

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

Оптимізація методу кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові людини з використанням комбінації кріопротектора ДМСО та антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

Optimization of Cryopreservation Technique for Human Cord Blood Nucleated Cells Using Combination of Cryoprotectant DMSO and Antioxidant N-acetyl-L-cysteine

Реферат: У роботі оцінювали ефективність застосування антиоксиданту N-ацетил-L-цистеїну (АЦ) для кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК) людини з різними концентраціями ендоцелюлярного кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО). Встановлено, що збільшення концентрації ДМСО (з 2,5 і 5% до 7,5 і 10%) та часу експозиції суспензії ЯВК КК із кріопротектором (з 15 до 30 хв і більше) приводило до значного збільшення кількості клітин із надмірним вмістом активних форм кисню (АФК) (з $7,5 \pm 0,8\%$ при 5% ДМСО та 15-хвилинній інкубації до $28,9 \pm 3,2\%$ при 10% ДМСО та 60-хвилинній інкубації), зниження їх життєздатності та збереження. Додавання 10 мМ АЦ в середовище кріоконсервування призводило до зменшення кількості клітин із надмірним вмістом АФК і збільшення показників їх збереженості та життєздатності на етапі еквілібрації з кріопротектором, а також після заморожування і відігрівання суспензії ЯВК КК. Максимальний ефект був досягнутий після додавання АЦ до середовищ із 7,5- і 10%-ю концентрацією ДМСО. Доведено, що використання антиоксиданту сприяє підвищенню показників збереженості та життєздатності ЯВК КК в умовах оптимальної концентрації кріопротектора та часу експозиції з ним.

Ключові слова: кордова кров людини, ядровмісні клітини, активні форми кисню, кріоконсервування, диметилсульфоксид, антиоксиданти, N-ацетил-L-цистеїн.

Реферат: В работе оценивали эффективность применения антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина (АЦ) для криоконсервирования ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) человека с разными концентрациями эндоцеллюлярного кріопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). Установлено, что увеличение концентрации ДМСО (с 2,5 и 5% до 7,5 и 10%) и времени экспозиции суспензии ЯСК КК с кріопротектором (с 15 до 30 мин и более) приводило к существенному увеличению количества клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК) (с $7,5 \pm 0,8\%$ при 5% ДМСО и 15-минутной инкубации до $28,9 \pm 3,2\%$ при 10% ДМСО и 60-минутной инкубации), снижению показателей их жизнеспособности и сохранности. Добавление 10 мМ АЦ в среду криоконсервирования приводило к уменьшению количества клеток с избыточным содержанием АФК и увеличению показателей их сохранности и жизнеспособности на этапе эквilibрации с кріопротектором, а также после замораживания и отогрева суспензии ЯСК КК. Максимальный эффект был достигнут после добавления АЦ к средам с 7,5- и 10%-й концентрацией ДМСО. Доказано, что использование антиоксиданта способствует повышению показателей сохранности и жизнеспособности ЯСК КК в условиях оптимальной концентрации кріопротектора и времени экспозиции с ним.

Ключевые слова: кордовая кровь человека, ядродержащие клетки, активные формы кислорода, криоконсервирование, диметилсульфоксид, антиоксиданты, N-ацетил-L-цистеин.

Abstract: The paper evaluated the efficiency of N-acetyl-L-cysteine (AC) antioxidant during cryopreservation of human cord blood nucleated cells (CBNCs) with various concentrations of endocellular cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO). It has been found that rise in DMSO concentration (from 2.5 and 5 up to 7.5% and 10%) and exposure time of the CBNCs suspension with cryoprotectant (from 15 to 30 min and more) resulted in a significant increase in the amount of cells with excess reactive oxygen species (ROS) (from $7.5 \pm 0.8\%$ at 5% DMSO and 15-min incubation to $28.9 \pm 3.2\%$ with 10% DMSO and 60 min incubation), decrease in their viability and preservation rate. Supplementing 10 mM AC to the cryopreservation medium led to in a reduction in the amount of cells with excess ROS and rise of their preservation rate and viability at the stage of equilibration with cryoprotectant, as well as after freeze-thawing of CBNCs suspension. Maximum effect was achieved after AC supplementing to the media with 7.5 and 10% DMSO concentrations. We proved that the use of antioxidant contributed to the rise in preservation rate and viability of CBNCs if cryoprotectant concentration and exposure time with it were optimal.

Key words: human cord blood, nucleated cells, reactive oxygen species, cryopreservation, dimethyl sulfoxide, antioxidants, N-acetyl-L-cysteine.

Відділ кріцитології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: pmzubov@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: pmzubov@gmail.com

Надійшла 26.07.2016
Прийнята до друку 24.10.2016

Received July, 26, 2016
Accepted October, 24, 2016

© 2016 O.Ye. Makashova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

В останні роки спостерігається тенденція до широкого використання у клінічній практиці клітин кордової крові (КК). З 2009 року кількість проведених алотрансплантацій гемопоетичних стовбурових клітин КК перевищила кількість трансплантацій цих клітин кісткового мозку [6, 15]. На даний час у світі щорічно проводиться близько 3 тис. трансплантацій клітин КК пацієнтам із різними захворюваннями [20, 16]. Така увага клініцистів до використання та збільшення кількості трансплантацій КК призвела до необхідності створення мережі криобанків [13], в яких зразки зберігаються в замороженому стані за температури -196°C без втрати біологічних властивостей протягом необмеженого часу. Проте невеликі об'єми кожної дози КК та неможливість повторного забору викликають необхідність вибору оптимального методу криоконсервування ядровмісних клітин (ЯВК), до яких входять гемопоетичні стовбурові клітини. У зв'язку з цим актуальними є розробка нових і вдосконалення існуючих методів криоконсервування КК.

Для заморожування ЯВК КК найчастіше використовується криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) у концентрації 5–10% [14]. Під час криоконсервування ЯВК КК зазнають значного стресорного впливу, що може призвести до їх апоптозу як до, так і після розморожування [17]. Тому важливою є оцінка збереженості та життєздатності клітин не тільки відразу після розморожування, але й через деякий час після їх перенесення до умов, які наближені до фізіологічних. Слід зазначити, що апоптоз клітин може бути викликаний різними факторами, зокрема активними формами кисню (АФК). У зв'язку з цим важливою є розробка методів, за допомогою яких було б можливим запобігання накопиченню АФК на всіх етапах криоконсервування, це дозволило б уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу. Перспективним може бути додавання до суспензії клітин речовин, які мають виражені антиоксидантні та цитопротекторні властивості. До таких речовин відносять N-ацетил-L-цистеїн (АЦ), який характеризується не тільки безпосередньою антиоксидантною активністю, але й бере участь у синтезі глутатіону та забезпеченні тіоловими групами цитоскелетних структур, що дозволяє зберігати клітини від руйнування [11]. Однак розробка методів криоконсервування неможлива без визначення впливу даного антиоксиданту на ЯВК КК під час заморожування-відігріву. Тому метою даної роботи було проведення досліджень щодо визначення впливу різних концентрацій диметилсульфоксиду (ДМСО) та N-ацетил-L-цистеїну на показники збереженості, життєздатності та вмісту активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові до та після криоконсервування.

Recently the application of cord blood (CB) in clinical practice has become widespread. Since 2009, a number of performed allotransplantations of CB hematopoietic stem cells exceeded that of transplantations of the bone marrow cells [5, 14]. Nowadays about 3 thousand transplantations of CB cells are annually performed around the world to patients in different diseases [20, 15]. Such an attention of clinicians to CB application and increased number of its transplantations have resulted in a need to establish the network of cryobanks [12], where the samples are stored in a frozen state at -196°C with no loss in their biological properties for unlimited time period. So, the small amounts of each CB dose and impossible re-sampling make it necessary to choose the optimal cryopreservation method for nucleated cells (NCs), comprising hematopoietic stem cells. In this regard, the development of novel methods for CB cryopreservation and optimizing the existing ones have still remained actual.

The cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5–10% concentration is quite often used to freeze the CB NCs [13]. During cryopreservation the CB NCs undergo a significant stress effect, which may result in apoptosis, both prior to and after thawing [16]. So, it is important to assess the cell survival and viability not only immediately after thawing, but some time after transferring them into the conditions close to physiological ones. It is to be noted that the cell apoptosis may be initiated *inter alia* by different factors, in particular, reactive oxygen species (ROS). Due to this fact of importance is to develop the methods, which could prevent the ROS accumulation at all the cryopreservation stages, to either avoid or slow down the oxidative stress development. The supplement of cell suspension with the substances possessing pronounced antioxidative and cytoprotective properties may be prospective. Among others one could mention N-acetyl-L-cysteine (AC), not only featured by a direct antioxidant activity, but also participating in glutathione synthesis and providing the cytoskeletal structure with thiol groups, protecting the cells from destruction [10]. However, the design of cryopreservation techniques is impossible without determining this antioxidant effect on CB NCs during freeze-thawing. Therefore this work purpose was to determine the effect of different concentrations of DMSO and N-acetyl-L-cysteine on the survival and viability indices and reactive oxygen species content in cord blood nucleated cells prior to and after cryopreservation.

Materials and methods

We used the human CB, collected after obtaining an informed consent of pregnant woman, with previous thorough prenatal screening for contraindications to donation. Blood exfusion was done into a closed blood sampling system with 25 ml anticoagulant from umbilical



Матеріали та методи

У роботі використовували КК людини, збір якої проводили після отримання інформованої згоди у вагітної, з попереднім проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Експфузію крові здійснювали закритим шляхом у систему для забору крові з 25 мл антикоагулянту з пупкової вени під час природних пологів після народження дитини й відділення її від плаценти.

Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкуні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біохімік», Росія) з молекулярною масою 60 000). Для цього спочатку до крові додавали поліглюкун у співвідношенні 1:1 за об'ємом, потім відстоювали до чіткого розподілу еритроцитарного шара та фракції ядровмісних клітин (від 30 до 50 хв). Супернатант відбирали та центрифугували протягом 5–7 хв при 800g для отримання концентрату ЯВК.

У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5; 7,5 та 10%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за температури 0...4°C. Перед змішуванням суспензії клітин і розчини кріопротектора доводили до відповідних температур; ДМСО додавали крапельним шляхом при постійному перемішуванні.

У роботі використовували АЦ («Sigma-Aldrich», США) у кінцевій концентрації 10 мМ, який перед кріоконсервуванням вносили в проби з ДМСО.

Зразки кріоконсервували в програмному заморожувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°C із наступним зануренням у рідкий азот (–196°C) [3]. Відігрівання здійснювали за температури 37–40°C на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази.

Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою [7]. Збереженість клітин визначали як відсоток кількості клітин у досліджуваному зразку по відношенню до початкової їх кількості до будь-якого впливу (інкубація з кріопротектором, заморожування-відігрів).

Життєздатність CD45⁺-клітин оцінювали за стандартним протоколом ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) з використанням моноклонального антитіла CD45-FITC і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) [24] методом проточної цитофлуориметрії. Для цього до 50 мкл цільної крові додавали по 10 мкл реагентів (FITC-мічений CD45, клон 2D1 та 7AAD). Перемішували й інкубували 15 хв за кімнатної температури в темряві. До кожної пробірки додавали 1 мл розчину хлориду амонію («BD», США), який викликав лізис клітин. Аналізували проби за допомогою програмного забезпечення «CellQuest Pro» («BD»).

vein during natural labour after child birth and separation from placenta.

The NCs fraction was isolated from the whole CB by sedimentation in Polyglucinum (6% dextran solution (JSC Biokhimik, Russia) with 60,000 molecular weight). For this purpose the blood was first mixed with Polyglucinum in 1:1 (v/v) ratio, then precipitated up to distinct separation of erythrocytes and nucleated cells appearance. Sedimentation time made from 30 to 50 min, then the supernatant was collected and centrifuged for 5–7 min at 800g to obtain the NCs concentrate.

Cell suspension was supplemented with 25% DMSO solution up to 2.5; 5; 7.5 and 10% final concentrations in a sample. Cell suspensions were treated with cryoprotectant at a low positive temperature 0...4°C. Before mixing the cell suspension and cryoprotectant solutions were brought to the appropriate temperatures; DMSO was dropwise added during a constant stirring.

Here we used the AC (Sigma-Aldrich, USA) in a 10 mmol/L final concentration, supplemented to DMSO containing samples prior to cryopreservation.

Samples were cryopreserved using a programmable freezer (Cryoson, Germany) with 1–3 deg/min rate down to –80°C, followed by immersion into liquid nitrogen (–196°C) [4]. Thawing was done in a 37–40°C water bath with constant shaking until a solid phase disappeared.

The absolute cell number was counted in Goryaev's chamber according to the standard procedure [9]. The cell survival was determined as the percentage of cell number in the studied sample with respect to their initial one prior to any impact (incubation with cryoprotectant, freeze-thawing).

The viability of CD45⁺-cells was assessed by the standard ISHAGE protocol (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) using a monoclonal antibody CD45-FITC and DNA dye 7-aminoactinomycin D (7AAD) [24] by means of flow cytometry. For this purpose the whole blood (50 µl) was supplemented with 10 µl of reagents (FITC-labeled CD45, clone 2D1 and 7AAD), then mixed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Each tube was supplemented with 1 ml ammonium chloride solution (BD, USA), which caused cell lysis. Samples were analyzed with the CellQuest Pro software (BD).

To determine the amount of the cells with excess ROS we used the highly specific ROS indicator: dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) (Sigma-Aldrich, USA) [8, 28]. The measurements were carried out using flow cytometry with FACS Calibur flow cytometer (BD) at 488 nm excitation wavelength and recording emission at 530 nm. Samples were supplemented with DCFH₂-DA in a final concentration of 5 µM, and incubated then 30 min at 37°C in the dark. The measurement results were assessed with the Cell Quest Pro software (BD) [25]. The cells, the fluores-



Для визначення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК використовували високоспецифічний індикатор АФК-дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCFH₂-DA) («Sigma-Aldrich») [10, 28]. Вимірювання проводили методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD») при довжині хвилі збудження 488 нм та ресстрацією емісії 530 нм. До проб додавали DCFH₂-DA у кінцевій концентрації 5 мкМ із наступним інкубуванням протягом 30 хв при 37°C у темряві. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CellQuest Pro» («BD») [25]. Клітинами з надлишковим вмістом АФК у кожній експериментальній групі вважалися ті, флуоресценція яких перевищувала флуоресценцію ЯВК відразу після виділення з цільної КК.

Для визначення відстроченої загибелі частину клітин після розморожування переносили до розчину Хенкса у співвідношенні 1:10 й інкубували при 37°C протягом години. Після цього визначали збереженість, життєздатність та вміст АФК у клітинах методом проточної цитофлуориметрії.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft», США) після встановлення нормальності розподілу. Дані представляли як $M \pm m$. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Терапевтична ефективність кріоконсервованих препаратів КК значною мірою залежить від кількості збережених клітин та їх функціональної активності після розморожування [4]. Тому необхідно проводити ретельну оцінку структурно-функціональних показників гемопоетичних стовбурових клітин КК після кріоконсервування. Окрім цього, у зв'язку з обмеженим об'ємом дози КК (не більше 100 мл) та неможливістю її повторного забору важливо зберегти максимальну кількість ЯВК, до складу яких входять і гемопоетичні стовбурові клітини [22].

