетил-L-цистеїна та глутатіону сприяє покращенню стійкості ГПК КК до дії факторів заморожування та підвищенню показників збереженості та життєздатності. Додавання до кріозахисних середовищ, що містять 7,5 та 10% ДМСО, глутатіону у концентрації 1 та 3 мМ здатне зберегти в життєздатному стані до 90% ГПК КК, порівняно з двома іншими антиоксидантами в оптимальних концентраціях, які забезпечують життєздатність до 80% клітин, порівняно з пробами консервованими без додавання антиоксиданту.

**Ключові слова:** гемопоетичні прогеніторні клітини; кріоконсервування; диметилсульфоксид; аскорбінова кислота; N-ацетил-L-цистеїн; глутатіон.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота виконана у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи відділу кріоцитології «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровмісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур», № держ. реєстрації 0114U001320.

**Вступ.** Застосування гемопоетичних стовбурових клітин за останні 15 років міцно увійшло в практичну медицину розвинутих країн світу, як ефективний метод лікування захворювань крові, імунної системи, порушень обміну речовин, онкологічних захворювань та інших патологій [3]. На сьогоднішній день одним із джерел для отримання гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) є кордова (плацентарна, пуповинна, фетальна) кров (КК) людини. Завдяки її унікальним властивостям, відносній простоті та безпеці заготівлі, КК стала одним із найбільш затребуваних джерел ГПК. Щорічно кількість проведених трансплантацій збільшується, а показання до даного виду терапії розширюються. Все це призвело до створення мережі кріобанків та

розробці специфічних для даних клітин протоколів низькотемпературної консервації [10]. Однак невеликі об'єми кожної дози КК і неможливість повторного забору викликають необхідність вибору найбільш ефективних технологій кріоконсервування. У зв'язку з цим актуальним завданням залишається удосконалення існуючих і розробка нових протоколів низькотемпературного зберігання даних клітин.

Оцінка збереженості та життєздатності ГПК (CD34<sup>+</sup>-клітин) кордової крові після кріоконсервування є необхідною як у практичному аспекті – для розрахунку терапевтичної дози при введенні реципієнту, а також у науковому – для вивчення змін складу клітинних суспензій в залежності від технології кріоконсервування, визначення їх кріостійкості, а також для вивчення процесів та факторів, що призводять до загибелі клітин на різних етапах кріоконсервування. Одним із факторів кріошкодження ГПК під час кріоконсервування може виступати накопичення надлишкового вмісту АФК [2], що призведе до розвитку окисного стресу в клітинах та їх деструкції. Додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів може сприяти зниженню кількості АФК, тим самим підвищенню збереженості та життєздатності ГПК КК після кріоконсервування, і як наслідок зростанню їх клінічної ефективності.

Тому, **метою** даної **роботи** було проведення оцінки ефективності застосування антиоксидантів у комбінації з різними концентраціями ДМСО для кріоконсервування ГПК КК.

**Матеріали і методи досліджень.** Виділену декстраном із молекулярною вагою 60 кДа фракцію ядровмісних клітин КК, до складу якої входять ГПК, обробляли 25% -й розчином ДМСО до кінцевих концентрацій в пробі 5, 7,5 і 10%. До кріозахисних середовищ також вносили антиоксиданти: аскорбінову кислоту в концентраціях 0,05, 0,1, 0,15 та 0,2 мМ; N-ацетил-L-цистеїн – 5, 10, 15 та 30 мМ та глутатіон в концентраціях 0,5, 1, 3 та 5 мМ. Кріоконсервування проводили зі швидкістю 1–3°C в хвилину до –80°C, з наступним зануренням у рідкий азот на програмному заморожувачі Cryoson. Відтавання здійснювали при 37–40°C на водяній бані при постійному погодюванні до зникнення твердої

фази. Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою [4]. Життєздатність ГПК оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом з використанням моноклональних антитіл (CD45FITC, CD34PE) і ДНК-барвника 7-аміноактіноміціна D (7AAD) методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur [12]. Статистичну обробку результатів проводили методом Стюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft Office», США). Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Найбільш небезпечними етапами для клітин під час кріоконсервування є стадії безпосереднього заморожування та розморожування, під час яких клітини піддаються впливу комплексу стрес-факторів. Серед них суттєве значення має 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 дуже сильно впливають на клітини, в результаті яких виникають первинні кріоушкодження, які змінюють властивості мембранної поверхні, структурної впорядкованості ліпідів, конформації периферійних та інтегральних білків та інші зміни [9].

