

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

Стан ядровмісних клітин кордової крові людини після кріоконсервування з ДМСО і антиоксидантами та перенесення до умов, які моделюють фізіологічні

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

State of Human Cord Blood Nucleated Cells After Cryopreservation with DMSO and Antioxidants and Transfer to Conditions Simulating Physiological

Ключові слова: кордова кров людини, ядровмісні клітини, кріоконсервування, диметилсульфоксид, антиоксиданти, аскорбінова кислота, N-ацетил-L-цистеїн, глутатіон.

Ключевые слова: кордовая кровь человека, ядродержащие клетки, криоконсервирование, диметилсульфоксид, антиоксиданты, аскорбиновая кислота, N-ацетил-L-цистеин, глутатион.

Key words: human cord blood, nucleated cells, cryopreservation, dimethylsulfoxide, antioxidant, ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine, glutathione.

Гемопоетичні прогеніторні клітини (ГПК) ефективно застосовуються в медичній практиці розвинених країн світу для лікування різних захворювань [5]. На сьогодні одним із основних джерел для отримання ГПК є кордова кров (КК) людини. Це зумовило необхідність створення запасів КК, що можливе тільки за умов її довгострокового зберігання у замороженому стані. Найбільш широко для кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК КК) використовується проникаючий кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) у концентраціях 7,5 та 10%. Проте, окрім кріопротекторного впливу, ДМСО має й токсичну дію [4], яка може проявлятися у збільшенні кількості активних форм кисню у клітинах (АФК), що викликає порушення енергетичного стану, пошкодження структурних елементів клітин, а також пошкодження ДНК, призводячи до апоптозу або некрозу клітин. Тому оцінка збереженості, життєздатності та кількості клітин із надлишковим вмістом АФК після інкубації кріоконсервованих клітин в умовах, які моделюють фізіологічні, надасть можливість більш об'єктивно визначити стан ЯВК/ГПК кордової крові після перенесення в кровеносне русло реципієнта, а додавання до середовища заморожування антиоксидантів дозволить знизити інтенсивність утворення АФК та розвиток негативних процесів у клітинах [6].

Hematopoietic progenitor cells (HPCs) are used in practical medicine of the developed countries to treat various diseases [7]. Today, one of the most much-in-demand sources of the HPCs is human cord blood (CB). This led to the need to create the stocks of CB, that could be possible only under conditions of its long-term storage in a frozen state. The penetrating cryoprotective agent dimethylsulfoxide (DMSO) at 7.5 and 10% concentrations is the most widely used for cryopreservation of cord blood nucleated cells (CBNCs). However, in addition to cryoprotective effects, the DMSO is also of a toxic effect [6], which can be manifested in an increased number of reactive oxygen species (ROS) in cells, that causes a violated of energetical state, damage of structural elements of cells, as well as DNA damage, resulting in either apoptosis or cell necrosis. In this regard, the assessment of survival rate, viability and number of the cells with excessive ROS after incubation of cryopreserved cells under the conditions, simulating physiological ones, will enable more unbiased determination of the state of the CBNCs/HPCs after transferring to the recipient's bloodstream, and adding antioxidants to the freezing medium will reduce the intensity of ROS formation and development of negative processes in cells [9].

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

Department of Cryocytology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of 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: Olena.makashova@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: Olena.makashova@gmail.com

Надійшла 26.01.2018
Прийнята до друку 19.02.2018

Received January, 26, 2018
Accepted February, 19, 2018

© 2018 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.

У роботі використовували КК людини, збір якої проводили за інформованою згодою вагітних та попереднім проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану («Біохімік», Росія) з м. в. 60 000). Час седиментації складав від 30 до 50 хв, після чого 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 зразку 5; 7,5 та 10%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за низької позитивної температури (0...4°C).

Антиоксиданти вносили перед кріоконсервуванням у наступних концентраціях: аскорбінова кислота – 0,1 та 0,15 мМ; N-ацетил-L-цистеїн – 10 та 15 мМ; глутатіон – 1 і 3 мМ («Sigma-Aldrich», США).

Зразки кріоконсервували в програмному заморозувачі «Cryoson» (Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°C із наступним зануренням у рідкий азот (–196°C). 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 [2]. Збереженість клітин визначали як відсоток клітин у досліджуваному зразку по відношенню до їх кількості після будь-якого впливу (інкубація з кріопротектором, заморожування-відігрів).