Від стану клітин перед кріоконсервуванням залежить результат заморожування-відігріву, тому визначення показників їх збереженості й життєздатності до заморожування необхідне для прогнозування результату кріоконсервування.

Раніше зазначалося [9, 19], що основним кріопротектором, який використовується для кріоконсервування ЯВК КК, є ДМСО. Проте окрім кріопротекторного ефекту він може впливати на властивості мембранної поверхні, структурну впорядкованість ліпідів, конформацію периферичних та інтегральних білків, а також на метаболічний стан клітин, зокрема, на інгібування антиоксидантної системи [12]. Внаслідок цього в клітинах може збільшитися рівень

якого перевищувала кількість АФК, що вказує на наявність надлишкової активності реактивних форм кисню (ROS) у клітинах. Надлишок ROS, який перевищує той, що присутній у клітинах після розморожування, вважався надлишковим.

Для визначення затриманої смерті деяких клітин після заморожування-відігріву їх перенесли в розчин Ганкса у співвідношенні 1:10 та інкубували при 37°C протягом 1 год. Після цього визначали виживання, життєздатність та вміст ROS у клітинах методом проточної цитофлуориметрії.

Наші результати були статистично оброблені за допомогою тесту Стьюдента-Фішера за допомогою програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США). Різниця вважалася статистично значущою при $p < 0,05$.

Results and discussion

Терапевтична ефективність КК кріоконсервованих препаратів переважно залежить від кількості виживаних клітин та їх функціональної активності після відігріву [1]. Тому необхідно проводити ретельну оцінку структурно-функціональних показників гемопоетичних стовбурових клітин КК після кріоконсервування. Окрім цього, у зв'язку з обмеженим об'ємом дози КК (не більше 100 мл) та неможливістю її повторного забору важливо зберегти максимальну кількість НКС, до складу яких входять і гемопоетичні стовбурові клітини *inter alia* [21].

Результат заморожування-відігріву залежить від стану клітин перед кріоконсервуванням, тому визначення показників їх виживання та життєздатності до заморожування необхідне для прогнозування результату кріоконсервування.

Як було зазначено раніше, ДМСО є основним кріопротектором, який використовується для кріоконсервування КК [7, 19]. Проте окрім кріопротекторного ефекту [11] він може впливати на властивості мембранної поверхні, структурну регулярність ліпідів, конформацію периферичних та інтегральних білків, а також на метаболічний стан клітин, зокрема, на інгібування антиоксидантної системи, особливо після 30 хв. Це може призвести до підвищення рівня ROS у клітинах, що може призвести до їх подальшої смерті. Через це, дуже важливо, щоб рівень ROS у клітинах відповідав фізіологічній нормі [21]. Тому визначення вмісту ROS є одним з ключових параметрів для оцінки стану КК та впливу на них умов інкубування в розчинах кріопротекторів різних концентрацій на етапі рівноваги [26, 27].

Для вивчення впливу концентрації та часу впливу на КК у суспензії ми використовували ДМСО у концентраціях 2,5; 5; 7,5 та 10% кінцевих концентрацій та часу інкубування від 0 до 60 хв.

Наші результати (рис. 1) щодо накопичення ROS у клітинах перед кріоконсервуванням продемонстрували збільшення кількості клітин з надлишком ROS при збільшенні концентрації ДМСО до 7,5 та 10% та часу інкубування (особливо після 30 хв), що може вказувати на розвиток окисного стресу та/або можливе інгібування ендогенних антиоксидантних систем, які мають нейтралізувати вільні



АФК, що у подальшому може призвести до їх загибелі. У зв'язку з цим важливо, щоб рівень АФК у клітинах відповідав фізіологічній нормі [21]. Отже, визначення вмісту АФК є одним із основних інтегральних параметрів оцінки стану ЯВК і впливу на них різних концентрацій кріопротектора на етапі еквілібрації [26, 27].

З метою вивчення впливу концентраційного й часового чинників на суспензію ЯВК використовували ДМСО у кінцевій концентрації 2,5; 5; 7,5 та 10% і час інкубації від 0 до 60 хв.

Отримані дані щодо накопичення АФК у клітинах до кріоконсервування показали, що з підвищенням концентрації ДМСО до 7,5 та 10% і подовженням часу еквілібрації (особливо після 30 хв) збільшувалася кількість клітин із надлишковим вмістом АФК, що може вказувати на розвиток окисного стресу та/або можливе пригнічення ендогенних антиоксидантних систем, які нейтралізують вільні радикали (рис. 1). У зв'язку з цим під час розробки протоколів кріоконсервування необхідно забезпечити мінімальний час контакту клітин із ДМСО як до, так й особливо після кріоконсервування.

Окрім визначення вмісту АФК у клітинах ми проаналізували вплив різних концентрацій ДМСО та часу еквілібрації з ним на збереженість і життєздатність ЯВК. Отримані дані (табл. 1) вказують на те, що збільшення як концентрації кріопротектора (до 7,5 та 10%), так і часу експозиції з ним (після 45 хв) призводить до вираженого зниження цих показників. Слід зазначити, що ДМСО у концентраціях 2,5 та 5% значно менше впливав на них, що може бути пов'язано з низькою концентрацією кріопротектора.

Показники життєздатності клітин різних експериментальних груп на етапі еквілібрації з ДМСО між собою значуще не відрізнялися. Значне зниження даного показника спостерігалось після еквілібрації з 10% ДМСО впродовж 30 хв (табл. 1).

Оскільки в нашій роботі показано збільшення вмісту АФК під час еквілібрації ЯВК КК із ДМСО, то було доцільним використовувати речовину, яка здатна «перехоплювати» вільні радикали або нейтралізувати джерело їх виникнення. Однією з таких речовин є АЦ, пряма антиоксидантна дія якого обумовлена наявністю вільної тіольної групи, що взаємодіє з електрофільними групами вільних радикалів

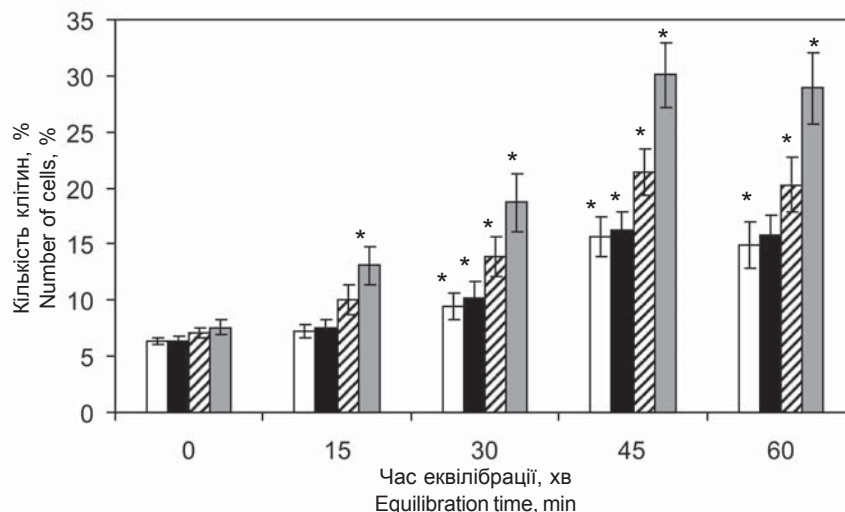


Рис. 1. Кількість ЯВК КК із надлишковим вмістом АФК залежно від концентрації ДМСО та часу еквілібрації до кріоконсервування: □ – 2,5% ДМСО; ■ – 5% ДМСО; ▨ – 7,5% ДМСО; ▩ – 10% ДМСО; * – результати відрізняються від нульової точки інкубації з ДМСО, $p < 0,05$.