Найбільш широко для кріоконсервування ЯВК КК використовується проникаючий кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) у концентраціях 7,5÷10% [7]. Наявні в даний час протоколи кріоконсервування ЯВК КК використовують концентрацію ДМСО та програму кріоконсервування, встановлену для прогеніторних клітин кісткового мозку та периферійної крові. Кріоконсервування за деякими з цих протоколів може призводити до втрат 50% популяції ядровмісних клітин КК, а враховуючи обмежений об'єм під час заготівлі, такі втрати неприйнятні. Ефективність кріоконсервованих препаратів КК в значній мірі залежить від кількості збережених життєздатних клітин і їх функціональної активності після розморожування. Тому для успішного клінічного застосування необхідно проводити ретельну оцінку якості ГПК після розморожування.

При аналізі збереженості та життєздатності ГПК КК, кріоконсервованих під захистом різних концентрацій ДМСО без додавання антиоксидантів (табл. 1), було продемонстровано зниження досліджуваних показників в усіх експериментальних групах. При цьому найменші втрати клітин спостерігалися при заморожуванні ГПК під захистом 7,5 і 10% ДМСО. Кількість CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> клітин в цих пробах становила до 65%.

Виходячи з отриманих результатів, нами було встановлено, що в процесі кріоконсервування відбувається зниження збереженості та життєздатності ЯВК. І чим менше оптимізоване кріозахисне середовище (особливо 5% ДМСО), тим ці зміни більш виражені. Ми вважаємо, що однією з причин цього може бути накопичення активних форм кисню (АФК) в клітинах під час заморожування, ймовірно в силу інгібування антиоксидантної системи під час впливу фізико-хімічних стрес-факторів кріоконсервування [8]. У зв'язку з цим, доцільним було проведення досліджень з оцінки ефективності внесення різних антиоксидантів у кріозахисні розчини з метою зменшення накопичення АФК і запобігання розвитку окисного стресу в клітинах. Однією з таких речовин є аскорбінова кислота (АК), або вітамін С. Деякі дослідники зараховують її до представників «першої лінії оборони» від «агресивних» реактивних сполук, що характеризуються високою окисною активністю [1]. Тому застосування даної речовини для кріоконсервування гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК), з нашої точки зору, може мати цитопротекторний ефект.

Отримані нами дані після кріоконсервування суспензій клітин, оброблених різними концентраціями ДМСО, і додавання АК (в концентраціях 0,1 та 0,15 мМ), демонструють достовірне збільшення збереженості клітин (табл. 2). Аскорбінова кислота у низькій (0,05 мМ) та великій (0,2 мМ) концентрації ніякого позитивного впливу на клітини не здійснювала, а навпаки 0,2 мМ концентрація призводила до зниження даного показника, що може бути пов'язане з реалізацією прооксидантного ефекту. Аналіз життєздатності ГПК КК після кріоконсервування (табл. 2) показав, що додавання до кріозахисного середовища АК не впливало на цей параметр. Виключення становлять зразки, кріоконсервовані із додаванням 0,2 мМ розчину АК, де спостерігалось деяке зниження даного показника. Визначення кількості CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> клітин продемонструвало, що додавання 0,1 та 0,15 мМ розчину АК до 7,5% ДМСО забезпечує життєздатність

**Таблиця 1** – Збереженість та життєздатність ГПК кордової крові до та після кріоконсервування з ДМСО у різній концентрації, %

Концентрація ДМСО, %	Збереженість		Життєздатність	
	До кріо.	Після кріо.	До кріо.	Після кріо.
5	98,9±1,0	70,1±2,4*	96,8±3,1	80,1±3,2*
7,5	97,4±1,8	78,3±3,1*	96,1±2,4	82,6±2,4*
10	92,1±2,5	79,1±2,9*	94,1±1,7	81,4±2,1*

**Примітка:** Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE.  
\* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи до кріоконсервування;  $p < 0,05$ .

