

Роль антиоксидантів у підвищенні збереженості та життєздатності кріоконсервованих гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Role of Antioxidants to Increase Survival and Viability of Cryopreserved Cord Blood Hematopoietic Progenitor Cells

O.Ye. Makashova, O.L. Zubova, P.M. Zubov

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

Гемопоетичні прогеніторні клітини (ГПК) використовуються у практичній медицині як ефективний метод лікування захворювань різного генезу [К. Ballen, 2013]. У зв'язку з цим залишається актуальним питання розробки протоколів низькотемпературного зберігання даних клітин. Додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів (АО) [Н. Cheng, 2014] може сприяти підвищенню рівня збереженості та життєздатності ГПК кордової крові (КК) після кріоконсервування.

Мета дослідження – визначення ролі антиоксидантів у підвищенні збереженості та життєздатності кріоконсервованих ГПК КК.

Виділену поліглюкіном фракцію ядровмісних клітин змішували 25%-м розчином ДМСО до кінцевих концентрацій 5; 7,5 та 10%. До середовищ вносили антиоксиданти: аскорбінову кислоту (АК) в концентраціях 0,05; 0,1; 0,15 та 0,2 мМ; N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) – 5; 10; 15 та 30 мМ та глутатіон в концентраціях 0,5; 1; 3 та 5 мМ. Кріоконсервування проводили на програмному заморозувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до -80°C , із наступним зануренням у рідкий азот.

Під час аналізу збереженості та життєздатності ГПК КК, кріоконсервованих під захистом різних концентрацій ДМСО без додавання АО, було продемонстровано зниження даних параметрів в усіх зразках. При цьому найменші втрати клітин спостерігалися у варіантах із 7,5 та 10% ДМСО, де кількість $\text{CD45}^{+}\text{CD34}^{+}\text{7AAD}^{-}$ -клітин становила до 65%, а після перенесення даних клітин до умов, наближених до фізіологічних – 40%.

Порівняльний аналіз АО дозволив встановити, що АК у концентраціях 0,1 та 0,15 мМ та АЦ (10 та 15 мМ) у комбінації з 7,5 та 10% ДМСО забезпечував збереженість до 80% ГПК у життєздатному стані після кріоконсервування, проте після перенесення до умов, наближених до фізіологічних, цей показник сягав близько 45–50% (з використанням АК) та 50–55% (з використанням АЦ) порівняно з показниками зразків без АО. Додавання до кріозахисного середовища з 7,5 та 10% ДМСО глутатіону у концентрації 1 та 3 мМ дозволило зберегти в життєздатному стані до 90% ГПК КК після кріоконсервування та до 70% після перенесення в умови, наближені до фізіологічних, що на 30% більше порівняно зі зразками без АО. Слід відзначити, що результати кріоконсервування ГПК у розчинах із 5% ДМСО та вказані вище ефективні концентрації АО були на рівні даних, отриманих із концентраціями ДМСО 7,5 та 10% без застосування АО.

Таким чином, додавання до кріозахисного середовища АО, особливо глутатіону, здатне підвищити стійкість ГПК КК до дії факторів кріоконсервування, що свідчить про ефективність застосування даної речовини під час розробки протоколів низькотемпературного зберігання ГПК КК.

Hematopoietic progenitor cells (HPCs) have been used in practical medicine as an efficient therapy for diseases of various genesis [K. Ballen, 2013]. The antioxidants (AO) supplement to cryoprotective medium [H. Cheng, 2014] may improve the survival and viability of cord blood (CB) HPCs after cryopreservation.

The research aim was to determine the role of antioxidants in improving the survival and viability of cryopreserved CB HPCs.

The fraction of nucleated cells isolated using the Polyglucinum was mixed with 25% DMSO up to the final concentrations of 5; 7.5 and 10% in the sample. The media were supplemented with following antioxidants: ascorbic acid (AA) in 0.05; 0.1; 0.15 and 0.2 mM concentrations; N-acetyl-L-cysteine (AC) in 5; 10, 15 and 30 mM and glutathione in concentrations of 0.5; 1, 3 and 5 mM. Cryopreservation was carried out using the programmable freezer (Cryoson, Germany) with 1–3 deg/min rate down to -80°C , followed by immersion into liquid nitrogen.

Analysis of survival and viability of CB HPCs, cryopreserved with different concentrations of DMSO and without AO, demonstrated the reduction of these parameters in all the samples. The lowest cell loss was herewith observed in case of 7.5 and 10% DMSO, whereat the amount of $\text{CD45}^{+}\text{CD34}^{+}\text{7AAD}^{-}$ -cells was up to 65% and 40% did after transferring the cells to the conditions close to physiological ones.

A comparative analysis of AO revealed that AA in 0.1 and 0.15 mM concentrations and AC (10 and 15 mM) combined with 7.5% and 10% DMSO provided the survival of upto 80% of HPCs after cryopreservation, however after transferring to the conditions close to physiological ones this index was about 45–50% and 50–55% (with AA and AC use, respectively) as compared to the indices of AO free samples. The glutathione, supplemented in 1 and 3 mM concentration to cryoprotective medium with 7.5 and 10% DMSO enabled to preserve up to 90% of HPCs in a viable state after cryopreservation, and up to 70% of cells after transferring to the conditions close to physiological ones, that was 30% higher than the AO free samples. It should be noted that the results of HPCs cryopreservation in the solutions with 5% DMSO and the mentioned above efficient concentrations of AO were at the level of the data, obtained with 7.5 and 10% DMSO concentrations with no AO.

Thus, the AO supplement to cryoprotective medium, especially glutathione, can improve the CB HPCs resistance to cryopreservation factors, thereby testifying to an efficient application of this substance in developing the protocols for CB HPCs low temperature storage.