Fig. 1. CB NCs amount with excess ROS depending on DMSO concentration and equilibration time prior to cryopreservation: □ is 2.5% DMSO; ■ – 5% DMSO; ▨ – 7.5% DMSO; ▩ – 10% DMSO; * – significant differences comparing to zero point of incubation with DMSO, $p < 0.05$.

radicals. In this regard, when designing the cryopreservation protocols it is necessary to ensure the minimum time of cell contact with liquid DMSO phase both prior to and especially after cryopreservation.

In addition to determine the ROS content in cells we analyzed the effect of different concentrations of DMSO solutions and incubation time span with it on NCs survival and viability. Our findings (Table 1) demonstrate an increase in both cryoprotectant concentration (up to 7.5 and 10%) and exposure time with it (after 45 min) to result in a pronounced reduction of these indices. Of note is the fact, that DMSO in 2.5 and 5% concentrations affected these indices in a much less degree, that might be associated with its low and ultra low concentration.

The cell viability indices in different experimental groups at the stage of incubation with DMSO did not significantly differ. A significant decrease in this index was observed after equilibration with 10% DMSO within 30 min (Table 1).

Since our research demonstrated the augmentation of ROS content during CB NCs equilibration with DMSO, it would be expedient then to use the substance capable to either 'scavenge' free radicals or neutralize the source of their origin. One of these substances is AC, an antioxidant effect of which is stipulated by the presence of free thiol group, interacting with electrophilic groups of free radicals and reactive oxygen metabolites. This substance inactivates virtually all the species of active oxygen metabolites, including the most reactive

Таблиця 1. Збереженість та життєздатність ЯВК КК (%) залежно від концентрації ДМСО та часу еквілібрації до кріоконсервування ($M \pm SE$)

Table 1. CB NCs survival and viability (%) depending on DMSO concentration and equilibration time prior to cryopreservation ($M \pm SE$)

Час інкубації, хв Incubation time, min	Збереженість Survival				Життєздатність Viability			
	2,5% ДМСО DMSO	5% ДМСО DMSO	7,5% ДМСО DMSO	10% ДМСО DMSO	2,5% ДМСО DMSO	5% ДМСО DMSO	7,5% ДМСО DMSO	10% ДМСО DMSO
0	99,6 ± 0,4	98,8 ± 0,96	96,4 ± 1,38	96,4 ± 0,78	97,2 ± 1,48	97,0 ± 0,8	96,6 ± 0,64	95,5 ± 0,92
15	99,2 ± 1,09	98,8 ± 0,92	95,6 ± 0,76	96,0 ± 0,86	96,1 ± 1,42	95,3 ± 0,64	95,3 ± 1,8	94,6 ± 0,78
30	98,8 ± 0,91	98,4 ± 0,76	95,6 ± 2,8	87,6 ± 2,92*	95,6 ± 1,58	94,5 ± 1,42	94,4 ± 2,13	92,0 ± 1,74
45	98,8 ± 1,23	96,4 ± 1,41	91,6 ± 0,75*	83,7 ± 2,15*	95,0 ± 1,74	94,6 ± 0,98	94,7 ± 1,31	92,8 ± 1,45
60	97,6 ± 1,63	95,6 ± 0,76	87,6 ± 2,37*	71,7 ± 2,92*	95,8 ± 0,92	96,0 ± 1,17	96,2 ± 1,45	95,5 ± 1,4

Примітка: * – результати статистично значущі по відношенню до нульової точки інкубації з ДМСО, $p < 0,05$.

Note: * – significant differences comparing to zero point of incubation with DMSO, $p < 0.05$.

і реактивними кисневими метаболітами. Ця речовина інактивує практично всі форми активних метаболітів кисню, в тому числі найбільш реакційні. Непряма антиоксидантна дія препарату зумовлена розпадом АЦ із утворенням амінокислоти цистеїну, яка стимулює синтез глутатіону та посилює активність глутатіон-S-трансферази. Дані речовини беруть активну участь в антиоксидантному захисті клітин і процесах відновлення дисульфідних зв'язків [8, 23].

Для з'ясування оптимальної концентрації АЦ раніше були проведені експерименти з вивчення антиоксидантної дії різних його концентрацій: 5; 10; 15 і 30 мМ [1, 2, 5]. Результати експериментів показали, що концентрації 5 та 30 мМ розчину АЦ під час додавання до суспензії клітин, інкубованих із різними концентраціями ДМСО, незалежно від концентрації кріопротектора не проявляли антиоксидантної дії, а у випадку використання концентрації 30 мМ навіть спостерігався прооксидантний ефект. У концентраціях 10 та 15 мМ АЦ зменшувалася кількість клітин із надлишковим вмістом АФК і, як наслідок, відбувався цитопротекторний вплив, на що вказували показники збереженості, які спостерігаються при високих концентраціях ДМСО. Для наступної серії експериментів використовували концентрацію 10 мМ, оскільки вона виявилася кращою [8].

Проведені дослідження дозволили встановити, що АЦ, доданий до середовища з ДМСО, сприяв зменшенню кількості клітин із надлишковим вмістом АФК (табл. 2), а також підвищенню їх збереженості та життєздатності (табл. 3). Варто зазначити, що подовження як часу інкубації, так і концентрації

ones. Indirect antioxidant effect of this drug is stipulated by the AC decay, which stimulates glutathione synthesis and strengthens glutathione-S-transferase activity. These substances are actively involved into cell antioxidant protection and disulfide bond renewal [6, 23].

Previously, to elucidate the AC optimal concentration the experiments on studying an antioxidant effect of its different concentrations: 5; 10; 15 and 30 mmol/L, were carried out [2, 3, 17]. The findings showed 5 and 30 mmol/L AC concentrations of AC solutions as not manifesting antioxidant action while adding to cell suspension, incubated with different DMSO concentrations, irrespective of cryoprotectant concentration, moreover in case with 30 mmol/L a prooxidant effect was observed. The AC at 10 and 15 mmol/L concentrations reduced a cell number with excess ROS, and as a result, had a cytoprotective effect, as indicated by the survival indices, observed at high concentrated DMSO. For the next series of experiments we used 10 mmol/L concentration, as it occurred to be the most suitable [6].

The performed studies enabled establishing the fact, that the AC supplemented to the medium with DMSO, contributed to reduce a cell number with excess ROS (Table 2), as well as to enhance their survival and viability (Table 3). It should be noted that the augmentation of both incubation time and cryoprotectant concentration results in an increased number of cells with excess ROS. However, in the samples with 10 mmol/L these changes were less pronounced, even after increasing the cryoprotectant concentration up to 7.5 and 10%. Thus, the AC introduction into the NCs incubated with DMSO may play a key role in keeping lipid asymmetry



кріопротектора призводило до збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК. Проте у пробах із концентрацією 10 мМ ці зміни були менш виражені навіть після підвищення концентрації кріопротектора до 7,5 та 10%. Таким чином, введення АЦ до ЯВК, інкубованих з ДМСО, може грати ключову роль у збереженні ліпідної асиметрії мембран як на етапі підготовки до кріоконсервування, так і після заморожування-відігріву.

Найбільш небезпечними етапами для клітин під час кріоконсервування є заморожування та розморожування [8]. Тому наступним завданням нашої роботи було оцінити ефективність кріоконсервування ЯВК КК в криозахисних розчинах, які містять різні концентрації ДМСО та 10 мМ АЦ.

Отримані результати (табл. 4) продемонстрували збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК, кріоконсервованих із 2,5 та 5% ДМСО без додавання АЦ, порівняно з даними до кріоконсервування з точкою інкубації 30 хв (відрізок часу від обробки клітин кріопротектором до заморожування) (див. табл. 2).

Низький відсоток клітин із надлишковим вмістом АФК у пробі, кріоконсервованій із 2,5% ДМСО, вочевидь зумовлений значною руйнацією клітин (див. табл. 3). Це свідчить про те, що у зразку залишилися максимально криостійкі клітини. Після заморожування з ДМСО в концентраціях 7,5 і 10% значущих відмінностей між цими групами виявлено не було.

У зразках, кріоконсервованих із додаванням АЦ, спостерігалася менша кількість клітин із надлишковим вмістом АФК по відношенню до відповідних груп, кріоконсервованих без антиоксиданту (за виключенням 2,5% ДМСО). Їх кількість була значуще нижчою у 2,5 рази порівняно з відповідними групами без внесення антиоксиданту. Найкращі результати отримано в зразках, кріоконсервованих із 7,5 та 10% розчином ДМСО, що повністю відповідає даним щодо збереженості та життєздатності.

Результати аналізу збереженості клітин після кріоконсервування (табл. 4) продемонстрували зниження цього показника та зворотну залежність

Таблиця 2. Кількість ЯВК КК (%) із надлишковим вмістом АФК залежно від концентрації ДМСО та часу інкубації при додаванні 10 мМ АЦ до кріоконсервування ($M \pm SE$)

Table 2. CB NCs number (%) with excess ROS depending on DMSO concentration and equilibration time when supplementing with 10 mmol/L AC prior to cryopreservation ($M \pm SE$)

Час інкубації, хв Incubation time, min	Groups Групи	Кількість клітин із надлишковим вмістом АФК Cell number with excess ROS			
		2,5% ДМСО 2.5 % DMSO	5% ДМСО 5% DMSO	7,5% ДМСО 7.5% DMSO	10% ДМСО 10% DMSO
0	ДМСО DMSO	6,3±0,3	6,4±0,4	7,1±0,5	7,6±0,6
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	4,7±0,44 [#]	5,1±0,55 [#]	4,9±0,69 [#]	6,3±0,64
15	ДМСО DMSO	7,2±0,6	7,5±0,8	10±1,3*	13,1±1,7*
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	7±0,56*	6±0,66	8±0,92*	11,2±0,61*
30	ДМСО DMSO	9,4±1,2*	10,2±1,5*	13,9±1,8*	18,7±2,6*
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	7,2±0,66* [#]	9,7±0,49*	12,4±0,72*	15,3±0,9*
45	ДМСО DMSO	15,7±1,8*	16,3±1,6*	21,4±2,1*	30,1±2,9*
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	14,3±0,81*	12,9±0,9* [#]	16,7±0,49- **	22,4±0,78- **
60	ДМСО DMSO	14,9±2,1*	15,8±1,8*	20,3±2,5*	28,9±3,2*
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	14,7±0,72*	16,4±0,66*	19,6±0,66*	27,4±2,21*

Примітка: * – результати статистично значущі по відношенню до нульової точки інкубації з ДМСО; # – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи без внесення АЦ; $p < 0,05$.

Note: * – results are significant in respect to zero point of incubation with DMSO; # – difference is statistically significant in respect to corresponding group without AC; $p < 0.05$.

of membranes both at the preparation stage prior to cryopreservation and after freeze-thawing.

Freezing and thawing are the most dangerous stages for cells during cryopreservation [6]. So the next task in our study was to assess the efficiency of CB NCs cryopreservation in cryoprotective solutions containing differently concentrated DMSO and 10 mmol/L AC.

Our findings (Table 4) showed an increased cell number with excess ROS, cryopreserved with 2.5 and 5% DMSO without AC supplement as compared to the data prior to cryopreservation with a 30 min incubation point (time interval from cell treatment with cryoprotectant to freezing) (see Table 2). A low percentage of cells with excess ROS in the sample, cryopreserved with 2.5% DMSO, was apparently stipulated by a significant cell disintegration (see Table 3). This testifies to the fact that only the cells with maximum cryoresistance remained in a sample. After freezing with 7.5 and 10% DMSO no significant differences between these groups were found.

Таблиця 3. Збереженість і життєздатність ЯВК КК (%) при різному часі еквилібрації з ДМСО при додаванні 10 мМ АЦ до кріоконсервування ($M \pm SE$)

Table 3. Survival and viability of CB NCs (%) at different equilibration time with DMSO when supplementing with 10 mmol/L AC prior to cryopreservation ($M \pm SE$)

Час інкубації, хв Incubation time, min	Збереженість Survival				Життєздатність Viability			
	2,5% ДМСО DMSO	5% ДМСО DMSO	7,5% ДМСО DMSO	10% ДМСО DMSO	2,5% ДМСО DMSO	5% ДМСО DMSO	7,5% ДМСО DMSO	10% ДМСО DMSO
0	99,4 ± 0,6	99,1 ± 0,4	97,3 ± 1,7	97,1 ± 2,8	97,2 ± 2,3	97,5 ± 0,7	97,2 ± 1,0	95,0 ± 1,7
15	99,0 ± 0,8	99,0 ± 0,3	96,2 ± 3,1	96,5 ± 2,7	97,0 ± 1,7	97,0 ± 0,9	95,8 ± 1,4	93,8 ± 3,3
30	98,4 ± 0,7	98,7 ± 0,8	96,0 ± 1,7	91,3 ± 2,7*	97,2 ± 1,3	95,7 ± 1,8	94,7 ± 3,4	93,0 ± 2,7
45	98,1 ± 0,3	97,8 ± 0,8	94,1 ± 3,6	87,2 ± 4,8*	96,8 ± 3,1	92,7 ± 4,2	96,2 ± 1,7	93,3 ± 2,6
60	97,1 ± 1,8	97,3 ± 0,9	92,3 ± 2,1*	77,3 ± 4,3*	96,8 ± 2,3	95,8 ± 2,8	96,3 ± 0,7	95,7 ± 1,9

Примітка: * – результати статистично значущі по відношенню до нульової точки інкубації з ДМСО, $p < 0,05$.

Note: * – significant differences comparing to zero point of incubation with DMSO, $p < 0.05$.

між числом збережених клітин і кількістю клітин із надлишковим вмістом АФК (за винятком зразка з 2,5% ДМСО, у якому відбулося надмірне руйнування клітин). У зразках, кріоконсервованих без АЦ із визначеним максимальним вмістом АФК, спостерігалася найменша збереженість клітин. Це є результатом застосування неефективної (низької або наднизької) концентрації кріопротектора за цієї програми кріоконсервування. Найкращі показники збереженості були після використання 7,5 та 10% розчину ДМСО.

Заморожування ЯВК у середовищах, які містять 10 мМ АЦ, забезпечувало більш високі показники збереженості ЯВК КК порівняно з відповідними контрольними групами без АЦ за виключенням проб, кріоконсервованих із наднизькою (2,5%) концентрацією кріопротектора.

Аналіз відсоткового вмісту життєздатних клітин показав його зниження після кріоконсервування, однак не виявив значущих відмінностей між експериментальними групами (табл. 4). Проте під час перерахунку на кількість збережених клітин (рис. 2) було з'ясовано, що кріоконсервування з АЦ значуще підвищує загальну кількість життєздатних ЯВК у пробах, кріоконсервованих із ДМСО у концентраціях 7,5 та 10%.

Таким чином, отримані результати вказують на те, що кріоконсервування ЯВК КК із 7,5 та 10% ДМСО у присутності 10 мМ АЦ забезпечує найкращі досліджувані показники серед усіх оцінюваних комбінацій (табл. 4).

На наступному етапі нами була проведена оцінка відстроченої загибелі клітин після розморожування. Для цього ми застосували підхід із перенесення ЯВК КК до умов, наближених до фізіологічних. В експерименті ми використовували просту

In the samples cryopreserved with AC we observed a lower number of cells with excess ROS with respect to the corresponding groups with no antioxidant (except 2.5% DMSO). Their number was significantly lower in 2.5 times as compared to the corresponding antioxidant-free groups. The best results were obtained in those samples, cryopreserved with 7.5 and 10% DMSO solution, which completely coincided with the survival and viability data.

The results of cell survival analysis after cryopreservation (Table 4) demonstrated a decrease in this index and an inverse relationship between a number of survived cells and the excess ROS cell amount (except the sample with 2.5% DMSO, where an excess cell disintegration occurred). The lowest survival of cells was observed in the AC-free cryopreserved samples with the determined maximum ROS content. This results from applying an inefficient (either low or extremely low) cryoprotectant concentration in this cryopreservation protocol. The highest survival indices were obtained after using 7.5 and 10% DMSO solution.

The NCs freezing in the media containing 10 mmol/L AC provided higher indices of CB NCs survival as compared to the corresponding AC-free control groups, excluding those samples, cryopreserved with extremely low (2.5%) cryoprotectant concentration.

Analysis of a percentage of viable cells showed the reduction of this index after cryopreservation, but no significant differences between experimental groups were revealed (Table 4). However, in terms of the absolute number of survived cells (Fig. 2), the cryopreservation with AC was found to significantly increase the total number of viable NCs in the samples cryopreserved with 7.5 and 10% DMSO.

Thus, our findings indicate the NCs cryopreservation with 7.5 and 10% DMSO in presence of 10 mmol/L



модель, відтворюючи тільки основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином у кровоносному руслі реципієнта; ізоосмотичність середовища та температура інкубації (37°C). Підтримання температури 37°C протягом усього періоду інкубації клітин – важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму, оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс у клітинному метаболізмі у зв'язку з уповільненням функціональної активності практично всіх процесів під час зниження температури. Слід зазначити, що відносна нетривалість даного експерименту (година) здатна забезпечити цілком задовільні умови для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК КК у наближених до фізіологічних умовах.

Під час аналізу результатів збереженості та життєздатності клітин після перенесення до фізіологічних умов протягом години

Таблиця 4. Збереженість, життєздатність і кількість клітин із надлишковим вмістом АФК у ЯВК КК (%) після заморожування залежно від концентрації ДМСО та 10 мМ АЦ ($M \pm SE$)

Table 4. Survival, viability and number of cells with excess ROS in CB NCs (%) after freezing depending on DMSO concentrations and 10 mmol/L AC ($M \pm SE$)

Концентрація ДМСО, % Concentration of DMSO, %	Групи Groups	Збереженість Survival	Життєздатність Viability	Кількість клітин із надлишковим вмістом АФК Number of cells with excess ROS
2,5	ДМСО DMSO	47,2 ± 3,7	21,8 ± 5,1	12,1 ± 1,2
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	50,0 ± 7,2	23,5 ± 3,2	16,7 ± 3,0*
5	ДМСО DMSO	63,2 ± 2,7	75,2 ± 3,9	29,5 ± 4,7
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	72,3 ± 2,8*	74,5 ± 3,7	12,1 ± 2,3*
7,5	ДМСО DMSO	72,1 ± 3,2	78,5 ± 4,2	20,6 ± 3,2
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	83,9 ± 4,3*	80,1 ± 3,9	8,7 ± 1,5*
10	ДМСО DMSO	73,4 ± 2,1	76,9 ± 3,1	21,2 ± 1,9
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	84,6 ± 5,9*	77,8 ± 2,9	8,3 ± 0,9*

Примітка: * – результати статистично значущі по відношенню до нульової точки інкубації з ДМСО, $p < 0,05$.

Note: * – significant differences comparing to zero point of incubation with DMSO, $p < 0.05$.

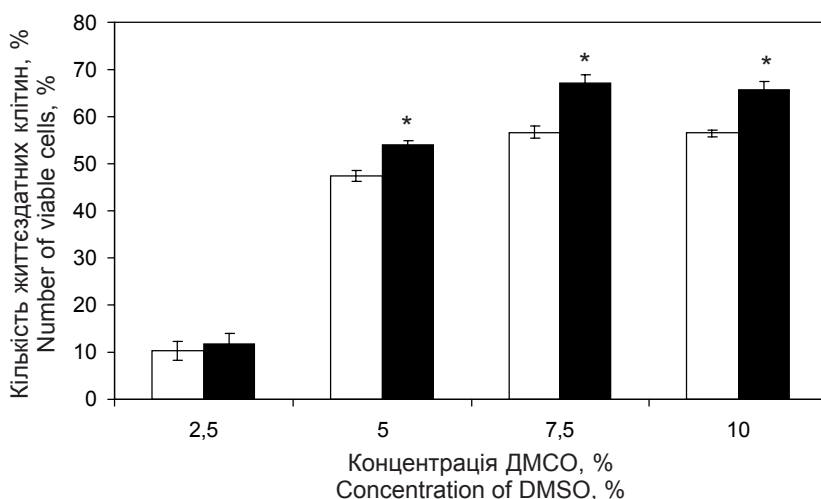


Рис. 2. Кількість життєздатних ЯВК КК після кріоконсервування з різною концентрацією ДМСО і N-ацетил-L-цистеїном у концентрації 10 мМ з урахуванням абсолютної кількості збережених клітин: □ – без внесення АЦ, ■ – в присутності АЦ; * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи, кріоконсервованої без внесення АЦ ($p < 0,05$).

Fig. 2. CB NCs amount after cryopreservation with different concentrations of DMSO and 10 mmol/L AC taking into account the absolute number of survived cells: □ – with no AC supplement, ■ – in AC presence; * – difference is statistically significant in respect to the corresponding group of cells cryopreserved without AC ($p < 0.05$).

AC provides the best studied indices among all the investigated combinations.

As a next stage we assessed a delayed cell death after thawing. For this purpose, we used the approach with transferring CB NCs into conditions close to physiological ones. In the experiment we used a simple model, reproducing thereby only the basic features of transfusion: dilution of frozen-thawed cell suspension, which proceeded naturally in a recipient's blood stream; medium isoosmolality and incubation temperature (37°C). The maintenance of 37°C temperature within all the period of cell incubation is an important factor enabling to reveal metabolic disorders, since the cell survival under lower temperatures masks a possible imbalance in cell metabolism due to the slowdown of functional activity of virtually all the processes

було виявлено (табл. 5), що ці показники були мінімальні у зразках, кріоконсервованих із ДМСО у концентрації 5 та, особливо, 2,5%. У даних експериментальних групах втрати абсолютної кількості клітин були значуще вищими, ніж відразу після розморожування. Найкращі результати були отримані з 7,5 та 10% ДМСО. При даних концентраціях зниження показників збереженості та життєздатності було менш вираженим у порівнянні з іншими експериментальними групами.

Мінімальну кількість клітин із надлишковим вмістом АФК спостерігали після кріоконсервування з 2,5% ДМСО, а максимальну – з 10%. Це можна пояснити тим, що при використанні низької концентрації ДМСО відбувалася втрата значної кількості клітин (що відповідає даним щодо збереженості та життєздатності).

Аналіз кількості життєздатних ЯВК з урахуванням абсолютної кількості збережених клітин показав (див. рис. 3), що кріоконсервування з 10 мМ АЦ

Таблиця 5. Збереженість, життєздатність і кількість клітин із надлишковим вмістом АФК у ЯВК КК (%) після заморожування залежно від концентрації ДМСО та 10 мМ АЦ ($M \pm SE$)

Table 5. Survival, viability and number of cells with excess ROS in CB NCs (%) depending on DMSO concentration and 10 mmol/L AC after freezing and transferring into conditions close to physiological ones ($M \pm SE$)

Концентрація ДМСО, % DMSO concentration, %	Групи Groups	Збереженість Survival	Життєздатність Viability	Кількість клітин із надлишковим вмістом АФК Number of cells with excess ROS
2,5	ДМСО DMSO	11,4 ± 3,1	8,4 ± 3,3	7,5 ± 2,4
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	14,1 ± 2,5	12,1 ± 1,5	2,7 ± 0,8*
5	ДМСО DMSO	34,3 ± 1,2	46,4 ± 0,8	14,1 ± 3,3
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	49,5 ± 1,3*	51,7 ± 1,4*	14,3 ± 4,2
7,5	ДМСО DMSO	51,6 ± 1,5	59,3 ± 2,2	18,9 ± 1,2
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	69,1 ± 1,1*	58,3 ± 0,7	11,7 ± 2,1*
10	ДМСО DMSO	55,1 ± 1,2	55,6 ± 1,5	23,4 ± 6,1
	ДМСО + АЦ DMSO + AC	71,6 ± 0,9*	57,6 ± 1,2	18,4 ± 3,7

Примітка: * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи клітин, кріоконсервованих без внесення АЦ; $p < 0,05$.

Note: * – difference is statistically significant in respect to the corresponding group of cells cryopreserved without AC; $p < 0.05$.

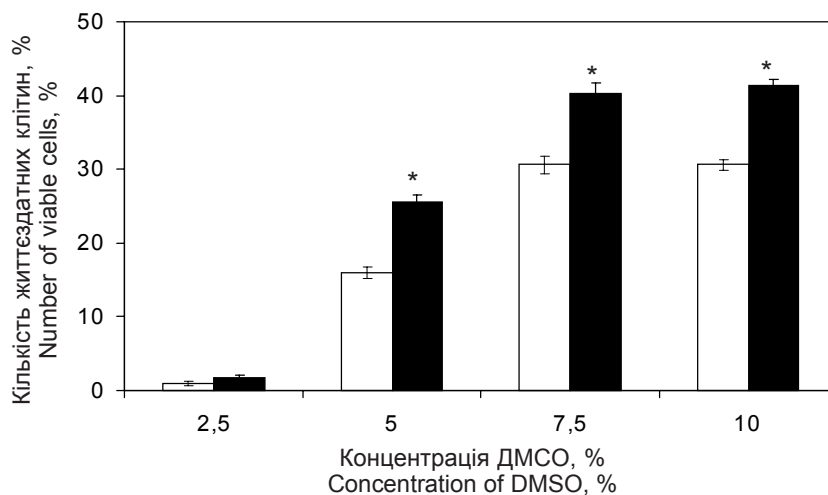


Рис. 3. Кількість життєздатних ЯВК КК після кріоконсервування та перенесення до умов, наближених до фізіологічних, з різною концентрацією ДМСО і АЦ у концентрації 10 мМ з урахуванням абсолютної кількості збережених клітин: □ – без внесення АЦ, ■ – у присутності АЦ; * – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи клітин, кріоконсервованих без внесення АЦ ($p < 0,05$).

Fig. 3. Number of viable CB NCs after cryopreservation and transfer into conditions close to physiological ones with differently concentrated DMSO and 10 mmol/L AC taking into account the absolute values of survived cells: □ – with no AC supplement, ■ – in AC presence; * – difference is statistically significant in respect to the corresponding group of cells cryopreserved without AC ($p < 0.05$).

during temperature reduction. It should be noted that a relative short duration of this experiment (1 hr) is capable to provide completely satisfactory conditions to assess the cryopreserved CB NCs stability under conditions close to physiological ones.

Analysis of the results of cell survival and viability after transferring into physiological conditions for an hour (Table 5) revealed that the indices were minimal in the samples cryopreserved with DMSO in 5 and especially 2.5% concentrations. In these samples the losses of absolute cell number were significantly higher than right after thawing. The best results were obtained with 7.5 and 10% DMSO. With these concentrations a decrease in survival and viability indices was less pronounced as compared to other experimental groups.



та наступне перенесення до фізіологічних умов після розморожування забезпечувало збереження більшої кількості клітин в усіх експериментальних пробах. У даній концентрації АЦ здатний значно підвищувати (у 1,5 рази) показник життєздатності під час використання низької та наднизької концентрації кріопротектора (5 і 2,5%), тобто за менш сприятливих умов кріоконсервування. Однак додавання АЦ до суспензії клітин із більш високими концентраціями ДМСО (7,5 і 10%) також підвищувало рівень життєздатних клітин при перерахунку на кількість збережених клітин. При цьому кількість клітин із надлишковим вмістом АФК у даних групах також була нижчою порівняно з пробами, які кріоконсервували без внесення АЦ (табл. 5).

Таким чином, отримані дані можуть вказувати на те, що АЦ попереджає порушення функціонування антиоксидантних процесів у клітинах, що сприяє зниженню рівня АФК та запобігає розвитку окисного стресу. Кріоконсервування ЯВК КК із 10 мМ АЦ та 7,5 і 10% ДМСО сприяє значному збільшенню кількості збережених та життєздатних клітин після розморожування.

Висновки

1. Аналіз накопичення АФК у ЯВК КК показав, що зі збільшенням концентрації ДМСО та часу еквілібрації з ним підвищується кількість клітин із надлишковим вмістом АФК.

2. Процес кріоконсервування ЯВК КК у присутності ДМСО призводить до збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК, що, в свою чергу, впливає на зниження показників збереженості та життєздатності.

3. Додавання до суспензії клітин N-ацетил-L-цистеїну дозволило знизити вміст АФК і, як наслідок, покращити показники збереженості та життєздатності ЯВК КК на всіх етапах кріоконсервування.

Література

1. Бабийчук Л.А., Макашова Е.Е., Зубова О.Л., Зубов П.М. Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина для повышения сохранности и жизнеспособности ядродержащих клеток кордовой крови, кріоконсервированных с ДМСО // Акт. вопросы трансфузиологии и клинической медицины, Киров. – 2015. – С. 32–35.
2. Макашова Е.Е., Зубова О.Л., Зубов П.М. Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при кріоконсервировании ядродержащих клеток кордовой крови // Проблемы кріобиологии и кріомедицины. – 2016. – Т. 26, №2. – С. 183.
3. Пат. № 92227, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабийчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл. №19.

The minimum number of cells with excess ROS was observed after cryopreservation with 2.5% DMSO, but the maximum one with 10%. This fact may be explained by the loss of a significant number of cells, occurred with low concentrated DMSO use (that coincided with survival and viability data).

The analysis of viable NCs number, with respect to the absolute number of survived cells, demonstrated (see Fig. 3) the cryopreservation with 10 mmol/L AC and subsequent transfer into physiological conditions after thawing to ensure the survival of a higher cell number in all the experimental samples. In this concentration the AC may significantly augment (in 1.5 times) the viability index when using low and ultralow cryoprotectant concentration (5 and 2.5%), *i. e.* under less favorable cryopreservation conditions. However, the AC supplement to cell suspension with higher concentrations of DMSO (7.5 and 10%) also augmented the level of viable cells in terms of absolute number of survived cells. A cell number with excess ROS in these groups was herewith also lower as compared to the AC-free cryopreserved samples (Table 5).

Thus, our findings may suggest AC to prevent a disordered functioning of antioxidant processes in cells, reducing thereby the ROS level and preventing oxidative stress development. The CB NCs cryopreservation with 10 mmol/L AC, 7.5 and 10% DMSO promotes a significant increase in cryopreservation efficiency.

Conclusions

1. Analysis of ROS accumulation in CB NCs demonstrated the augmentation of cell number with excess ROS to occur with increasing DMSO concentrations and incubation time span.

2. The CB NCs cryopreservation in DMSO presence resulted in an increased cell number with excess ROS, which in turn led to a decrease in survival and viability indices.

3. The N-acetyl-L-cysteine supplement to cell suspension enabled reducing ROS content and, consequently, improving the survival and viability indices of CB NCs at all the stages of cryopreservation.

References

1. Armitage S. Cord blood banking standards: autologous versus altruistic. *Front Med (Lausanne)* 2015; 2: 94.
2. Babijchuk L.A., Makashova O.Ye., Zubov P.M., Zubova O.L. Estimation of antioxidant properties of N-acetyl-L-cysteine during cord blood cryopreservation with DMSO. In: *Advances in cell biology and biotechnology: Proceedings of the International Conference of Ukrainian Society of Cell Biology*; 2015 Oct 11–13; Lviv.
3. Babijchuk L.A., Makashova O.Ye., Zubova O.L. et al. Using of N-acetyl-L-cysteine antioxidant for increasing in cord blood

4. Armitage S. Cord Blood Banking Standards: Autologous Versus Altruistic // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2015. – Vol. 2. – P. 94.
5. Babijchuk L.A., Makashova O.Ye., Zubov P.M., Zubova O.L. Estimation of antioxidant properties of N-acetyl-L-cysteine during cord blood cryopreservation with DMSO // *Cell Biology*. – 2015. – P. 78.
6. Ballen K., Gluckman E., Broxmeyer H.E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond // *Blood*. – 2013. – Vol. 122, №4. – P. 491–498.
7. *Basic Cell Culture. A Practical Approach* / Ed. by J.M. Davis. – Oxford: Oxford University Press, 2002. – 382 p.
8. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation: An emerging paradigm change // *Organogenesis*. – 2009. – Vol. 5, №3. – P. 90–96.
9. Chen G., Yue A., Ruan Z. et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood // *Stem Cells Int*. – 2016. – Vol. 2016, №2016. – P. 1396783–1396790.
10. Chen X., Zhong H. Z, Xu Z. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy // *Free Radic. Research*. – 2010. – Vol. 44, №6. – P. 587–604.
11. Fiorentini C., Falzano L., Rivabene R. et al. N-acetylcysteine protects epithelial cells against the oxidative imbalance due to *Clostridium difficile* toxins // *FEBS Letters*. – 1999. – Vol. 453, №1–2. – P. 124–128.
12. Fry L.J., Querol S., Gomez S.G. et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation // *Vox Sang*. – 2015. – Vol. 109, №2. – P. 181–190.
13. Gluckman E. History of cord blood transplantation // *Bone marrow transplantation*. – 2009. – Vol. 44, №10. – P. 621–626.
14. Hayakawa J., Joyal E.G., Gildner J.F. et al. 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO // *Transfusion*. – 2010. – Vol. 50, №10. – P. 2158–2166.
15. lafolla M.A., Tay J., Allan D.S. Transplantation of umbilical cord blood-derived cells for novel indications in regenerative therapy or immune modulation: a scoping review of clinical studies // *Biol. Blood Marrow Transplant*. – 2014. – Vol. 20, №1. – P. 20–25.
16. Khomenko V.I., Bychkov V.V., Bazyka D.A. State of development of hematopoietic stem cell transplantation in the Europe and world // *Lik. Sprava*. – 2014. – Vol. 7–8. – P. 117–121.
17. Kim K.M., Huh J.Y., Hong S.S., Kang M.S. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage // *Transfusion*. – 2015. – Vol. 55, №8. – P. 2017–2022.
18. Millea P.J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications // *Am. Fam. Physician*. – 2009. – Vol. 80, №3. – P. 265–269.
19. Mitrus I., Smagur A., Giebel S. et al. 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 // *Cryobiology*. – 2013. – Vol. 67, №3. – P. 327–331.
20. Passweg J.R., Baldomero H., Bader P. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually // *Bone Marrow Transplant*. – 2016. – Vol. 51, №6. – P. 786–792.
21. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS): homeostasis and redox regulation in cellular signaling // *Cell Signal*. – 2012. – Vol. 24, №5. – P. 981–990.
22. Rocha V., Labopin M., Sanz G. et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351, №722. – P. 2276–2285.
23. Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 141, №2. – P. 150–159.
- nucleated cells recovery and viability cryopreserved with DMSO. Proceedings of Conference on Actual Questions of Transfusiology and Clinical Medicine; 2015 Oct 6-7; Kirov. p. 32–35.
4. Babijchuk L.O., Grischenko V.I., Gurina T.M. et al., inventors. Cryopreservation method of cord blood nucleated cells including hematopoietic stem cells. Patent of Ukraine № 92227, IPC A01N1/02. 2010 Oct 11.
5. Ballen K., Gluckman E., Broxmeyer H.E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 2013; 122(4): 491–498.
6. Baust J.G., Gao D., Baust J.M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis* 2009; 5 (3): 90–96.
7. Chen G., Yue A., Ruan Z. et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Int* 2016; (2016): 1396783–1396790.
8. Chen X., Zhong H. Z, Xu Z. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res* 2010; 44(6): 587–604.
9. Davis J.M., editor. *Basic cell culture. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford; 2002.
10. Fiorentini C., Falzano L., Rivabene R. et al. N-acetylcysteine protects epithelial cells against the oxidative imbalance due to *Clostridium difficile* toxins. *FEBS Letters* 1999; 453(1–2): 124–128.
11. Fry L.J., Querol S., Gomez S.G. et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang* 2015; 109(2): 181–190.
12. Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2009; 44(10): 621–626.
13. Hayakawa J., Joyal E.G., Gildner J.F. et al. 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO. *Transfusion* 2010; 50(10): 2158–2166.
14. Lafolla M.A., Tay J., Allan D.S. Transplantation of umbilical cord blood-derived cells for novel indications in regenerative therapy or immune modulation: a scoping review of clinical studies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20(1): 20–25.
15. Khomenko V.I., Bychkov V.V., Bazyka D.A. State of development of hematopoietic stem cell transplantation in Europe and world. *Lik Sprava* 2014; 7–8: 117–121.
16. Kim K.M., Huh J.Y., Hong S.S., Kang M.S. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion* 2015; 55(8): 2017–2022.
17. Makashova E.Ye., Zubova O.L., Zubov P.M. Use of N-acetyl-L-cysteine antioxidant in cryopreservation of cord blood nucleated cells. *Probl Cryobiol Cryomed* 2016; 26(2): 183.
18. Millea P.J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2009; 80(3): 265–269.
19. Mitrus I., Smagur A., Giebel S. et al. 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. *Cryobiology* 2013; 67(3): 327–331.
20. Passweg J.R., Baldomero H., Bader P. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(6): 786–792.
21. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS): homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24(5): 981–990.
22. Rocha V., Labopin M., Sanz G. et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351 (722): 2276–2285.
23. Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intra-



24. Schmid I.W., Krall J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry // *Cytometry*. – 1992. – Vol. 13. – P. 204–208.
25. Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol. 386, №3. – P. 532–543.
26. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, №6. – P. 1005–1028.
27. Wang L.L., Jin L., Xu H. M., Hao Y.W. Correlation between reactive oxygen species of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells and expression of homing adhesion molecules on peripheral blood hematopoietic stem/progenitor cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. – 2012. – Vol. 20, №6. – P. 1452–1456.
28. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 43, №7. – P. 995–1022.
- cellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014; 141(2): 150–159.
24. Schmid I.W., Krall J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 204–208.
25. Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386(3): 532–543.
26. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(6): 1005–1028.
27. Wang L.L., Jin L., Xu H.M., Hao Y.W. Correlation between reactive oxygen species of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells and expression of homing adhesion molecules on peripheral blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2012; 20(6): 1452–1456.
28. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(7): 995–1022.