**Таблиця 2** – Кількість збережених та життєздатних ГПК КК після криоконсервування з ДМСО у різній концентрації та антиоксидантами, %

Антиоксиданти (мМ)		Збереженість			Життєздатність		
		Концентрація ДМСО, %					
		5	7,5	10	5	7,5	10
аскорбінова кислота	0,05	76,2±2,1*	82,6±1,5	81,2±2,2	80,8±2,1	84,3±2,8	79,4±1,1
	0,1	79,1±3,3*	87,4±2,6*	85,4±2,5*	81,8±1,4	86,2±2,2	80,1±2,7
	0,15	77,4±2,8*	88,6±3,1*	84,9±2,1*	82,6±1,7	87,1±3,1	78,5±1,8
	0,2	70,8±1,9	82,4±1,8	80,8±1,6	78,4±2,3	82,9±1,9	75,2±2,8*
N-ацетил-L-цистеїн	5	73,2±1,8	79,3±2,2	80,8±4,1	81,3±1,8	84,8±2,1	83,2±1,4
	10	75,4±1,4*	86,4±1,6*	88,6±2,8*	84,2±1,3	86,6±1,8	87,8±3,3*
	15	76,1±2,1*	88,2±3,1*	90,2±3,1*	83,1±2,6	88,2±1,5*	86,6±2,1*
	30	72,8±1,5	80,1±1,7	81,3±1,4	80,9±2,0	85,2±1,1	84,4±1,8
глутатіон	0,5	80,5±3,3*	87,1±2,0*	84,8±1,8*	83,1±1,5	85,9±1,7	80,9±2,4
	1	84,4±2,9*	91,4±4,3*	90,5±3,5*	84,8±2,1	90,8±3,8*	85,8±2,8
	3	85,8±2,6*	93,6±3,7*	93,4±4,2*	83,7±1,4	91,2±4,0*	86,7±3,2
	5	82,1±4,3*	90,8±3,1*	89,6±5,1*	81,2±2,5	86,7±2,3	83,7±1,8

**Примітки:** Дані представлено у відсотках, у вигляді М±SE. \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи клітин, криоконсервованої без внесення антиоксидантів; p < 0,05.

80% ГПК після розморожування, що більш ніж на 10% вище, у порівнянні з клітинами, криоконсервованими без додавання антиоксиданта.

Наступним антиоксидантом, вплив якого було досліджено, став N-ацетил-L-цистеїн (АЦ). Пряма антиоксидантна дія АЦ обумовлена забезпеченням тіоловими групами цитоскелетних структур, які взаємодіють з електрофільними групами вільних радикалів і реактивними кисневими метаболітами, що дозволяє зберігати клітини від руйнування [6]. Даний антиоксидант інактивує практично всі різновиди активних метаболітів кисню, в тому числі найбільш реакційно здатні форми. Непряма антиоксидантна дія препарату зумовлена тим, що за рахунок амінокислоти цистеїну, яка утворюється під час розпаду АЦ, він стимулює синтез глутатіону, посилює активність глутатіон-S-трансферази, які також беруть активну участь в антиоксидантному захисті клітин і процесах відновлення дисульфідних зв'язків [11].

При дослідженні ГПК після криоконсервування із ДМСО та АЦ (табл. 2) було показано, що при використанні АЦ у концентраціях 5 і 30 мМ, показники збереженості та життєздатності не відрізнялися від проб, криоконсервованих без антиоксиданту. Найбільша кількість збережених та життєздатних клітин спостерігалася в пробах, заморожених із 10 та 15 мМ концентрацією АЦ у комбінації з 7,5% ДМСО і 10% ДМСО (табл. 2). Слід зазначити, що кількість CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> клітин в пробах, що містять 10 і 15 мМ АЦ і 7,5% ДМСО, становила 74,8±2,4% і 77,8±2,3%, а з 10% ДМСО – 77,8±3,3% і 78,1±3,1%, що перевищує аналогічні показники без використання антиоксидантів на 10–14%.