Життєздатність CD45⁺-клітин оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) з використанням моноклонального антитіла CD45FITC і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) («BD», США) [8] методом проточної цитофлуориметрії. Зразки аналізували за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Pro» («BD»).

Для визначення клітин із надлишковим вмістом АФК використовували індикатор АФК – дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCFH₂-DA) («Sigma-Aldrich») [3]. Вимірювання проводили на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD») при довжині хвилі збудження 488 нм та емісії 530 нм. До зразків 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»).

Оцінку стадій апоптозу ядровмісних клітин проводили з одночасним внесенням до зразка маркерів Annexin V і 7-AAD («BD») [7]. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD»). Для мінімізації похибки в зразках аналізували 100 000 подій. Результати вимірювання

The research was performed using a human CB, collected with an informed consent of pregnant women and with preliminary prenatal screening to detect the contraindications to the donation. The fraction from the whole CB was separated by the method of sedimentation in polyglycine (6% dextran solution (Biokhimik JSC, Russia) m. w. 60,000). The sedimentation time was from 30 to 50 minutes, afterwards the supernatant was removed and centrifuged for 5–7 minutes at 800g to obtain a NBCs concentrate.

A 25% solution of DMSO was added to the cell suspension up to final concentrations in sample of 5; 7.5 and 10%. Cell suspensions were treated with a cryoprotectant at a low positive temperature (0...4°C).

Antioxidants were introduced prior to cryopreservation at the following concentrations: ascorbic acid – 0.1 and 0.15 mM; N-acetyl-L-cysteine – 10 and 15 mM; glutathione 1 and 3 mM (Sigma-Aldrich, USA).

The samples were cryopreserved with an automatic freezer Cryoson (Germany) at a rate of 1–3 deg/min to –80°C followed by an immersion in liquid nitrogen (–196°C). The warming was carried out at a temperature of 37...40°C in a water shaking bath up to the solid phase disappearance.

The absolute number of cells was counted in the Goryaev's chamber according to the standard method [5]. Survival of cells was determined as the percentage of cells in the test sample in relation to their number after any effect (incubation with cryoprotectant, freezing-warming).

The viability of the CD45⁺-cells was evaluated with the International Association of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) standard protocol using the CD45FITC monoclonal antibody and 7-amino-actinomycin D (7AAD) [14] DNA method by means of flow cytometry. The samples were analyzed using the software CELLQuest Pro (BD).

The indicator for ROS, the dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) (Sigma-Aldrich, USA) [4] was used to determine the cells with excessive ROS content. The measurements were carried out on a flow cytometer meter FACS Calibur (BD) at the 488 nm excitation wavelength and 530 nm emission. DCFH₂-DA was added to the samples at a final concentration of 5 μM followed by incubation for 30 minutes at 37°C in the dark. The measurement results were evaluated using the software CELLQuest Pro (BD).

The apoptosis stages of nucleated cells were assessed with the simultaneous addition to the specimen of Annexin V and 7-AAD markers [10]. Samples were analyzed with a flow cytometer FACS Calibur (BD). To minimize the error in the samples, 100,000 events were analyzed. The measurement results were evaluated using the software CELLQuest Pro (BD).

Transfusion was simulated by transferring the cells to Hanks solution and incubating them at 37°C for one



оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Pro» («BD»).

Трансфузію моделювали шляхом перенесення клітин у розчин Хенкса та інкубації при 37°C протягом години. Розведення складало 1:10. Після інкубації клітинної суспензії з розчином Хенкса протягом 5 хв проводили центрифугування при 800g із подальшим видаленням супернатанта.

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

Для оцінки відстроченої загибелі клітин після розморожування застосовували підхід із моделювання трансфузії. У експерименті використовували просту модель, відтворюючи тільки основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним шляхом у кровоносному руслі реципієнта, ізоосмотичність середовища та температуру інкубації (37°C). Змодельовані фізіологічні умови забезпечують контроль основних параметрів середовища для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК.

Аналіз результатів збереженості та життєздатності ЯВК після годинної інкубації клітин у розчині Хенкса при температурі 37°C показав, що найбільш захищеними виявилися клітини, кріоконсервовані з ДМСО у концентрації 7,5 та 10%. Хоча й у цих групах показники були на 15–20% значуще нижчими, ніж після кріоконсервування. Аналіз стадій апоптозу/некрозу продемонстрував збільшення кількості некротичних клітин (AnnexinV-/7AAD⁺) в усіх зразках у 2 рази порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування. Кількість неушкоджених клітин (AnnexinV-/7AAD⁻) в усіх експериментальних групах була нижчою на 10–30%, ніж одразу після розморожування. Найбільша кількість живих клітин спостерігалася в зразках із 7,5 та 10% ДМСО.

Результати кріоконсервування ЯВК під захистом ДМСО в концентрації 7,5 та 10% і аскорбінової кислоти (АК) в ефективних концентраціях (0,1 та 0,15 мМ [1]) та подальше перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, продемонстрували підвищення загальної кількості збережених та життєздатних клітин на 5–10% по відношенню до їх вихідної кількості після розморожування порівняно зі зразками без додавання антиоксидантів.

Годинна інкубація ЯВК, із них ГПК, кріоконсервованих із 7,5 та 10% ДМСО та антиоксидантом N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) у концентраціях (10 та 15 мМ), продемонструвала підвищення кількості збережених CD45⁺- та CD34⁺-клітин на 15–19 та 12–

hour. The dilution was 1:10. After incubation of the cell suspension with Hanks solution for 5 minutes, the centrifugation was performed at 800g with subsequent removal of the supernatant.

The results were statistically processed by the Student-Fisher method using Excel (Microsoft, USA) after establishing the distribution normality. The obtained data was presented as $M \pm m$. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

To evaluate the delayed cell death after thawing, we used an approach to simulate the transfusion. The experiment used a simple model, reproducing only the basic principles of transfusion: the dilution of the thawed cell suspension, occurring naturally in the recipient's circulatory system, the medium iso-osmoticity and incubation temperature (37°C). The simulated physiological conditions provide the control of the main parameters of the medium for assessing the stability of the cryopreserved nucleated cells.

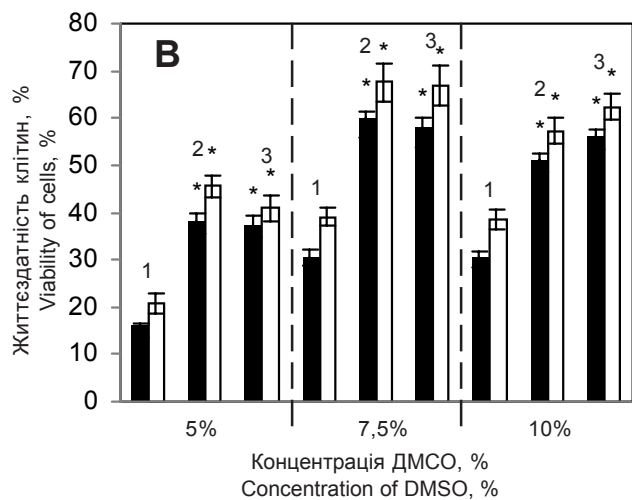
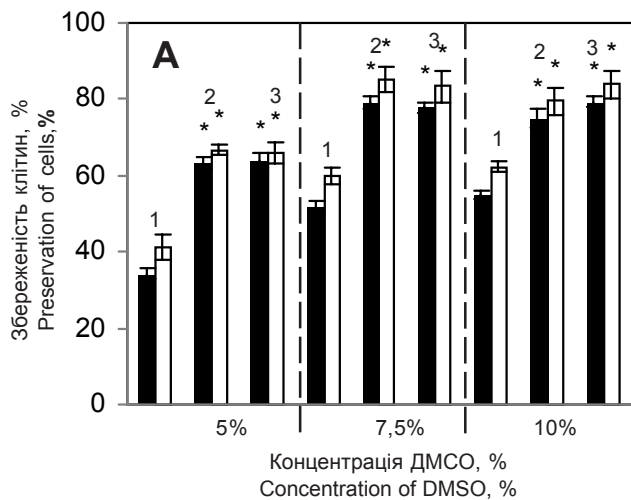
An analysis of the survival and viability of nucleated cells after one-hour incubation of cells in Hanks solution at 37°C showed that the most protected cells were cryopreserved with DMSO at a concentration of 7.5 and 10%. Although in these groups the rates were by 15–20% significantly lower than after cryopreservation. The analysis of the stages of apoptosis/necrosis in these samples showed an increase in the number of necrotic cells (AnnexinV-/7AAD⁺) in all the samples in 2 times compared with the data obtained immediately after defrosting. The number of intact cells (AnnexinV-/7AAD⁻) in all the experimental groups was lower by 10–30% than immediately after defrosting. The largest number of live cells was observed in samples with 7.5 and 10% DMSO.

The results of cryopreservation of the NCs under the protection of DMSO at a concentration of 7.5 and 10% and ascorbic acid (AC) at effective concentrations (0.1 and 0.15 mM [2]) and subsequent transfer to physiological simulation conditions demonstrated an increase in total number of preserved and viable cells by 5–10% in relation to their starting amount after thawing compared to the samples without the addition of antioxidants.

One-hour incubation of the NCs, of which HPCs, cryopreserved with 7.5 and 10% DMSO and antioxidant N-acetyl-L-cysteine at concentrations of 10 and 15 mM, demonstrated an increase in the number of preserved CD45⁺- and CD34⁺-cells by 15–19 and 12–17%, respectively, if compared the data obtained without the addition of antioxidants and viability of nucleated cells in relation to their baseline after cryopreservation by 12–14% and GPC by 13–15%.

An analysis of the effects of glutathione (1 and 3 mM) on frozen-thawed HPCs under physiological conditions demonstrated a higher rate of survival in all the exper-





Збереженість (A) та життєздатність (B) ядровмісних (■), із них гемопоетичних прогеніторних (□), клітин кордової крові, кріоконсервованих у розчинах із різною концентрацією ДМСО та глутатіону, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні: 1 – контроль; 2 – 1 мМ глутатіон; 3 – 3 мМ глутатіон; * – результати відрізняються від клітин, кріоконсервованих без додавання антиоксиданта ($p < 0,05$).

Survival (A) and viability (B) of nucleated (■), including hematopoietic progenitor (□), cells of cord blood, cryopreserved in solutions with different concentrations of DMSO and glutathione, after transfer to the conditions close to physiological: 1 – control; 2 – 1 mM glutathione; 3 – 3 mM glutathione; * – the results differ from the corresponding group of cryopreserved cells without adding antioxidant ($p < 0.05$).

17% відповідно, у порівнянні з даними, отриманими без додавання антиоксиданту та життєздатності ЯВК по відношенню до їх вихідного рівня після кріоконсервування на 12–14% та ГПК на 13–15%.

Аналіз впливу глутатіону (1 та 3 мМ) на деконсервовані ЯВК КК в умовах, які моделюють фізіологічні, продемонстрував підвищення рівня збереженості в усіх експериментальних групах, особливо з 7,5 та 10% ДМСО, коли спостерігалось збільшення кількості збережених ЯВК на 20–28 та ГПК – на 17–26% порівняно зі зразками, до яких не додавали антиоксидант, та значуще збільшення рівня життєздатних ЯВК по відношенню до їх вихідного рівня після кріоконсервування на 25–30 та ГПК – на 22–28% (рисунок).

Таке збільшення збереженості та життєздатності ЯВК у групах із АЦ та глутатіоном може бути пов'язане з вираженими антиоксидантними властивостями даних речовин, які в ефективних концентраціях, сприяли зниженню рівня АФК у зразках та запобігали розвитку окисдативного стресу.

Під час аналізу стадій апоптозу в зразках, кріоконсервованих із внесенням до кріозахисного середовища антиоксидантів в ефективних концентраціях, та перенесених до умов, які моделюють фізіологічні, було показано, що кількість некротичних клітин зменшувалася при додаванні АК на 2–9%, при застосуванні АЦ на 4–13% та при застосуванні глутатіону на 18–32%. При цьому під час підрахунку кількості живих неушкоджених AnnexinV⁻/7AAD⁻-клітин виявилося, що додавання АК до кріозахисного середовища не призводило до зміни рівня цих клітин. Додавання

риментальних груп, і особливо з 7,5 та 10% ДМСО, де спостерігалось збільшення кількості збережених ЯВК на 20–28% та ГПК на 13–15% порівняно зі зразками, до яких не додавали антиоксидант. Значуще збільшення рівня життєздатних ЯВК по відношенню до їх вихідного рівня після кріоконсервування на 25–30 та ГПК – на 22–28% (рисунок).

Таке збільшення збереженості та життєздатності ЯВК у групах із АЦ та глутатіоном може бути пов'язане з вираженими антиоксидантними властивостями даних речовин, які в ефективних концентраціях, сприяли зниженню рівня АФК у зразках та запобігали розвитку окисдативного стресу.

Під час аналізу стадій апоптозу в зразках, кріоконсервованих із внесенням до кріозахисного середовища антиоксидантів в ефективних концентраціях, та перенесених до умов, які моделюють фізіологічні, було показано, що кількість некротичних клітин зменшувалася при додаванні АК на 2–9%, при застосуванні АЦ на 4–13% та при застосуванні глутатіону на 18–32%. При цьому під час підрахунку кількості живих неушкоджених AnnexinV⁻/7AAD⁻-клітин виявилося, що додавання АК до кріозахисного середовища не призводило до зміни рівня цих клітин. Додавання

Таким чином, додавання антиоксидантів у ефективних концентраціях до кріозахисних розчинів, кон-



АЦ сприяло збільшенню їх кількості на 1–6%, а застосування глутатіону на 17–22%.

Таким чином, додавання антиоксидантів в ефективних концентраціях до криозахисних розчинів, які містять 7,5 або 10% ДМСО, забезпечує підвищення збереженості та життєздатності ЯВК після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. Найбільш ефективним із використаних нами антиоксидантів виявився глутатіон, який сприяв значущому зменшенню кількості АФК після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, що підвищувало рівень збереженості та життєздатності ЯВК. Тому додавання антиоксидантів до криозахисного середовища є перспективним напрямком розробки протоколів низькотемпературного консервування ЯВК КК.

Література

1. Babijchuk L.A., Makashova E.E., Zubova O.L., Zubov P.M. Evaluation of the antioxidant properties of ascorbic acid at cryopreservation of cord blood nucleated cells with DMSO. Proceeding of Conference 'Transplantation – present, past and future'; 2014 Nov 7; Kyiv, Ukraine, 2014. Cell and Organ Transplantation; 2(2): 166.
2. Chen X., Zhong H. Z., Xu Z. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. Free Radical Research 2010; 44(6): 587–604.
3. Davis J.M., editor. Basic cell culture. A practical approach. Oxford University Press, Oxford; 2002.
4. 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.
5. Kekre N., Antin J.H. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. Blood 2014; 124(3): 334–343.
6. 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; 141(2): 150–159.
7. 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.
8. Zembruski N.C. Schmid I., Stache V. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. Anal Biochem 2012; 429(1): 79–81.

taining either 7.5 or 10% of DMSO ensured the improved preservation rate and viability of the NCs after transfer to physiological simulation conditions. Glutathione was found to be the most effective antioxidant used by us, which contributed to a strong decrease in the number of ROS after being transferred to physiological conditions, which increased the survival and viability of nucleated cells. Therefore, adding the antioxidants to cryoprotective medium is a promising direction to develop the protocols for low temperature preservation of CBNCs.

References

1. Babijchuk L.A., Makashova E.E., Zubova O.L., Zubov P.M. Evaluation of the antioxidant properties of ascorbic acid at cryopreservation of cord blood nucleated cells with DMSO. Proceeding of Conference 'Transplantation – present, past and future'; 2014 Nov 7; Kyiv, Ukraine, 2014. Cell and Organ Transplantation; 2(2): 166.
2. Chen X., Zhong H. Z., Xu Z. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. Free Radical Research 2010; 44(6): 587–604.
3. Davis J.M., editor. Basic cell culture. A practical approach. Oxford University Press, Oxford; 2002.
4. 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.
5. Kekre N., Antin J.H. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. Blood 2014; 124(3): 334–343.
6. 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; 141(2): 150–159.
7. 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.
8. Zembruski N.C. Schmid I., Stache V. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. Anal Biochem 2012; 429(1): 79–81.