

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

## Антиоксидант глутатіон підвищує стійкість ядровмісних клітин кордової крові під час криоконсервування з диметилсульфоксидом

UDC 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

O.Ye. Makashova\*, O.O. Mykhailova, O.L. Zubova, P.M. Zubov, L.O. Babijchuk

## Antioxidant Glutathione Increases Resistance of Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation with Dimethyl Sulfoxide

**Реферат:** Проведено комплексну оцінку ефективності криоконсервування ядровмісних (ЯВК), зокрема гемопоетичних прогениторних (ГПК), клітин кордової крові (КК), у захисних сумішах, які містять проникальний криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) та антиоксидант глутатіон у різних концентраціях, одразу після розморожування та наступного перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro*. Застосування 1 та 3 мМ глутатіону у криозахисному середовищі з 7,5 та 10% ДМСО дозволяє зберегти 85,9% життєздатних ЯВК і 91,2% ГПК відразу після розморожування та 75–80% життєздатних ЯВК/ГПК після годинної інкубації в розчині Хенкса, що перевищує контрольні значення без додавання антиоксиданта. При цьому збереженість та життєздатність ЯВК та ГПК після криоконсервування у розчинах із 5% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіону були на рівні (або навіть перевищували їх) отриманих із 7,5 і 10% ДМСО без застосування антиоксиданта. Встановлено, що криоконсервування ЯВК у розчинах, які містять глутатіон, знижує кількість DCF<sup>+</sup>-клітин. Комбінація 7,5% ДМСО та 1 або 3 мМ глутатіону зменшує кількість клітин із надлишковим вмістом активних форм кисню із 19% (у зразках без додавання глутатіону) до 11% (у зразках із глутатіоном), навіть після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro*.

**Ключові слова:** кордова кров людини, ядровмісні клітини, криоконсервування, диметилсульфоксид, активні форми кисню, глутатіон.

**Реферат:** Проведена комплексная оценка эффективности криоконсервирования ядродержащих (ЯСК), в том числе гемопоэтических прогениторных (ГПК), клеток кордовой крови (КК) в защитных средах, содержащих проникающий криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) и антиоксидант глутатион в различных концентрациях, сразу после размораживания и последующего переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*. Применение 1 и 3 мМ глутатиона в криозащитной среде с 7,5 и 10% ДМСО позволяет сохранить 85,9% жизнеспособных ЯСК и 91,2% ГПК сразу после размораживания и 75–80% жизнеспособных ЯСК/ГПК после часовой инкубации в растворе Хенкса, что превышает контрольные значения без добавления антиоксиданта. При этом сохранность и жизнеспособность ЯСК и ГПК после криоконсервирования в растворах с 5% ДМСО и 1 и 3 мМ глутатиона были на уровне (или даже превышали их) полученных с 7,5 и 10% ДМСО без применения антиоксиданта. Установлено, что криоконсервирование ЯСК в растворах, содержащих глутатион, снижает количество DCF<sup>+</sup>-клеток. Комбинация 7,5% ДМСО и 1 или 3 мМоль глутатиона уменьшает количество клеток с избыточным содержанием активных форм кислорода с 19% (в образцах без добавления глутатиона) до 11% (в образцах с глутатионом), даже после переноса в условия, моделирующие физиологические *in vitro*.

**Ключевые слова:** кордовая кровь человека, ядродержащие клетки, криоконсервирование, диметилсульфоксид, активные формы кислорода, глутатион.

**Abstract:** The cryopreservation efficiency of nucleated cells (NCs), in particular hematopoietic progenitor (HPCs) and cord blood (CB) cells was comprehensively assessed in protective mixtures, containing intracellular cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) and antioxidant glutathione in different concentrations assessed immediately after thawing and further transfer to the *in vitro* conditions, simulating physiological ones. The use of 1 and 3 mM glutathione in cryoprotectant medium with 7.5 and 10% DMSO enabled preserving 85.9 and 91.2% of viable NCs and HPCs, respectively, immediately after thawing and 75–80% of viable NCs/HPCs after 1-hour incubation in the antioxidant-free Hank's solution, which exceeded the control values. At the same time, the recovery and viability of NCs and HPCs after cryopreservation in 5% DMSO with 1mM or 3 mM glutathione were the same or even higher than those in 7.5 and 10% DMSO without glutathione. The NCs cryopreservation in the glutathione-containing solutions was established to reduce the number of DCF<sup>+</sup> cells. The supplementation of 7.5% DMSO with 1 or 3 mM glutathione reduced the cell number with excess reactive oxygen species from 19% (in glutathione-free samples) to 11% (in glutathione-contained ones), even after transfer to the *in vitro* conditions, simulating physiological.

**Key words:** human cord blood, nucleated cells, cryopreservation, dimethyl sulfoxide, reactive oxygen species, glutathione.

Відділ кріоцитології, 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: 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 10.12.2018  
Прийнята до друку 11.02.2020

Received 10, December, 2018  
Accepted 11, February, 2020

© 2020 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.

На даний час трансплантація гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) кордової крові (КК) визнана частиною стандартного протоколу лікування понад 80 серйозних захворювань, зокрема хвороб крові, імунної системи тощо [9]. Широке використання препаратів КК можливе лише за наявності її запасів, що вимагає розробки нових і вдосконалення існуючих технологій кріоконсервування для підвищення ефективності лікування пацієнтів.

Для попередження загибелі ядромісних клітин (ЯВК) КК у процесі кріоконсервування використовують ендоцелюлярний кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) у концентрації 7,5–10% [1]. Проте в таких концентраціях ДМСО чинить токсичний вплив на людину, тому важливим є пошук варіантів зниження його ефективних концентрацій [2]. Перспективним у цьому напрямку вважається використання комбінованих кріопротекторних сумішей на основі ДМСО і полісахаридів та/або антиоксидантів [8].

Існує припущення [11], що в процесі кріоконсервування клітини одержують сигнали, які «спрямовують» їх на апоптоз, але не ініціюють його розвиток у даний момент. У цьому аспекті більш важливим є визначення довгострокового виживання клітин, а не оцінка їх структурно-функціонального стану відразу після розморожування. Ініціаторами та медіаторами холод-індукованого апоптозу можуть бути активні форми кисню (АФК), утворення яких активізується під час кріоконсервування [7]. Відомо, що кріоконсервування здатне викликати дефіцит відновленого глутатіону (GSH) у мітохондріях, який пов'язаний із порушенням функціонування конкретного мітохондріального носія, що транслює відновлений глутатіон із цитоплазми до мітохондріального матриксу [13]. Глутатіон у мітохондріях є єдиним доступним агентом, який забезпечує захист клітин від метаболізму перекису водню, та основним тиол-редокс-буфером для підтримки внутрішньоклітинного редокс-гомеостазу [5]. Виходячи з цього, можна припустити, що обробка клітин антиоксидантом глутатіоном здатна нормалізувати стійкі рівні відновленого глутатіону в клітинах, що сприяє протистоянню окисному стресу і запобігає зниженню показників збереженості та життєздатності ЯВК у процесі кріоконсервування.

Мета роботи – проведення комплексної оцінки ефективності кріоконсервування ядромісних, зокрема гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові у комбінованих захисних сумішах на основі проникаючого кріопротектора ДМСО та антиоксиданта глутатіону в різ-

Currently, the transplantation of cord blood (CB) hematopoietic progenitor cells (HPCs) is recognized within the standard protocol for therapy of more than 80 major diseases, including those of blood, immune system *etc.* [9]. A widespread use of CB preparations suggests its stocks, that requires developing the novel and improving the existing cryopreservation techniques to increase the therapeutic effect in patients.

The endocellular cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) of 7.5–10% concentration is used to prevent the CB nucleated cells (NCs) death during cryopreservation [1]. However, at these concentrations, DMSO has a toxic effect on humans, so it is important to search for the ways to reduce its efficient concentrations [2]. The use of the combined DMSO- and polysaccharides and / or antioxidants-based cryoprotective mixtures is considered to be promising in this aspect [8].

One believes [11] that during cryopreservation, the cells receive the signals, which 'direct' them towards apoptosis but do not initiate its development at this time. In this regard, it is more important to determine a long-term survival of cells, rather than assess their structural and functional state immediately after thawing. The initiators and mediators of cold-induced apoptosis may be the reactive oxygen species (ROS), the formation of which is activated during cryopreservation [7]. Cryopreservation is known to be capable to induce the deficiency in the availability of reduced glutathione (GSH) in mitochondria, associated with a disordered functioning of the specific mitochondrial carrier, which translocates reduced glutathione from cytoplasm into mitochondrial matrix [13]. Glutathione in mitochondria is the only available agent, protecting cells against the metabolism of hydrogen peroxide, and the main thiol-redox buffer that supports the intracellular redox homeostasis [5]. Based on this we hypothesize that, the cell treatment with antioxidant glutathione may be assumed to be capable of normalizing the stable levels of reduced glutathione in cells, contributing thereby to resist against an oxidative stress, and prevents the decrease in NCs preservation and viability during cryopreservation.

The research aim was a comprehensive assessment of the cryopreservation efficiency for nucleated, in particular hematopoietic progenitor cord blood cells, in combined cryoprotective mixtures, based on penetrating cryoprotectant DMSO and antioxidant glutathione in different concentrations immediately after thawing and after subsequent transfer to the *in vitro* conditions that simulate physiological.



них концентраціях одразу після розморожування та наступного перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro*.

### Матеріали та методи

У роботі використовували кордову кров людини, збір якої проводили після отримання інформованої згоди у вагітної, з попереднім проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Експузію крові здійснювали закритим шляхом у систему для забору крові з пупкової вени після народження дитини й відділення її від плаценти. Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрину, приготовлений на 0,9% NaCl («Біофарма», Україна) з м. м. 60 000) [1]. Для цього до крові додавали поліглюкін у співвідношенні 1:1 за об'ємом, відстоювали до чіткого розподілу еритроцитарного шару 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 зразку 5; 7,5 та 10% при температурі 0–4°C. Перед змішуванням суспензію клітин і розчини кріопротектора доводили до відповідних температур; ДМСО додавали крапельно при постійному перемішуванні. У роботі використовували антиоксидант глутатіон («Sigma-Aldrich», США) у кінцевій концентрації в пробах 1 та 3 мМ. Глутатіон вносили в проби на етапі обробки кріопротектором. Зразки кріоконсервували в програмному заморозувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°C із наступним зануренням у рідкий азот (–196°C) [1]. Відігрів здійснювали за температури 37–40°C на водяній бані при постійному погодюванні до зникнення твердої фази. Для оцінки кількості та життєздатності ЯВК (CD45<sup>+</sup>) і ГПК (CD34<sup>+</sup>)-клітин використовували стандартний ISHAGE протокол [12]. Для цього до 50 мкл цільної крові додавали 10 мкл антитіл, що містять FITC-мічений CD45 та PE-мічений CD34 маркери («BD», США), а також 10 мкл 7-AAD (7-аміноактиноміцин D) [15]. Ретельно перемішували й інкубували 15 хв при кімнатній температурі в темряві. Додавали 1 мл лізуючого розчину (хлорид амонію) до кожної пробірки. Через 10 хв зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD», США). Для мінімізації похибки збір даних проводили до моменту накопичення не менше 200 CD34<sup>+</sup>-клітин.

Абсолютну кількість ЯВК підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою

### Materials and methods

Human cord blood samples were collected after obtaining the informed consent from pregnant women, with a preliminary prenatal screening for contra-indications for donation. The blood was collected into the closed system for umbilical cord blood collection after childbirth and separation of a baby from placenta. The NCs fraction was isolated from the whole CB by sedimentation in Polyglucinum (6% dextran solution of 60,000 mw prepared with 0.9% NaCl (Biopharma, Ukraine)) [1]. For this purpose, the blood was mixed with Polyglucinum in 1:1 ratio (v/v), precipitated up to a clear distribution of erythrocyte layer and nucleated cell fraction (from 30 to 50 min). The supernatant was collected and centrifuged (at 800g for 5–7 min at room temperature) for obtaining the NC concentrate. The cell suspension was treated with 25% DMSO up to final concentrations of 5; 7.5 and 10% at 0–4°C. Before mixing, the cell suspension and cryoprotectant solutions were brought to the appropriate temperatures; DMSO was supplemented dropwise with a constant stirring. Glutathione (Sigma-Aldrich, USA) was used in the final concentrations of 1 mM or 3 mM. Glutathione was added to the samples at the stage of treatment with cryoprotectant. Samples were cryopreserved with programmed freezer (Cryoson, Germany) at a rate of 1–3 deg/min down to –80°C with further immersion into liquid nitrogen (–196°C) [1]. Thawing was carried out at 37–40°C in a water bath with a constant shaking until a solid phase disappeared. The standard ISHAGE protocol was used to evaluate the amount and viability of NCs (CD45<sup>+</sup>) and HPCs (CD34<sup>+</sup>) cells [12]. For this purpose, 50 µL of the whole blood was added to 10 µL of antibodies, containing FITC-labeled CD45 and PE-labeled CD34 markers (BD, USA), as well as 10 µL of 7-AAD (7-aminoactinomycin D) [15], then thoroughly mixed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Each sample was treated with 1 mL of lysing solution (ammonium chloride). After 10 min, these samples were analyzed with FACS Calibur flow cytometer (BD, USA). To minimize the error, the data were acquired until at least 200 CD34<sup>+</sup> cells were collected.

The number of NCs was calculated in Goryaev's chamber according to the standard technique [3]. The preservation was determined as the ratio of cell number in the experimental sample to their initial number (incubation with cryoprotectant or after thawing). The amount of HPCs in the samples was determined as the product of the absolute amount of NCs per HPCs percent (using flow cytometry).



[3]. Збереженість визначали як відношення кількості клітин у досліджуваному зразку до їх початкової кількості (інкубація з кріопротектором або після заморожування-відігріву). Кількість ГПК у зразках визначали як добуток абсолютної кількості ЯВК на відсоток ГПК (методом проточної цитофлуориметрії).

Для визначення відсотка клітин із надлишковим вмістом АФК (DCF<sup>+</sup>-клітини) використовували високоспецифічний барвник дихлорофлуоресцеїн діацетат (DCFH2-DA) («Sigma-Aldrich») [14]. Вимірювання проводили методом проточної цитофлуориметрії при довжині хвилі збудження 488 нм та з реєстрацією емісії 530 нм. До зразків додавали DCFH2-DA у кінцевій концентрації 5 мкМ із наступною інкубацією протягом 30 хв при 37°C у темряві. З надлишковим вмістом АФК у кожній експериментальній групі вважалися клітини з флуоресценцією, яка перевищувала таку у ЯВК відразу після виділення з цільної КК.

Для визначення відстроченої загибелі клітин використовували метод моделювання фізіологічних умов *in vitro*. Для цього 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.

Оцінку стадій апоптозу ЯВК проводили з одноразовим внесенням до зразків маркерів Annexin V FITC, CD45 PE і 7-AAD [16]. Для цього до 50 мкл цільної крові додавали 5 мкл Annexin V і по 10 мкл CD45 PE та 7-AAD, перемішували й інкубували протягом 15 хв за кімнатної температури в темряві. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стюдента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft», США) після встановлення нормальності розподілу і представляли як  $M \pm SE$  (середнє значення  $\pm$  стандартна похибка). Кількість експериментів у кожній серії була не менше п'яти. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Визначення ефективності технології кріоконсервування можливе лише за умови комплексного дослідження впливу фізико-хімічних факторів кріоконсервування на ЯВК КК, зокрема й стовбурові гемопоетичні клітини, на кожному етапі кріоконсервування. Успішність вирішення цього завдання залежить від різнобічного вивчення процесів, які призводять до загибелі

To determine the cell percentage with excess ROS content (DCF<sup>+</sup> cells) we used the highly specific dye dichlorofluorescein diacetate (DCFH2-DA) (Sigma-Aldrich) [14]. Measurements were done using flow cytometry at 488 nm excitation wavelength and emission registration of 530 nm. The samples were supplemented with DCFH2-DA at a final concentration of 5  $\mu$ M followed by incubation for 30 min at 37°C in the dark. Cells with excess ROS content in each experimental group were considered to have fluorescence, exceeded that in NCs right after isolation from the whole CB.

To determine the delayed cell death, we used the *in vitro* simulation of physiological conditions. For this purpose, a part of cells after warming was transferred into Hank's solution in 1:10 ratio and incubated at 37°C for one hour. Afterwards, the integrity, viability and ROS content in cells were determined with flow cytometry.

The NCs apoptosis stages were assessed by a simultaneous staining of the cells with Annexin V FITC, CD45 PE and 7-AAD markers [16]. With this aim, the whole blood was supplemented with 5  $\mu$ l Annexin V and 10  $\mu$ l CD45 PE and 7-AAD, then mixed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. The samples were analyzed with flow cytometer.

The data were statistically processed with the Student-Fisher method using Excel software (Microsoft, USA) after establishing the normality of distribution, and presented as  $M \pm SE$  (mean  $\pm$  standard error). The number of experiments in each series was at least five. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The cryopreservation efficiency can be determined only when performing a comprehensive study of the impact of physical and chemical factors of cryopreservation on CB NCs, including stem hematopoietic cells, at each stage of cryopreservation. The success depends on a comprehensive study of the processes, resulting in cell death at different stages of cryopreservation. This will enable revealing the critical points in disorders of structural components and performing a targeted selection of conditions for biological object stabilization.

Our findings, obtained after cryopreservation with DMSO revealed the decreased NCs preservation and viability in all the experimental groups, as compared with those prior to cryopreservation (Table 1).

The use of glutathione at 1 and 3 mM concentration in the samples with 7.5 and 10% DMSO allowed preserving 90.8 and 93.6% of NCs and HPCs,

клітин на різних етапах кріоконсервування. Це дозволить виявити критичні точки порушень структурних компонентів і вести цілеспрямований підбір умов для стабілізації біологічних об'єктів.

Отримані нами результати після кріоконсервування із ДМСО виявили зниження показників збереженості та життєздатності ЯВК в усіх експериментальних групах порівняно з даними до кріоконсервування (табл. 1).

Застосування глутатіону у концентрації 1 та 3 мМ у зразках із 7,5 та 10% ДМСО дозволило

respectively, after warming, that pointed to a significant contribution of glutathione to cell protection against damaging factors of cryopreservation. It should be noted that the NCs and HPCs survival level in the groups cryopreserved with 5% DMSO and glutathione was significantly higher than in those with 7.5 or 10% DMSO without antioxidant.

The analysis of CB NCs viability (Table 1) revealed no significant differences compared to the control. The CD34<sup>+</sup> cell cryopreservation in the solutions with 1 or 3 mm glutathione and DMSO at

**Таблиця 1.** Збереженість та життєздатність CD45<sup>+</sup> та CD34<sup>+</sup>-клітин кордової крові (%) після кріоконсервування в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації (*M ± SE*)

**Table 1.** Preservation and viability of CD45<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cord blood cells (%) after cryopreservation in DMSO and glutathione solutions of different concentrations (*M ± SE*)

Концентрація ДМСО, % DMSO concentration, %	Концентрація GSH, мМ GSH concentration, mM	Ядромісні клітини Nucleated cells (CD45 <sup>+</sup> )		Гемопоетичні прогеніторні клітини (CD34 <sup>+</sup> ) Hematopoietic progenitor cells (CD34 <sup>+</sup> )	
		Збереженість Preservation rate	Життєздатність Viability rate	Збереженість Preservation rate	Життєздатність Viability rate
5	0	63,2 ± 2,7	75,2 ± 3,9	70,1 ± 2,4	80,1 ± 3,2
	1	79,1 ± 0,9**	76,5 ± 2,1	84,4 ± 2,9*	84,8 ± 2,1
	3	81,5 ± 2,1**	77,3 ± 1,8	85,8 ± 2,6*	83,7 ± 1,4
7,5	0	72,1 ± 3,2	78,5 ± 4,2	78,3 ± 3,1	82,6 ± 2,4
	1	88,9 ± 2,4*	84,6 ± 1,6	91,4 ± 4,3*	90,8 ± 3,8*
	3	90,1 ± 2,6*	85,9 ± 1,2	93,6 ± 3,7*	91,2 ± 4,0*
10	0	73,4 ± 2,1	76,9 ± 3,1	79,1 ± 2,9	81,4 ± 2,1
	1	87,4 ± 3,5*	80,3 ± 2,2	90,5 ± 3,5*	85,8 ± 2,8
	3	90,8 ± 1,7*	81,4 ± 2,4	93,4 ± 4,2*	86,7 ± 3,2

**Примітка:** різниця статистично значуща по відношенню до контрольних значень без додавання антиоксиданта (\*) та до групи із 7,5% ДМСО без додавання антиоксиданта (#), *p* < 0,05.

**Note:** Difference was significant with respect to the antioxidant-free control values (\*) and to the antioxidant-free group with 7.5% DMSO (#), *p* < 0.05.

зберігти 90,8% ЯВК та 93,6% ГПК після заморожування-відігріву, що свідчить про значний внесок глутатіону у захист клітин від пошкоджуючих факторів кріоконсервування. Слід звернути увагу на те, що рівень збереженості ЯВК та ГПК у групах, кріоконсервованих із 5% ДМСО та глутатіоном, був значуще вище, ніж у зразках із 7,5 або 10% ДМСО без додавання антиоксиданта.

Аналіз показника життєздатності ЯВК КК (табл. 1) не виявив значущих відмінностей від контрольних значень. Під час кріоконсервуван-

7.5% final concentration showed a retained viable cell content up to (90.8 ± 3.8) and (91.2 ± 4.0)%, respectively.

It is known that one of the manifestations of DMSO toxic effect during cell suspension equilibration and after warming may be a shift of prooxidant-antioxidant balance toward an increase in ROS rate [6]. As a result, the lipid peroxidation may affect an energy state and damage the cell membranes and DNA [4]. Thus of importance was to determine the ROS content in cells at all the stages of cryopreservation.



ні CD34<sup>+</sup>-клітин у розчинах із 1 і 3 мМ глутатіоном та ДМСО в кінцевій концентрації 7,5% спостерігалось підвищення показника життєздатних клітин до (90,8 ± 3,8) та (91,2 ± 4,0)% відповідно.

Відомо, що одним із проявів токсичної дії ДМСО у процесі еквілібрації клітинної суспензії та після заморожування-відігріву може бути зміщення прооксидант-антиоксидантного балансу в бік збільшення рівня АФК [6]. У результаті через перекисне окислення ліпідів може порушуватися енергетичний стан та пошкоджуватися мембрани клітин і ДНК [4]. У зв'язку з цим важливим завданням є визначення вмісту АФК у клітинах на всіх етапах кріоконсервування.

Визначення відсотка клітин із надлишковим вмістом АФК (DCF<sup>+</sup>-клітини) продемонструвало зворотну залежність між відсотком збережених і DCF<sup>+</sup>-клітин, тобто при збільшенні рівня АФК у клітинах у процесі кріоконсервування зменшується кількість збережених ЯВК КК (рис. 1).

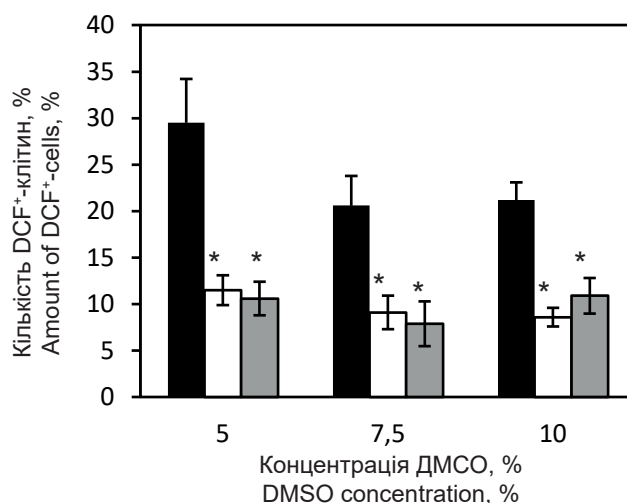
Додавання до кріозахисного середовища глутатіону та подальше кріоконсервування значуще знижували відсоток клітин із надлишковим вмістом АФК (рис. 1) в усіх експериментальних групах порівняно зі зразками, до яких не додавали антиоксидант. Найменший відсоток DCF<sup>+</sup>-клітин спостерігався у зразках, що містили 7,5% ДМСО та глутатіон у кінцевих концентраціях 1 і 3 мМ. Даний кріозахисний розчин попереджав утворення надлишкової кількості АФК в ЯВК КК та сприяв зниженню відсотка DCF<sup>+</sup>-клітин майже на 13% порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксиданта з (20,6 ± 3,2) до (7,9 ± 2,0).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що внесення до кріопротекторних розчинів глутатіону сприяє значущому зниженню рівня АФК у клітинах після розморожування та запобігає розвитку їх окисного стресу. Додавання антиоксиданта до зразків із 5% ДМСО зменшує відсоток ЯВК із надлишковим вмістом АФК та підвищує відсоток збережених ЯВК до 81,5% та до 85,8% ГПК після кріоконсервування, що перевищує аналогічний показник у групах із 7,5 та 10% ДМСО без використання антиоксиданта.

На наступному етапі було досліджено вплив кріопротекторних сумішей на відстрочену в часі загибель деконсервованих ядровмісних, зокрема гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові. Для цього ми застосували підхід із моделювання фізіологічних умов *in vitro* [10]. У експерименті використовували просту модель, відтворюючи тільки основні принципи трансфузії:

The determination of cell percentage with excess ROS content (DCF<sup>+</sup> cells) demonstrated an inverse relationship between the percentage of preserved and DCF<sup>+</sup> cells, *i. e.* the number of preserved CB NCs decreased with the increase in the ROS level (Fig. 1).

The glutathione supplement into cryoprotective medium and further cryopreservation significantly reduced the percentage of cells with excess ROS content (Fig. 1) in all the experimental groups versus antioxidant-free ones. The lowest percentage of DCF<sup>+</sup> cells was observed in the samples containing 7.5% DMSO and glutathione at 1 or 3 mM final concentrations. These cryoprotective solutions



**Рис. 1.** Кількість ядровмісних клітин кордової крові з надлишковим вмістом АФК після кріоконсервування в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації; ■ – без глутатіону, □ – 1 мМ глутатіон, ▒ – 3 мМ глутатіон. \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи контрольних значень без додавання антиоксиданта,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Number of cord blood nucleated cells with excess ROS content after cryopreservation in DMSO and glutathione solutions of different concentrations; ■ – glutathione-free, □ – 1 mM glutathione, ▒ – 3 mM glutathione. \* – difference is significant with respect to the corresponding group of antioxidant-free control values,  $p < 0.05$ .

prevented the excess ROS formation in CB NCs and contributed to a decrease in DCF<sup>+</sup> cells percentage by almost 13% as compared with the antioxidant-free control values from (20.6 ± 3.2) down to (7.9 ± 2.0)%.

Thus, our findings confirmed the glutathione adding into cryoprotective solutions to provide a significant reduction in ROS level in cells after warming and prevent their oxidative stress development. The antioxidant supplement to the samples with 5% DMSO reduced the percentage

**Таблиця 2.** Збереженість і життєздатність CD45<sup>+</sup> та CD34<sup>+</sup>-клітин кордової крові (%), кріоконсервованих у розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro* ( $M \pm SE$ )

**Table 2.** Preservation and viability of CD45<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> cord blood cells (%), cryopreserved in DMSO and glutathione solutions of different concentrations, after transferring under *in vitro* simulated physiological conditions ( $M \pm SE$ )

Концентрація ДМСО, % DMSO concentration, %	Концентрація GSH, мМ GSH concentration, mM	Ядромісні клітини Nucleated cells (CD45 <sup>+</sup> )		Гемопоетичні прогеніторні клітини (CD34 <sup>+</sup> ) Hematopoietic progenitor cells (CD34 <sup>+</sup> )	
		Збереженість Preservation rate	Життєздатність Viability rate	Збереженість Preservation rate	Життєздатність Viability rate
5	0	34,3 ± 1,2	46,4 ± 0,8	41,2 ± 3,1	50,2 ± 2,4
	1	63,4 ± 1,6*#	60,0 ± 1,8*	66,7 ± 1,4*	68,3 ± 4,1*
	3	63,8 ± 1,9*#	58,4 ± 2,1*	65,9 ± 2,8*	62,1 ± 2,2*
7,5	0	51,6 ± 1,5	59,3 ± 2,2	59,8 ± 2,2	65,4 ± 1,9
	1	79,0 ± 1,8*	75,9 ± 1,1*	85,2 ± 3,3*	79,3 ± 1,8*
	3	77,9 ± 1,4*	74,6 ± 1,3*	83,4 ± 4,2*	80,1 ± 3,3*
10	0	55,1 ± 1,2	55,6 ± 1,5	62,3 ± 1,5	61,8 ± 2,7
	1	75,0 ± 2,3*	68,6 ± 1,7*	79,4 ± 3,6*	72,1 ± 2,3*
	3	79,2 ± 1,4*	70,9 ± 1,2*	83,8 ± 3,8*	74,5 ± 1,6*

**Примітка:** різниця статистично значуща по відношенню до контрольних значень без додавання антиоксиданта (\*) та до групи із 7,5% ДМСО без додавання антиоксиданта (#),  $p < 0,05$ .

**Note:** Difference was significant with respect to the antioxidant-free control values (\*) and to the antioxidant-free group with 7.5% DMSO (#),  $p < 0.05$ .

розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином у кровоносному руслі реципієнта, ізоосмотичність середовища та температуру 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 внаслідок уповільнення практично всіх процесів зі зниженням температури. Для моделювання фізіологічних умов *in vitro* було прийнято 10-кратне розведення суспензії кріоконсервованих ЯВК. Ізоосмотичність забезпечували розчином Хенкса з включенням до його складу буферної системи, яка забезпечує рН 7,4.

Таким чином, дана модель фізіологічних умов *in vitro* дозволяє контролювати основні параметри середовища для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК.

Аналіз результатів продемонстрував (табл. 2) підвищення рівня збереженості клітин в усіх експериментальних групах порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксиданта.

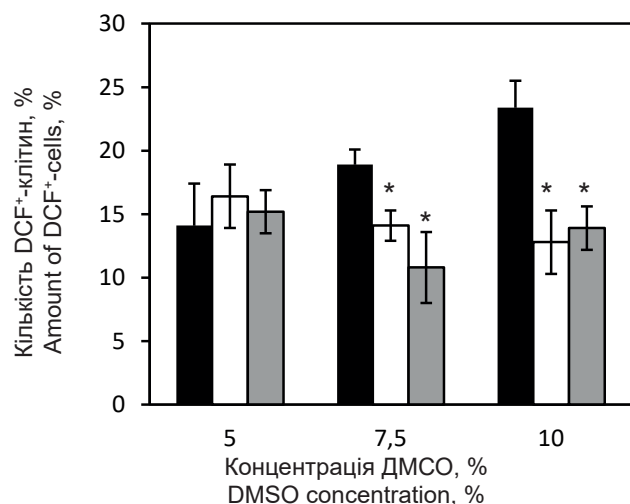
of NCs with excess ROS content and increased the percentage of preserved NCs and HPCs (up to 81.5 and 85.8%, respectively) after cryopreservation, that exceeded the similar value in the antioxidant-free groups with 7.5 and 10% DMSO.

At the next stage, there was studied an impact of cryoprotective mixtures on a delayed death of frozen-thawed nucleated, in particular hematopoietic progenitor cord blood cells. For this purpose, we applied the approach on *in vitro* simulation of physiological conditions [10]. Here, we used a simple model, by simulating only the basic principles of transfusion, *i. e.* the dilution of warmed cell suspension with isoosmolar medium, occurring naturally in recipient's bloodstream, with following incubation at 37°C. Maintaining the temperature of 37°C throughout the entire period of cell incubation is an important factor, enabling to reveal the metabolic abnormalities, since the cell preservation under lower temperatures may hide a possible imbalance in cell metabolism due to the slowing down of almost all the processes with temperature decrease. To simulate the physiological conditions *in vitro*, a 10-fold dilution of cryopreserved NCs suspension



Після годинної інкубації ЯВК/ГПК у розчині Хенкса найбільший рівень збереженості клітин був у зразках, які містили глутатіон у комбінації з 7,5 та 10% ДМСО, і становив 75–79% ЯВК та 83–85% ГПК, що на 25% більше контрольних значень.

Додавання глутатіону до зразків із 5% ДМСО сприяло збільшенню відсотка збережених ЯВК до 63,8% та ГПК до 66,7%, у той самий час як у зразках, кріоконсервованих із 7,5 та 10% ДМСО без додавання антиоксидантів, було отримано 51–55% збережених ЯВК та 59–62% ГПК. Цей факт свідчить про те, що додавання глутатіону до кріозахисного середовища дозволяє знизити концентрацію ДМСО до 5% без значної втрати клітин, навіть після перенесення до фізіологічних умов *in vitro*.



**Рис. 2.** Кількість ядровмісних клітин кордової крові із надлишковим вмістом АФК після кріоконсервування в розчинах ДМСО та глутатіону різної концентрації і перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro*; ■ – без глутатіону, □ – 1 мМ глутатіон, ▒ – 3 мМ глутатіон. \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідної групи контрольних значень без додавання антиоксиданта,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Number of cord blood nucleated cells with excess ROS content after cryopreservation in DMSO and glutathione solutions of different concentrations and transferring under *in vitro* simulated physiological conditions; ■ – glutathione-free, □ – 1 mM glutathione, ▒ – 3 mM glutathione. \* – difference is significant with respect to the corresponding antioxidant-free control values,  $p < 0.05$ .

Аналіз кількості життєздатних ЯВК КК, отриманих після годинної інкубації в розчині Хенкса, в зразках із глутатіоном показав збільшення цього показника в усіх пробах (табл. 2). У зразках із 7,5 та 10% ДМСО та глутатіоном було отримано до 65–75% життєздатних клітин, що на 14–16% більше порівняно з відповідними кон-

was accepted. The iso-osmolality was ensured with the Hank's solution, supplemented with buffer system that provided pH 7.4.

Thus, this *in vitro* model of physiological conditions provides the control for the main parameters of the medium to assess the stability of cryopreserved NCs.

The analysis of the findings showed (Table 2) an increased cell preservation in all the experimental groups as compared to the antioxidant-free control values.

After 1-hour incubation of NCs/HPCs in Hank's solution, the highest cell preservation was observed in the samples, containing glutathione in combination with 7.5 or 10% DMSO, and was 75–79 and 83–85% of NCs and HPCs, respectively, that was by 25% higher than in the control values.

The glutathione supplement to the samples with 5% DMSO provided an increase in the percentage of preserved NCs and HPCs up to 63.8 and 66.7%, respectively, while in those, antioxidant-free, cryopreserved with 7.5 or 10% DMSO we obtained 51–55% and 59–62% of preserved NCs and HPCs, respectively. This fact testifies to the glutathione supplement to cryoprotective medium as enabling to reduce the DMSO concentration to 5% without significant cell loss, even after transferring under *in vitro* physiological conditions.

The analysis of the number of viable CB NCs, obtained after 1-hour incubation in Hanks' solution in the glutathione-contained samples showed an increased viability in all the samples (Table 2). In those with 7.5 or 10% DMSO and glutathione, there were obtained up to 65–75% of viable cells, that was 14–16% higher versus the corresponding control values in the antioxidant-free samples. Here-with, the viability of CD34<sup>+</sup> cells in the solutions with 5% DMSO and 1 and 3 mM glutathione was consistent with (or even exceeded) the data obtained with 7.5 or 10% DMSO with no antioxidant use.

The NCs cryopreservation in glutathione-containing solutions reduced the percentage of DCF<sup>+</sup> cells in all the experimental groups (Fig. 2). The combination of 7.5% DMSO and efficient concentrations of glutathione (1 or 3 mM) decreased the percentage of cells with excess ROS from 19% (in the control) to 11% even after transferring to the *in vitro* simulated physiological conditions. This fact shows the pronounced antioxidant and cytoprotective properties of this antioxidant.

## Conclusions

1. The use of cryoprotectant mixture, containing 7.5 or 10% DMSO and glutathione at 1 or 3 mM concentration for CB NCS, in particular HPCs,



трольними значеннями без додавання антиоксиданта. При цьому життєздатність CD34<sup>+</sup>-клітин у розчинах із 5% ДМСО та 1 і 3 мМ глутатіону відповідала даним (або навіть перевищувала їх), отриманим із 7,5 і 10% ДМСО без застосування антиоксиданта.

Кріоконсервування ЯВК у розчинах, що містять глутатіон, зменшує відсоток DCF<sup>+</sup>-клітин в усіх експериментальних групах (рис. 2). Комбінація 7,5% ДМСО та ефективних концентрацій глутатіону (1 та 3 мМ) знижує відсоток клітин із надлишковим вмістом АФК з 19 % (у контролі) до 11 % навіть після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні *in vitro*. Цей факт свідчить про виражені антиоксидантні та цитопротекторні властивості даного антиоксиданта.

### Висновки

1. Показано, що використання кріозахисної суміші, яка містить 7,5 та 10% ДМСО і глутатіон у концентрації 1 та 3 мМ, для кріоконсервування ЯВК КК, зокрема ГПК, збільшує відсоток збережених та життєздатних клітин після розморожування порівняно зі зразками, до яких даний антиоксидант не вносили.

2. Встановлено, що кріоконсервування ЯВК під захистом ДМСО (7,5 та 10%) та глутатіону в ефективних концентраціях (1 та 3 мМ) дозволяє зберігати більшу кількість та життєздатність ЯВК, зокрема ГПК, після перебування в умовах, які моделюють фізіологічні, *in vitro*, порівняно з аналогічними умовами без використання антиоксидантів.

3. Кріоконсервування ЯВК у комбінованому середовищі, яке містить глутатіон (1 і 3 мМ) та 5% ДМСО, дозволяє отримати таку ж кількість функціонально активних клітин КК після перебування в умовах, які моделюють фізіологічні *in vitro*, як і з загальнозживаними концентраціями ДМСО (7,5–10%).

### Література

1. Абдулкадыров КМ, Романенко НА, Селиванов ЕА. Наш опыт по заготовке, тестированию и хранению гемопоэтических клеток пуповинной крови. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006; 3(1): 63–5.
2. 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 [Internet]. 2016 [cited 2019 March 10]; 2016: 1396783–89. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/1396783/>
3. Davis JM, editor. Basic cell culture. A practical approach. Oxford: Oxford University Press; 2002. 382 p.
4. De Ménorval MA, Mir LM, Fernández ML, Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid mem-

cryopreservation was shown to increase the percentage of preserved and viable cells after thawing as compared to the antioxidant-free samples.

2. It was revealed that the NCs cryopreservation with DMSO (7.5 and 10%) and glutathione at efficient concentrations (1 and 3 mM) enabled preserving a higher number and viability of NCs, in particular HPCs, after staying under *in vitro* simulated physiological conditions, as compared to the similar antioxidant-free conditions.

3. The NCs cryopreservation in a combined medium, containing glutathione (1 and 3 mM) and 5% DMSO enabled obtaining the same number of functionally active CB cells after being under *in vitro* simulated physiological conditions, as well as with the commonly used concentrations of DMSO (7.5–10%).

### References

1. Abdulkadyrov KM, Romanenko NA, Selyvanov EA. [Our experience in the preparation, testing and storage of cord blood hematopoietic cells]. Cell Transplantation and Tissue Engineering. 2006; 3(1): 63–5. Russian.
2. 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 [Internet]. 2016 [cited 2019 March 10]; 2016: 1396783–89. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/1396783/>.
3. Davis JM, editor. Basic cell culture. A practical approach. Oxford: Oxford University Press; 2002. 382 p.
4. De Ménorval MA, Mir LM, Fernández ML, Reigada R. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 25 [cited 2019 March 10]; 7(7): e41733. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041733>.
5. Forman HJ. Glutathione – from antioxidant to post-translational modifier. Arch Biochem Biophys. 2016; 595: 64–7.
6. Gardner SG, Raina JB, Ralph PJ, Petrou K. Reactive oxygen species (ROS) and dimethylated sulphur compounds in coral explants under acute thermal stress. J Exp Biol. 2017; 220 (Pt 10): 1787–91.
7. Kadekar D, Rangole S, Kale V, Limaye L. Conditioned medium from placental mesenchymal stem cells reduces oxidative stress during the cryopreservation of *ex vivo* expanded umbilical cord blood cells. PLoS One [Internet]. 2016 Oct 25 [cited 2019 March 10]; 11(10): e0165466. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165466>.
8. Mantri S, Kanungo S, Mohapatra PC. Cryoprotective effect of disaccharides on cord blood stem cells with minimal use of DMSO. Indian J Hematol Blood Transfus. 2015; 31(2): 206–12.
9. Roura S, Pujal J-M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. Stem Cell Res Ther. 2015; 6(1): 123–8.
10. Scott KL, Lecal J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present and future. Transfus Med Rev. 2005 Apr; 19(2): 127–42.
11. Setyawan EMN, Kim MJ, Oh HJ, et al. Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 479(4): 927–32.



- ranes: a comparative study of experiments *in silico* and with cells. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul 25 [cited 2019 March 10]; 7(7): e41733. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041733>.
5. Forman HJ. Glutathione – from antioxidant to post-translational modifier. *Arch Biochem Biophys*. 2016; 595: 64–7.
  6. Gardner SG, Raina JB, Ralph PJ, Petrou K. Reactive oxygen species (ROS) and dimethylated sulphur compounds in coral explants under acute thermal stress. *J Exp Biol*. 2017; 220 (Pt 10): 1787–91.
  7. Kadekar D, Rangole S, Kale V, Limaye L. Conditioned medium from placental mesenchymal stem cells reduces oxidative stress during the cryopreservation of *ex vivo* expanded umbilical cord blood cells. *PLoS One* [Internet]. 2016 Oct 25 [cited 2019 March 10]; 11(10): e0165466. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165466>.
  8. Mantri S, Kanungo S, Mohapatra PC. Cryoprotective effect of disaccharides on cord blood stem cells with minimal use of DMSO. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015; 31(2): 206–12.
  9. Roura S, Pujal J-M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6(1): 123–8.
  10. Scott KL, Lecal J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present and future. *Transfus Med Rev*. 2005 Apr; 19(2): 127–42.
  11. Setyawan EMN, Kim MJ, Oh HJ, et al. Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 479(4): 927–32.
  12. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34<sup>+</sup> cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*. 1996; 5(3): 213–26.
  13. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3): 426–31.
  14. 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.
  15. Zembruski NC, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*. 2012; 429(1): 79–81.
  16. Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2011; 740: 57–63.