Ключова роль у захисті клітин від оксидативного стресу відводиться системі глутатіону, яка нейтралізує перекиси ліпідів і підтримує у відновленому стані SH-групи білків, забезпечуючи їх функціональну активність. Функції глутатіону різноманітні: відновлення й ізомеризація дисульфідних зв'язків, вплив на активність ферментів та інших білків, підтримка мембранних та коферментних функцій та ін. [5]. Антиоксидантна активність відновленого глутатіону тісно пов'язана з роботою захисних ферментів його системи і бере участь у всіх лініях захисту а, отже, вносить основний внесок у функціонування антиоксидантної системи. Тому наступним нашим завданням було проведення досліджень щодо визначення впливу різних концентрацій ДМСО та глутатіону на показники збереженості та життєздатності гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові після криоконсервування.

Додавання до криозахисного середовища, що містить 7,5% і 10% ДМСО, глутатіону в концентраціях 1 і 3 мМ сприяло підвищенню рівня збереженості CD34<sup>+</sup>-клітин на 13–15% в порівнянні з даними, отриманими без використання антиоксиданту (табл. 2). Оцінка життєздатності клітин також продемонструвала підвищення даного показника (табл. 2). Абсолютна кількість CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> клітин в пробах, що містять 1 і 3 мМ глутатіону в комбінації з 7,5% ДМСО становила 83,1±3,2 і 85,4±2,9 відповідно, а з 10% ДМСО – 77,6±3,3 і 81,4±2,8, що перевищувало аналогічні контрольні показники.

**Висновки.** Таким чином, додавання до криозахисного середовища антиоксидантів здатне значно

підвищити стійкість ГПК КК до дії факторів криоконсервування, що підтверджується показниками збереженості та життєздатності. Порівняльний аналіз застосованих нами трьох антиоксидантів дозволив встановити, що АК (0,1 та 0,15 мМ) та АЦ (10 та 15 мМ) у комбінації з 7,5 та 10% ДМСО підвищує кількість збережених життєздатних ГПК на 15% порівняно з пробами без додавання антиоксидантів. Додавання до криозахисного середовища з 7,5 та 10% ДМСО глутатіону у концентрації 1 та 3 мМ здатне зберегти в життєздатному стані до 90% ГПК КК, у той час як інші антиоксиданти забезпечують життєздатність приблизно 80% клітин. Слід також відзначити, що результати криоконсервування ГПК

в розчинах, що містять 5% ДМСО та зазначених вище ефективних концентраціях антиоксидантів були на рівні даних, отриманих із оптимальними концентраціями ДМСО (7,5 та 10%) без застосування антиоксидантів, що дозволяє знизити концентрацію ДМСО під час криоконсервування ГПК КК.

**Перспективи подальших досліджень.** Наступним нашим завданням буде оцінка ефективності криоконсервування ЯВК КК в криозахисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів після моделювання *in vitro* умов, наближених до фізіологічних. Це дасть можливість більш об'єктивно визначити стан клітин після розморожування.

## References

1. Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1569(1–3): 1–9.
2. Babijchuk LA, Makashova OYe, Zubov PM, Zubova OL. Estimation of antioxidant properties of N-acetyl-L-cysteine during cord blood cryopreservation with DMSO. *Cell Biology*. 2015;78.
3. Ballen K, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013;122:491–8.
4. Davis JM. *Basic Cell Culture A Practical Approach*. Oxford University Press; 2002. 382 p.
5. Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*. 2014;2(1): 88–99.
6. Hui Cheng, Yingdai Gao, Ming Shi, Linping Hu. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood*. 2014;124(20):45–8.
7. Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34+ cells to dimethyl sulphoxide. 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology*. 2003;46(1):76–8.
8. Kim KM, Huh JY, Hong SS, Kang MS. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion*. 2015;55(8):2017–22.
9. Özkavukcu S, Erdemli E. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *J Ankara Med School*. 2002;24:187–96.
10. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(10):635–42.
11. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*. 2014;141(2):150–9.
12. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13:204–8.

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

### КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ В КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДМСО И АНТИОКСИДАНТОВ.

*Макашова Е. Е., Zubova O. L., Zubov P. M., Мигунова Р. К., Бабийчук Л. А.*

**Резюме.** В работе проведена оценка эффективности применения антиоксидантов в сочетании с различными концентрациями ДМСО для криоконсервирования гемopoэтических прогениторных клеток (ГПК) кордовой крови (КК). Показано, что добавление к криозащитной среде аскорбиновой кислоты, N-ацетил-L-цистеина и глутатиона способствует улучшению устойчивости ГПК КК к действию факторов замораживания и повышению показателей сохранности и жизнеспособности. Добавление к криозащитным средам, содержащим 7,5 и 10% ДМСО, глутатиона в концентрации 1 и 3 мМ способно сохранить в жизнеспособном состоянии до 90% ГПК КК, по сравнению с двумя другими антиоксидантами в оптимальных концентрациях, которые обеспечивают жизнеспособность до 80% клеток, по сравнению с пробами консервированными без добавления антиоксиданта.

**Ключевые слова:** гемopoэтические прогениторные клетки; криоконсервирование; диметилсульфоксид; аскорбиновая кислота; N-ацетил-L-цистеин; глутатион.

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

**CRYOPRESERVATION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS  
IN CRYOPROTECTIVE MEDIA CONTAINING VARIOUS CONCENTRATIONS OF DMSO  
AND ANTIOXIDANTS**

*Makashova O. Ye., Zubova O. L., Zubov P. M., Mihunova R. K., Babiichuk L. A.*

**Abstract.** The use of hematopoietic progenitor cells (HPC) for the past 15 years has been firmly established in practical medicine as an effective treatment for diseases of various origins. Nowadays, one of the sources for obtaining hematopoietic progenitor cells is human cord blood (CB). Cord blood has become one of the most popular sources of HPC due to its unique properties, relative simplicity and security of procurement. The number of transplantations is increased every year, and the indications for this type of therapy are expanding. In this regard, it remains as an urgent for the development of protocols for cells' storage at low temperature. Adding antioxidants to the cryoprotective medium may enhance preservation and viability of cord blood HPC after cryopreservation and result in clinical efficacy improvement. The aim of this work is to assess the efficacy of antioxidants in combination with different concentrations of dimethylsulfoxide (DMSO) for cryopreservation of HPC. The efficacy of application of ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine and glutathione in combination with DMSO in cryopreservation of cord blood HPC has been evaluated. It has been shown that in the process of cryopreservation with DMSO, the preservation and viability of HPC decreases. One of the reasons for this may be the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells during freezing. The addition of antioxidants to the cryoprotective medium can significantly increase the stability of the HPC against the effects of cryopreservation factors and improve the preservation and viability indices. A comparative analysis of antioxidants revealed that ascorbic acid at concentrations of 0.1 and 0.15 mM and N-acetyl-L-cysteine (10 and 15 mM), in combination with 7.5% and 10% DMSO, increased the number of preserved viable HPC by 15% in comparison to the samples without adding the antioxidants. Addition of glutathione at a concentration of 1 and 3 mM to cryoprotective medium with 7.5% and 10% DMSO was able to maintain a viable state of up to 90% of the HPC, unlike the two other antioxidants that ensured the viability of 80% of the cells. It should be noted that the results of cryopreservation of HPC in solutions containing 5% DMSO and the above-mentioned effective concentrations of antioxidants were at the level of data obtained with optimal concentrations of DMSO (7.5 and 10%) without the use of antioxidants, which allowed decreasing the concentration of DMSO when there is cryopreserving the HPC.

**Keywords:** hematopoietic progenitor cells; cryopreservation; dimethyl sulfoxide; ascorbic acid; N-acetyl-L-cysteine; glutathione.

Стаття надійшла 03.04.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування