

УДК 611.018.53:618.48:57.086.13:577.121.7

П.М. Зубов\*, О.Л. Зубова, Л.О. Бабійчук

## Антиоксидант тролокс як фактор стабілізації ядровмісних клітин кордової крові людини під час кріоконсервування

UDC 611.018.53:618.48:57.086.13:577.121.7

P.M. Zubov\*, O.L. Zubova, L.O. Babijchuk

### Trolox Antioxidant as a Factor in Stabilization of Human Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation

**Реферат:** У роботі представлено експериментальні дані з визначення збереженості та стадій апоптозу/некрозу ядровмісних клітин кордової крові людини з метою встановлення кількості живих функціонально активних клітин після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та водорозчинного аналога вітаміну Е — антиоксиданта тролоксу. Підрахунок кількості ядровмісних клітин кордової крові людини після заморожування в середовищах із додаванням тролоксу показав максимальну їхню збереженість у пробах з 7,5% ДМСО та 50, 70 або 200 мкМ антиоксиданта. Методом протокової цитофлуориметрії з додаванням реагенту Annexin V FITC, який специфічно зв'язується з фосфоліпідами, та ДНК барвника 7-аміно-актиноміцину D (7-AAD) встановлено, що тролокс у концентраціях 50–70 мкМ забезпечує збільшення кількості живих клітин з неушкодженою мембраною (AnnexinV-/7AAD-) на 12–16% у порівнянні з контролем — використання в кріопротекторному розчині тільки ДМСО. Отримані результати вказують на ефективність застосування антиоксиданта тролоксу та перспективність розробки тролоксвмісних кріопротекторних сумішей для заморожування та довгострокового зберігання ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові.

**Ключові слова:** ядровмісні клітини кордової крові, кріоконсервування, диметилсульфоксид, тролокс, стадії апоптозу.

**Abstract:** The paper presents experimental data on the determination of preservation rate of human cord blood nucleated cells and their apoptosis/necrosis stages to determine the number of viable functionally active cells after cryopreservation in solutions with different concentrations of DMSO and the water-soluble analogue of vitamin E, the antioxidant trolox. Counting the number of human cord blood nucleated cells after freezing in media with the addition of trolox revealed their maximum preservation in the samples with 7.5% DMSO and 50, 70 or 200 μM of the antioxidant. Using the flow cytometry with the addition of the Annexin V FITC reagent, which specifically binds to phospholipids, and the DNA dye 7-amino-actinomycin D (7-AAD), it was established that trolox in concentrations of 50–70 μM provided an increase in the number of viable cells with intact membrane (AnnexinV-/7AAD-) by 12–16% compared to the control, which involved the use of only DMSO in the cryoprotective solution. The obtained results indicate the effectiveness of using the antioxidant trolox and the prospects of developing trolox-containing cryoprotective mixtures for freezing and long-term storage of nucleated cord blood cells, including hematopoietic progenitor cells.

**Key words:** cord blood nucleated cells, cryopreservation, DMSO, trolox, stages of apoptosis.

Досвід трансплантації ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові людини (КК) за останні 20 років показав їхню ефективність у лікуванні ряду патологій, у тому числі злжякісних гематологічних захворювань, хвороб кісткового мозку, гемоглобінопатії, вроджених порушень метаболізму та ін. На даний час зберігається тенденція до більш широкого використання у клінічній практиці клітин кордової крові [14]. Щорічно проводиться до 2000–3000 трансплантацій ЯВК КК пацієнтам із різними захворюваннями [8], що обумовлює необхідність створення запасів КК. На сьогодні рішення цієї проблеми мож-

The experience of transplanting the nucleated cells (NCs) from human cord blood (CB) over the past 20 years has demonstrated their effectiveness in treating various pathologies, including malignant hematological diseases, bone marrow disorders, hemoglobinopathies, congenital metabolic disorders, and more. Currently, there is a growing trend towards the broader utilization of cord blood cells in clinical practice [14]. Up to 2,000–3,000 CB NCs transplants are performed annually for patients with various diseases [8], which necessitates the establishment of cord blood reserves. Currently, the only solution to this problem is the establishment of cryobanks

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: pmzubov@gmail.com

Надійшла 02.10.2022

Прийнята до друку 17.05.2023

Received 02, October, 2022

Accepted 17, May, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023  
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

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.

ливо лише за умови створення кріобанків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані в рідкому азоті за температури  $-196^{\circ}\text{C}$  [3]. Проте невеликі об'єми кожної дози КК та неможливість повторного забору потребують застосування ефективних кріопротекторних середовищ та режимів кріоконсервування з метою збереження максимальної кількості живих функціонально активних клітин після розморожування. Для цього необхідне проведення комплексних досліджень, спрямованих на виявлення порушень структурних компонентів та метаболічних процесів у клітинах, а також подальший пошук умов для стабілізації клітин за дії факторів кріоконсервування. Так, було показано, що як на стадії еквілібрації з кріопротектором, так і безпосередньо під час заморожування-відігріву окрім руйнування плазматичної мембрани клітин з подальшим їх некрозом, викликаним формуванням внутрішньоклітинного льоду та осмотичним стресом, загибель клітин може відбуватися і шляхом апоптозу [5]. Однією з можливих причин апоптозу можуть бути активні форми кисню (АФК), утворення яких активізується під час кріоконсервування [13]. На нашу думку, додавання до кріозахисного середовища речовин з вираженими антиоксидантними та цитопротекторними властивостями дозволить уникнути або сповільнити розвиток оксидативного стресу і таким чином збільшити кількість живих неушкоджених клітин і підвищити клінічну ефективність препаратів ЯВК КК.

Мета роботи — аналіз стану ядровмісних клітин кордової крові людини з визначенням кількості живих функціонально активних (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) і пошкоджених/мертвих клітин та шляху загибелі після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією диметилсульфоксиду та водорозчинного аналога вітаміну E — антиоксиданта тролоксу.

### Матеріали і методи

У роботі використовували кордову кров людини, яку отримували з вени пуповини після нормальних пологів за інформованою згодою породіллі, відповідно до вимог комісії з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Матеріал заготовлювали на глюкозо-цитратному розчині. Фракцію ЯВК із цільної КК виділяли методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану з молекулярною масою 60 000) [1]. Для цього до цільної КК додавали поліглюкін («Юрія-Фарм», Україна) у співвідношенні 1:1, відстоювали до чіткого розподілу еритроцитарного шару та над-

where samples are stored in a frozen state in liquid nitrogen at a temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$  [3]. However, the small volumes of each CB dose and the inability to obtain repeated samples require the use of effective cryoprotective media and cryopreservation techniques to maximize the preservation of viable and functionally active cells after thawing. To achieve this, comprehensive studies are necessary to detect any disruptions in the structural components and metabolic processes within cells, as well as further search for conditions that enable cell stabilization under the action of cryopreservation factors. It has been demonstrated that during both the equilibration stage with a cryoprotectant and the freezing and thawing processes, in addition to the destruction of the cell plasma membrane and subsequent necrosis caused by intracellular ice formation and osmotic stress, cell death can also occur through apoptosis [5]. Reactive oxygen species (ROS) formation, which is activated during cryopreservation, is considered one of the potential causes of apoptosis [13]. In our view, the addition of substances with strong antioxidant and cytoprotective properties into the cryoprotective medium can help to prevent or slow down the development of oxidative stress and thus increase the number of viable, undamaged cells and enhance the clinical effectiveness of CB NCs preparations.

The research aim was to analyze the condition of human cord blood nucleated cells by determining the number of viable, functionally active cells (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) as well as damaged/dead cells, and to examine the pathway of their death following cryopreservation in solutions with varying concentrations of dimethyl sulfoxide and the water-soluble analogue of vitamin E, the antioxidant trolox.

### Material and methods

Human cord blood was used in this study, obtained from the umbilical vein following a normal delivery with the informed consent of the laboring woman, in accordance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv). The material was prepared in a glucose-citrate solution. The NCs fraction was isolated from the whole cord blood using the method of sedimentation in polyglucinum (6% dextran solution with a molecular weight of 60,000) [1]. For this purpose, polyglucinum (Yuria-Pharm, Ukraine) was added to the whole cord blood in a 1:1 ratio, and it was precipitated up to a clear distribution of erythrocyte layer and the supernatant. The sedimentation lasted for 30–50 minutes, following which the supernatant was collected and centri-



осаду. Тривалість седиментації складала 30–50 хв, після цього супернатант відбирали та центрифугували протягом 15 хв при 800g для отримання концентрату ЯВК.

У роботі застосовували антиоксидант тролокс фірми «Sigma-Aldrich» (США) у концентраціях 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. Розчин тролоксу готували на кріопротекторі диметилсульфоксид (ДМСО). До клітинної суспензії вносили відповідні концентрації антиоксиданта та 25%-й розчин ДМСО, який готували на 6%-му розчині поліглюкіну, до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5; 7,5%. Проби обробляли ДМСО на крижаній бані при температурі 0–4°C. Речовину додавали крапельно за постійного перемішування. Перед змішуванням суспензію клітин і розчин кріопротектора доводили до відповідних температур. Тривалість інкубації з кріопротектором перед перенесенням зразків до заморожувача становила 20 хв. Кріоконсервування проводили в кріопробірках (Nunc, США) зі швидкістю 1°C/хв до –80°C на програмному заморожувачі (Cryoson, Німеччина) з наступним зануренням у рідкий азот [1]. Відтавання зразків здійснювали при 37–40°C на водяній бані за постійного погойдування до зникнення твердої фази. Всі подальші вимірювання проводили відразу після розморожування без попереднього відмивання від ДМСО, що дозволяє об'єктивно визначити кількість мертвих та пошкоджених ЯВК КК у пробі.

Підрахунок абсолютної кількості ЯВК після розморожування зразків проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою [4]. Втрати клітин у процесі заморожування-відтавання (збереженість ЯВК) розраховували за відношенням:

Збереженість ЯВК = (кількість клітин після кріоконсервування : початкова кількість клітин до кріоконсервування) × 100%.

Життєздатність ЯВК визначали за стандартним ISHAGE протоколом (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) з використанням моноклональних антитіл CD45 FITC і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7-AAD) (BD Pharmingen, США) [11] методом протокової цитофлуориметрії на цитофлуориметрі «FACS Calibur» (Becton Dickenson, США). Для цього до 50 мкл цільної крові додавали по 10 мкл реагентів (FITC-мічений CD45, клон 2D1 та 7-AAD), перемішували та інкубували 15 хв при кімнатній температурі в темряві. До кожної пробірки додавали 1 мл розчину хлориду амонію (BD

fused for 15 minutes at 800 g for obtaining the NCs concentrate.

In this study, the antioxidant trolox (Sigma-Aldrich, USA) was used at concentrations of 20, 30, 50, 70, and 200 μM. The trolox solution was prepared using the cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO). The appropriate concentrations of the antioxidant and a 25% DMSO solution, prepared from a 6% solution of polyglucinum, were added to the cell suspension to achieve final concentrations in the sample of 2.5, 5, and 7.5%. The samples were treated with DMSO in an ice bath at a temperature of 0–4°C. The substance was added dropwise with constant stirring. Prior to mixing, the cell suspension and the cryoprotectant solution were brought to the appropriate temperatures. The duration of incubation with cryoprotectant before transferring the samples to the freezer lasted for 20 minutes. Cryopreservation was conducted in cryotubes (Nunc, USA) at a rate of 1 deg/min down to –80°C using a programmed freezer (Cryoson, Germany), followed by immersion into liquid nitrogen [1]. Thawing of the samples was carried out at a temperature of 37–40°C in a water bath with a constant shaking until a solid phase disappeared. All subsequent measurements were performed immediately after thawing without prior washing to remove DMSO, enabling an objective determination of the number of dead and damaged CB NCs in the sample.

The absolute number of NCs after thawing the samples was calculated using the Goryaev's chamber according to the standard technique [4]. The losses of cells during the freezing and thawing (NCs preservation) were counted based on the following ratio:

NCs preservation = (number of cells after cryopreservation : initial number of cells before cryopreservation) × 100%.

The viability of NCs was determined using the standard ISHAGE protocol (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) with monoclonal antibodies CD45 FITC and DNA dye 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (BD Pharmingen, USA) [11] by flow cytometry with the flow cytometer 'FACS Calibur' (Becton Dickenson, USA). With this aim, 10 μl of reagents (FITC-labeled CD45, clone 2D1 and 7-AAD) were added to 50 μl of whole blood, mixed and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Subsequently, 1 ml of ammonium chloride solution (BD Pharmingen) was added to each test tube to induce erythrocyte lysis. The samples were analyzed using CELLQuest



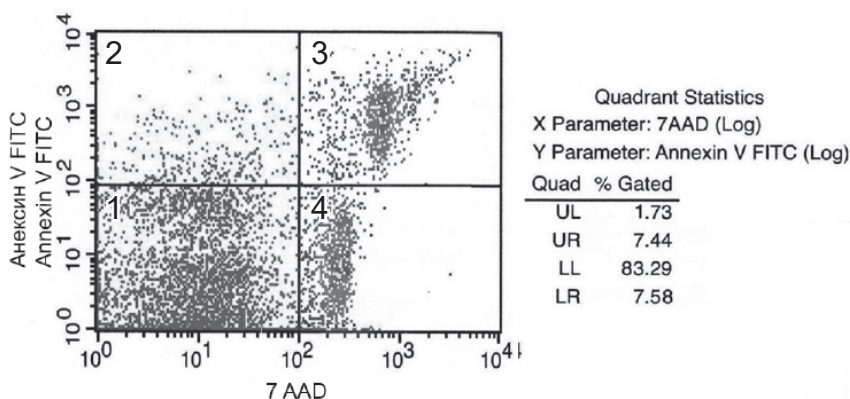


Pharmingen), який викликав лізис еритроцитів. Аналізували зразки за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Pro» (Becton Dickenson). Для мінімізації похибки аналізували 20 000 подій.

Стадії апоптозу ядровмісних клітин КК оцінювали за допомогою набору Annexin V-FITC detection KIT I (BD Pharmingen) з одночасним внесенням до зразка маркерів Annexin V FITC, CD45 PE та 7-AAD [16]. Для цього до 50 мкл суспензії клітин додавали 5 мкл Annexin V FITC і по 10 мкл CD45 PE та 7-AAD, перемішували й інкубували протягом 15 хв за кімнатної температури в темряві. Зразки аналізували на протоковому цитофлуориметрі. Результати вимірювання оцінювали за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Pro». Даний метод дозволяє ідентифікувати чотири різні типи клітин [16] (рис. 1).

Вихід життєздатних ядровмісних (CD45<sup>+</sup>) клітин з неушкодженою мембраною (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) після кріоконсервування визначали за формулами:

$$\text{Вихід AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ ЯВК}_{\text{після кріо}} = \frac{\text{абсолютна кількість AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ ЯВК}_{\text{після кріо}}}{\text{абсолютна кількість AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ ЯВК}_{\text{до кріо}}} \times 100\%$$



**Рис. 1.** Цитограма визначення стадій апоптозу/некрозу ЯВК. 1 (LL) — життєздатні клітини з нативною мембраною, які не зв'язались з Annexin V, не забарвились 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>-клітини); 2 (UL) — ранні апоптотичні клітини, які зв'язались з Annexin V, але зберігали цілісність мембрани для проникнення 7-AAD (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-клітини); 3 (UR) — мертві, пізні апоптотичні/некротичні клітини, позитивно забарвлені як Annexin V, так і 7-AAD (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>); 4 (LR) — мертві некротичні клітини та клітини з дезорганізованою мембраною, які не зв'язались з Annexin V, але захопили 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>).

**Fig. 1.** Cytogram of NCs apoptosis/necrosis stages determination. 1 (LL) – viable cells with a native membrane that did not bind to Annexin V and were not stained with 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>-cells); 2 (UL) – early apoptotic cells that bound to Annexin V, but preserved the membrane integrity for the penetration of 7-AAD (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>-cells); 3 (UR) – dead, late apoptotic/necrotic cells, positively stained with both Annexin V and 7-AAD (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>); 4 (LR) – dead necrotic cells and cells with a disorganized membrane that did not bind to Annexin V but captured 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>).

Pro software (Becton Dickenson). To minimize the error, 20,000 events were analyzed.

The apoptosis stages of CB nucleated cells were assessed using the Annexin V FITC detection KIT I (BD Pharmingen) with the simultaneous addition of Annexin V FITC, CD45 PE and 7-AAD markers to the sample [16]. Therefore 50 μl of cell suspension was supplemented with 5 μl of Annexin V FITC and 10 μl each of 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 measurement results were evaluated using ‘CELLQuest Pro’ software (Becton Dickenson). This method identifies four different types of cells [16] (Fig. 1).

The yield of viable nucleated (CD45<sup>+</sup>) cells with an intact membrane (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) after cryopreservation was determined by the formulas:

$$\text{Yield of AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ NCs}_{\text{after cryo}} = \frac{\text{absolute number of AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ NC}_{\text{after cryo}}}{\text{absolute number of AnnexinV}^{-}\text{7AAD}^{-}\text{ NC}_{\text{before cryo}}} \times 100\%$$

where absolute number of AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> NCs = absolute number of NCs retained in the sample *x* percentage of Annexin V<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> NCs in the sample : 100%.

The findings were statistically processed using the ‘Statgraphics plus 2.1’ software package (Manugistics Corp., USA). Data are presented as *M* ± *SE* (mean ± standard error). The statistical significance of the results was determined by the non-parametric Mann-Whitney method at *p* < 0.05. The number of experiments in each series of experiments was at least five.

## Results and discussion

Recently the utilization of antioxidants for cryopreservation of various biological objects has been the focus of research aimed at improving cell quality after thawing [7]. However, the use of antioxidants and apoptosis inhibitors for the cryopreservation of CB NCs has practically not been studied.

де абсолютна кількість AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> ЯВК = абсолютна кількість ЯВК, які збереглися у зразку  $x$  відсоток AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup> ЯВК у зразку : 100%.

Статистичну обробку результатів виконували з використанням програмного пакета «Statgraphics plus 2.1.» (Manugistics Corp., США). Дані представляли у вигляді  $M \pm SE$  (середнє арифметичне значення  $\pm$  стандартна похибка). Статистичну значущість результатів визначали непараметричним методом Манна-Вітні при  $p < 0,05$ . Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше п'яти.

### Результати та обговорення

В останні роки застосування антиоксидантів для кріоконсервування різних біологічних об'єктів стало предметом досліджень, спрямованих на поліпшення якості клітин після заморожування [7]. Проте використання антиоксидантів та інгібіторів апоптозу для кріоконсервування ЯВК КК практично не досліджувалося.

Тролокс(6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) — гідрофільний аналог  $\alpha$ -токоферолу, який є найбільш активною та поширеною формою токоферолів (вітаміну Е) в організмі людини. Проте, в порівнянні з ліпідорозчинним  $\alpha$ -токоферолом, тролокс є гідророзчинним, що забезпечує йому можливість досягати як водного, так і ліпідного компартменту клітин [2]. Тролокс запобігає окиснювальному пошкодженню мембран шляхом інгібування перекисного окиснення поліненасичених жирних кислот [6, 9]. Крім того, він реагує з синглетним киснем та супероксид-аніонами, які, за даними М. Minaei та співавт. [10], можуть бути основними факторами визначення механізму ініціації апоптозу. Отже, з метою пригнічення окисного стресу в різних клітинних системах було доцільним внесення тролоксу до кріозахисного розчину для консервування ЯВК КК.

На даний час існує багато даних відносно ефективних концентрацій тролоксу, які визначаються типом біооб'єкта для кріоконсервування [10, 15]. Тому у роботі ми використовували широкий концентраційний діапазон даного антиоксиданта (20; 30; 50; 70 та 200 мкМ) у поєднанні з ДМСО в концентраціях 2,5; 5 та 7,5%. Зазначені концентрації кріопротектора були обрані з огляду на те, що 7,5% — оптимальна ефективна концентрація, яка застосовується в більшості кріобанків, проте частіше за все потребує видалення перед застосуванням; 5% — мінімально необхідна концентрація, яка забезпечує прийнятну збереженість клітин та не потребує

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) is a hydrophilic analogue of  $\alpha$ -tocopherol, which is the most active and widely distributed form of tocopherols (vitamin E) in human body. However, in comparison to the lipid-soluble  $\alpha$ -tocopherol, trolox is water-soluble, enabling it to reach both the aqueous and lipid compartments of cells [2]. Trolox prevents oxidative damage to membranes through inhibiting the peroxidation of polyunsaturated fatty acids [6, 9]. In addition, it reacts with singlet oxygen and superoxide anions, which, as reported by M. Minaei *et al.* [10], can be the main factors in determining the mechanism of apoptosis initiation. Therefore, in order to suppress an oxidative stress in various cellular systems, supplement of trolox to the cryoprotective solution for the preservation of CB NCs is deemed appropriate.

Currently, there is abundant data available on the effective concentrations of trolox, which are determined based on the type of biological object to be cryopreserved [10, 15]. Therefore, in this study we used a broad range of concentrations for this antioxidant (20; 30; 50; 70 and 200  $\mu\text{mol}$ ) in combination with DMSO at concentrations of 2.5; 5 and 7.5%. The specified concentrations of cryoprotectant were chosen with consideration that 7.5% is the optimal effective concentration commonly used in most cryobanks, although it often requires removal prior to use; 5% is the minimum concentration necessary to ensure acceptable cell preservation without the need for removal; a DMSO concentration of 2.5% was chosen as a negative control [5].

It is well-known that the freeze-thawing exerts a significant physicochemical impact on cells, resulting in their death through both necrosis and apoptosis, therefore it was advisable to conduct an analysis of the CB NCs with the determination of the number of viable functionally active (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) and damaged/dead cells, as well as determine the way of their death. The analysis of the results showed that a small percentage of cells (1–3%) was in the initial stage of apoptosis (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) (Table). These cells are characterized by the loss of lipid asymmetry in the plasma membrane and the exposure of phosphatidylserine on the outer surface of the membrane, which is typically located exclusively on the inner side of the lipid bilayer [12].

The minimum number of such cells was observed after cryopreservation with 2.5% DMSO, while the maximum – with 7.5% DMSO. Significant differences were found in the samples cryopreserved with 5% DMSO containing 30 or 50  $\mu\text{M}$  trolox,



видалення; концентрація ДМСО 2,5% була обрана у якості негативного контролю [5].

Відомо, що заморожування-відігрів чинить значний фізико-хімічний вплив на клітини, який призводить до їх загибелі як шляхом некрозу, так і апоптозу, тому доцільно було провести аналіз ЯВК КК з визначенням кількості живих функціонально активних (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) та пошкоджених/мертвих клітин, а також з'ясувати шлях їх загибелі. Аналіз результатів показав, що незначний відсоток клітин (1–3%) знаходиться на початковій стадії апоптозу (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) (таблиця). Для таких клітин характерна втрата ліпідної асиметрії плазматичної мембрани та експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні мембрани, який в нормі розташовується виключно на внутрішній стороні бішару [12].

Мінімальна кількість таких клітин спостерігалася після кріоконсервування з 2,5% ДМСО, а максимальна — з 7,5% ДМСО. Виявлено значущі відмінності в пробах, кріоконсервованих з 5% ДМСО, що містять 30 або 50 мкМ тролоксу, а також 7,5% ДМСО та 30 мкМ антиоксиданта (таблиця).

Кількість клітин на стадії пізнього апоптозу (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) складає 5–10% залежно від концентрації ДМСО (таблиця). Значущих відмінностей у межах одного концентраційного ряду кріопротектора не виявлено. Проте можна вказати на значущі відмінності між пробами, що містять 2,5 та 7,5% ДМСО з усіма концентраціями тролоксу. Причому кількість клітин даного типу більша в пробах з 7,5% ДМСО. Це можна пояснити підвищенням збереженості структурної цілісності клітин даного типу в пробах.

Кріоконсервування досить негативно впливає на стан клітин, тому деякі з них не здатні пристосуватися до таких умов та гинуть шляхом некрозу. Некротичними клітинами ми вважали ті, що не зв'язались з Annexin V, але захопили 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>). Кількість цих клітин є показником, який дозволяє об'єктивно визначити, наскільки оптимальними/незбалансованими були умови кріоконсервування, оскільки чим більше несприятливих факторів впливало на клітини, тим вище відсоток пошкоджених клітин такого типу в суспензії. Аналіз результатів виявив чітку залежність між концентраційними рядами кріопротектора. В пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО, спостерігалась максимальна кількість некротичних клітин (37–46%), а в пробах з 5% ДМСО — 27–33%. Мінімальні значення (17–25%) були одержані при оптимальній загальнозживаній концентрації ДМСО —

as well as 7.5% DMSO and 30 μM antioxidant (Table).

The number of cells at the late apoptosis stage (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) ranges from 5 to 10% depending on the concentration of DMSO (Table). No significant differences were found within one concentration range of the cryoprotectant. However, significant differences can be indicated between the samples containing 2.5 and 7.5% DMSO with all trolox concentrations. Moreover, the number of cells of this type is higher in the samples with 7.5% DMSO. This can be explained by an enhanced preservation of the structural integrity of the cells of this type in the samples.

Cryopreservation has a rather negative impact on the state of cells, so some of them are unable to adapt to such conditions and die by necrosis. We considered cells as necrotic if they did not bind to Annexin V, but captured 7-AAD (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>+</sup>). The number of these cells serves as an indicator to objectively determine how optimal/imbalanced the cryopreservation conditions were, since the more adverse factors affected the cells, the higher the percentage of damaged cells of this type in the suspension. The analysis of the results revealed a clear dependence between the concentration series of the cryoprotectant. In the samples cryopreserved with 2.5% DMSO, the highest number of necrotic cells was observed (37–46%), while samples with 5% DMSO showed a range of 27–33%. The lowest values (17–25%) were obtained at the optimal commonly used concentration of DMSO — 7.5% (Table). Analysis of the effect of different trolox concentrations within the same DMSO concentration showed significant differences in the samples with 2.5% DMSO and 30, 50, 70 and 200 μM trolox, as well as 7.5% DMSO and 50–200 μM antioxidant (Table). These findings indicate the ability of trolox to increase a cell resistance despite the ultra-low cryoprotective effect of DMSO (2.5%).

Analysis of cells that did not bind any dye (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) revealed significant differences among the experimental groups depending on the concentration of DMSO used (Table). The highest number of intact cells was observed in samples with 7.5% DMSO and 30–200 μM trolox.

It is obvious that the effectiveness of CB NCs cryopreservation cannot be the same if to use both a low concentration of DMSO (2.5%) and an optimal one (7.5%). At the same time, the parameters studied above indicate their relativity, as any number of cells in each sample remaining in the sample was considered as 100%. Therefore, at the next stage, the absolute number of cells re-



Кількість клітин на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в розчинах ДМСО та тролоксу різної концентрації  
The number of cells at different stages of apoptosis/necrosis after cryopreservation in DMSO and trolox solutions of different concentrations

| Концентрація ДМСО, %<br>DMSO concentration, % | Концентрація тролоксу, мкМ<br>Trolox concentration, $\mu$ M | Стан ЯВК КК<br>CB NCs state   |  |   |  |
|---|---|---|--|---|--|
|   |   | I стадія апоптозу<br>(AnnexinV <sup>+</sup> /7AAD <sup>-</sup> )<br>I stage of apoptosis<br>(AnnexinV <sup>+</sup> /7AAD <sup>-</sup> ) | Апоптоз/некроз<br>(AnnexinV <sup>+</sup> /7AAD <sup>+</sup> )<br>Apoptosis/necrosis<br>(AnnexinV <sup>+</sup> /7AAD <sup>+</sup> ) | Некроз (AnnexinV <sup>-</sup> /<br>7AAD <sup>+</sup> )<br>Necrosis<br>(AnnexinV <sup>-</sup> /7AAD <sup>+</sup> ) | Живі клітини<br>(AnnexinV <sup>-</sup> /7AAD <sup>-</sup> )<br>Viable cells<br>(AnnexinV <sup>-</sup> /7AAD <sup>-</sup> ) |
| 2,5   | Контроль<br>Control   | 1,4 ± 0,4   | 5,0 ± 0,9  | 45,6 ± 2,8  | 51,1 ± 2,4   |
|   | 20 мкМ  | 1,4 ± 0,2   | 5,7 ± 0,7  | 41,1 ± 4,1  | 51,8 ± 3,4   |
|   | 30 мкМ  | 1,5 ± 0,3   | 6,8 ± 0,3*   | 36,8 ± 3,1*   | 54,2 ± 3,2   |
|   | 50 мкМ  | 1,7 ± 0,4   | 6,3 ± 0,7  | 36,5 ± 3,8*   | 54,9 ± 3,9   |
|   | 70 мкМ  | 1,6 ± 0,5   | 5,9 ± 1,1  | 36,9 ± 3,2*   | 55,7 ± 3,4   |
|   | 200 мкМ   | 1,8 ± 0,3   | 6,4 ± 1,0  | 37,1 ± 4,1*   | 55,3 ± 3,5   |
| 5   | Контроль<br>Control   | 1,5 ± 0,3   | 6,4 ± 1,0  | 32,9 ± 4,2  | 59,3 ± 2,8   |
|   | 20 мкМ  | 1,6 ± 0,4   | 6,8 ± 0,7  | 29,1 ± 3,8  | 62,5 ± 3,0   |
|   | 30 мкМ  | 2,3 ± 0,3*  | 7,9 ± 0,8  | 27,7 ± 4,1  | 62,1 ± 3,1   |
|   | 50 мкМ  | 2,2 ± 0,2*  | 8,0 ± 1,1  | 27,0 ± 3,5  | 63,3 ± 2,4   |
|   | 70 мкМ  | 1,9 ± 0,3   | 8,2 ± 0,8  | 27,1 ± 3,0  | 64,4 ± 2,5   |
|   | 200 мкМ   | 2,2 ± 0,3   | 7,1 ± 0,6  | 28,3 ± 3,4  | 62,5 ± 2,8   |
| 7,5   | Контроль<br>Control   | 1,8 ± 0,3   | 7,6 ± 1,0  | 25,3 ± 2,2  | 64,8 ± 1,3   |
|   | 20 мкМ  | 2,1 ± 0,3   | 7,8 ± 1,0  | 20,4 ± 2,4  | 69,8 ± 2,3   |
|   | 30 мкМ  | 2,7 ± 0,3*  | 8,3 ± 0,9  | 18,7 ± 2,4*   | 70,3 ± 1,3   |
|   | 50 мкМ  | 2,4 ± 0,5   | 8,6 ± 0,8  | 18,4 ± 1,8*   | 70,6 ± 1,9   |
|   | 70 мкМ  | 1,9 ± 0,4   | 9,0 ± 0,8  | 17,4 ± 1,7*   | 71,7 ± 2,1   |
|   | 200 мкМ   | 2,1 ± 0,5   | 7,4 ± 0,4  | 20,2 ± 1,3*   | 70,4 ± 1,4   |

**Примітка:** \* — різниця значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта;  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – significant difference with respect to the corresponding antioxidant-free control values;  $p < 0.05$ .





7,5% (таблиця). Аналіз впливу різних концентрацій тролоксу в межах однієї концентрації ДМСО показав значущі відмінності в пробах з 2,5% ДМСО та 30, 50, 70 та 200 мкМ тролоксу, а також 7,5% ДМСО та 50–200 мкМ антиоксиданта (таблиця). Одержані дані вказують на здатність тролоксу підвищувати стійкість клітин, незважаючи на наднизький кріопротекторний ефект ДМСО (2,5%).

Аналіз клітин, які не зв'язали жодного барвника (AnnexinV-7AAD<sup>-</sup>), виявив значущі відмінності між експериментальними групами залежно від використаної концентрації ДМСО (таблиця). Максимальна кількість неушкоджених клітин спостерігалася в пробах з 7,5% ДМСО та 30–200 мкМ тролоксу.

Очевидно, що ефективність кріоконсервування ЯВК КК не може бути однаковою за умов використання як низької концентрації ДМСО (2,5%), так і оптимальної (7,5%). При цьому досліджені вище параметри вказують на їх відносність, оскільки в кожному зразку будь-яка кількість клітин, що залишилися в пробі, приймалася за 100%. Тому на наступному етапі підраховували абсолютну кількість клітин, які залишилися в пробах. Враховуючи ці дані, було визначено збереженість ЯВК КК після заморожування в різних кріопротекторних розчинах. Саме такий підхід дозволяє визначити кількість ЯВК, які у процесі кріоконсервування отримали значні пошкодження та зазнали руйнування.

Аналіз кількості збережених клітин після розморожування виявив значущий взаємозв'язок з обраною концентрацією кріопротектора (рис. 2).

Використання ДМСО в концентрації 2,5% призводило до втрати 50% клітин у пробах, які кріоконсервували без додавання антиоксиданта (контроль), та 45% клітин з тролоксом у кінцевих концентраціях 50 мкМ і вище. Проте значущих відмінностей по відношенню до контролю виявлено не було. Під захистом 5% ДМСО зберігалася тенденція до підвищення збереженості клітин до 72% при застосуванні 50–70 мкМ тролоксу. Максимальна збереженість клітин була в пробах з 7,5% ДМСО. В контролі цей показник становив близько 75%, а після внесення тролоксу спостерігалися значущі відмінності (до 87%) у пробах з 50, 70 та 200 мкМ антиоксиданта (рис. 2).

З урахуванням отриманих даних (відсоток неушкоджених AnnexinV-7AAD<sup>-</sup>-клітин та абсолютна кількість клітин у пробах) на наступному етапі визначали вихід неушкоджених клітин після заморожування-відігріву. Одержані результати доз-

maining in the samples was counted. By considering these data, the preservation of CB NCs after freezing in various cryoprotective solutions was determined. It is this approach that enables the assessment of the number of significantly damaged and destroyed NCs during the cryopreservation process.

The analysis of the number of cells preserved after thawing revealed a significant correlation with the selected concentration of cryoprotectant (Fig. 2).

The use of 2.5% DMSO concentration resulted in the loss of 50% of cells in samples cryopreserved without the addition of the antioxidant (control), and 45% of cells with trolox at final concentrations of 50  $\mu$ M and above. However, no significant differences were found compared to the control group. With 5% DMSO protection, an average of 65% of cells were preserved, and there was a tendency for cell preservation to increase to 72% when 50–70  $\mu$ M trolox was used. The maximum cell preservation was observed in samples with 7.5% DMSO. In the control group, this value was approximately 75%, and after adding trolox, significant differences (up to 87%) were observed in samples with 50, 70 and 200  $\mu$ M of the antioxidant (Fig. 2).

Taking into account the obtained data (the percentage of intact AnnexinV-7AAD<sup>-</sup> cells and the absolute number of cells in the samples), at the next stage we determined the yield of intact cells after freezing-warming. The obtained results will enable the identification of effective concentrations of the antioxidant for stabilizing cells and enhancing their resistance to cryopreservation factors.

The results of determining the number of viable cells with an intact membrane after thawing, as expected, showed that it was the lowest in samples with 2.5% DMSO (Fig. 3). However, despite the low concentration of the cryoprotectant and, thus, the significant imbalance of the cryoprotectant solution, a 10% increase in the number of viable intact cells can be indicated in the samples containing 50 and 70  $\mu$ M trolox (Fig. 3).

Increasing the concentration of cryoprotectant to 5% significantly improves the yield of viable cells compared to 2.5% DMSO in all experimental groups (Fig. 3). In the control group the yield of viable cells with an intact membrane was 40%, whereas after adding 50 or 70  $\mu$ M trolox to the cryoprotective solution, it was 50%.

Analysis of samples containing 7.5% DMSO and trolox in the cryoprotective solution showed that in the control group the cell yield was approximately 54% compared to the number of cells before





волять виділити ефективні концентрації антиоксиданта для стабілізації клітин та підвищення їхньої стійкості до факторів кріоконсервування.

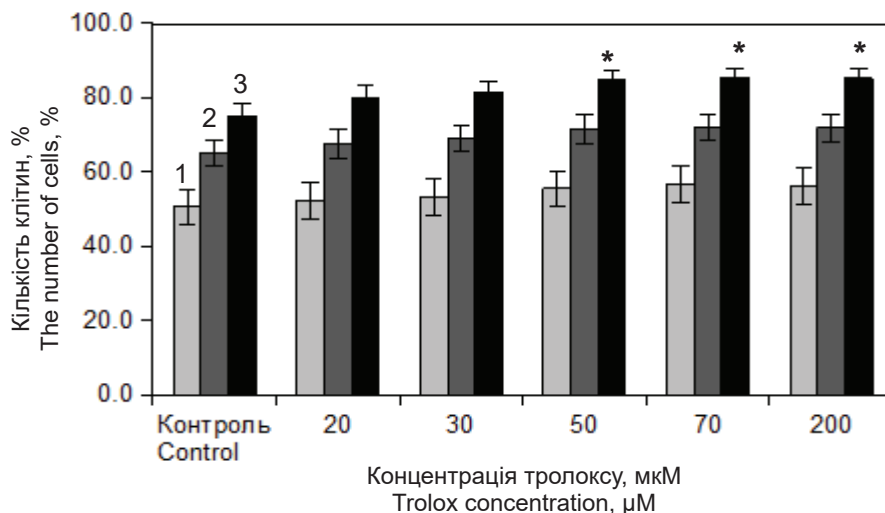
Результати визначення кількості життєздатних клітин з нешкодженою мембраною після розморожування, як і очікувалось, показали, що найнижчою вона була у пробах з 2,5% ДМСО (рис. 3). Проте, незважаючи на низьку концентрацію кріопротектора і, таким чином, на значну незбалансованість кріопротекторного розчину, можна вказати на збільшення (10%) кількості живих нешкоджених клітин в пробах, що містили 50 та 70 мкМ тролоксу (рис. 3).

Підвищення концентрації кріопротектора до 5% значуще підвищує вихід живих клітин у порівнянні з 2,5% ДМСО в усіх експериментальних групах (рис. 3). Якщо в контрольній групі вихід життєздатних клітин з нешкодженою мембраною складав 40%, то після додавання в кріопротекторний розчин 50 або 70 мкМ тролоксу — 50%.

Аналіз зразків, які в складі кріопротекторного розчину містили 7,5% ДМСО та тролокс, показав, що в контролі вихід клітин складав близько 54% у порівнянні з кількістю клітин до кріоконсервування, а після додавання 50 або 70 мкМ тролоксу — до 70% (рис. 3).

Таким чином, отримані результати вказують на те, що додавання тролоксу в середовище кріоконсервування попереджає порушення антиоксидантних процесів в ЯВК, запобігає розвитку окисного стресу, що підвищує показники збереженості та життєздатності клітин. Ці дані можуть стати передумовою удосконалення наявних методів кріоконсервування ЯВК КК за рахунок запобігання розвитку апоптозу і, як наслідок, загибелі клітин.

У подальшому ми плануємо оцінити ефективність кріоконсервування ЯВК КК у кріозахисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та тролоксу, після моделюван-

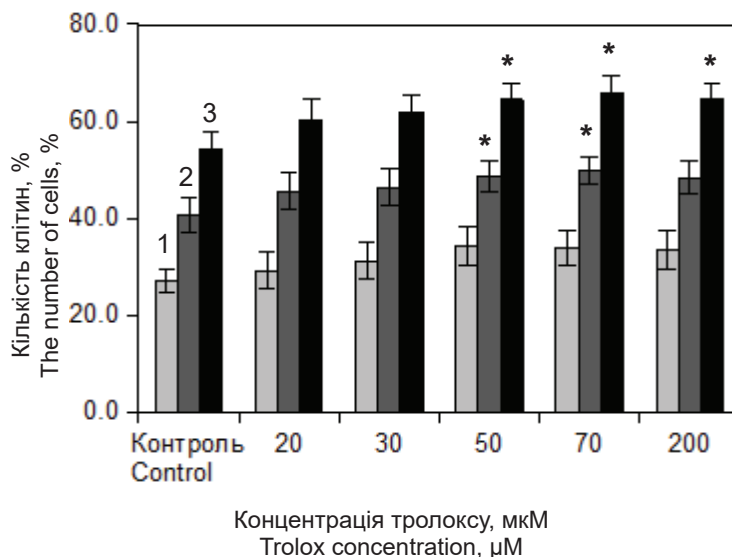


**Рис. 2.** Збереженість ядровмісних клітин кордової крові людини після кріоконсервування в розчинах ДМСО та тролоксу: 1 — з 2,5% ДМСО; 2 — з 5% ДМСО; 3 — з 7,5% ДМСО. \* — різниця значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта;  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Preservation of human cord blood nucleated cells after cryopreservation in DMSO and trolox solutions: 1 — with 2.5% DMSO; 2 — with 5% DMSO; 3 — with 7.5% DMSO. \* — significant difference with respect to the corresponding antioxidant-free control values;  $p < 0.05$ .

cryopreservation, and after the addition of 50 or 70 μM trolox it was up to 70% (Fig. 3).

Thus, the obtained results indicate that the addition of trolox to the cryopreservation medium prevents the disruption of antioxidant processes in



**Рис. 3.** Вихід AnnexinV-7AAD-клітин після кріоконсервування відносно їхнього початкового рівня до заморожування в розчинах ДМСО та тролоксу різної концентрації: 1 — з 2,5% ДМСО; 2 — з 5% ДМСО; 3 — з 7,5% ДМСО. \* — різниця значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта;  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Yield of AnnexinV-7AAD- cells after cryopreservation relative to their initial level prior the freezing in DMSO and trolox solutions of different concentrations: 1 — with 2.5% DMSO; 2 — with 5% DMSO; 3 — with 7.5% DMSO. \* — significant difference with respect to the corresponding antioxidant-free control values;  $p < 0.05$ .



ня трансфузії *in vitro*. Це надасть можливість визначити відстрочений у часі структурно-функціональний стан клітин після розморожування та прогнозувати ефективність їх застосування у клінічній практиці.

### Висновки

1. Встановлено, що після заморожування в середовищах із додаванням тролоксу максимальна збереженість клітин була в пробах, які містили 7,5% ДМСО та 50, 70 або 200 мкМ антиоксиданта.

2. Результати визначення кількості збережених клітин на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в середовищах із додаванням тролоксу свідчать, що використання даного антиоксиданта в концентраціях 50–70 мкМ разом з 7,5% ДМСО здатне підвищити кількість живих неушкоджених клітин (AnnexinV<sup>-</sup>/7AAD<sup>-</sup>) на 12–16% у порівнянні з контрольними пробами з додаванням тільки кріопротектора.

3. У проведеному дослідженні з'ясовані шляхи загибелі ядровмісних клітин кордової крові людини після кріоконсервування в розчинах, що містять різну концентрацію ДМСО та водорозчинного аналога вітаміну Е — антиоксиданта тролоксу. Більша частина пошкоджених клітин знаходилася на стадії некрозу, менша — на стадії пізнього апоптозу/некрозу, мінімальна — на початковій стадії апоптозу.

the NCs, prevents the development of oxidative stress, which increases the indicators of cell preservation and viability. These findings can become a prerequisite for the improvement of existing methods of CB NCs cryopreservation by preventing the development of apoptosis and subsequent cell death.

In the future, we plan to assess the efficacy of CB NCs cryopreservation in cryoprotective solutions containing varying concentrations of DMSO and trolox, after *in vitro* transfusion simulation. This will provide an opportunity to determine the time-delayed structural and functional state of cells after thawing and predict the effectiveness of their use in clinical practice.

### Conclusions

1. It was revealed that after freezing in media with the addition of trolox, the highest cell preservation was in samples containing 7.5% DMSO and 50, 70 or 200 μM of the antioxidant.

2. The results of determining the number of preserved cells at various stages of apoptosis/necrosis after cryopreservation in the media with adding the trolox indicate that the use of this antioxidant at concentrations of 50–70 μM along with 7.5% DMSO can increase the number of viable intact cells (AnnexinV<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) by 12–16% compared to control samples with only the cryoprotectant added.

3. In the performed study, the pathways of death of human cord blood nucleated cells were specified after cryopreservation in the solutions containing varying concentrations of DMSO and the water-soluble analogue of vitamin E, the antioxidant trolox. The majority of the affected cells were in the necrosis stage, a smaller portion of them were in the late apoptosis/necrosis stage, and the lowest number was in the initial stage of apoptosis.

### Література

1. Бабійчук ЛО, Грищенко ВІ, Гуріна ТМ, та ін., винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин. Патент України № 92227. 11.10.2010.
2. Baishya SK, Biswas RK, Govindasamy K, et al. Effect of reduced glutathione, water soluble vitamin E analogue and butylated hydroxytoluene on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *CryoLetters*. 2018; 39(4): 227–34.
3. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 122(4): 491–8.
4. Davis JM, editor. *Basic cell culture. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 2002. 382 p.
5. Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18(4):725–73.
6. Giordano ME, Caricato R, Lionetto MG. Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in HeLa cells: involvement in the induction of apoptotic volume decrease. *Antioxidants* [Internet]. 2020 Oct 29

### References

1. Babijchuk LO, Gryschenko VI, Gurina TM, etc., inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [The technique of cryopreservation for cord blood nucleated cells, including hematopoietic stem cells]. Ukraine patent № 92227. 2010 Oct 11. Ukrainian.
2. Baishya SK, Biswas RK, Govindasamy K, et al. Effect of reduced glutathione, water soluble vitamin E analogue and butylated hydroxytoluene on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *CryoLetters*. 2018; 39(4): 227–34.
3. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 122(4): 491–8.



- [cited 2022 Sept 19]; 9(11): 1058. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1058>
7. Ha SJ, Kim BG, Lee YA, et al. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells. *PLoS One* [Internet]. 2016 Aug 22 [cited 2022 Sept 12]; 11(8): e0161372. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161372>.
  8. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21<sup>st</sup> century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014; 124(3): 334–43.
  9. Massey KD, Burton KP. Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of alpha-tocopherol, trolox and phytol. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(5): 449–58.
  10. Minaei M, Barbarestani M, Nekoonam S, et al. Effect of trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iran J Reprod Med*. 2012; 10(2): 99–104.
  11. Murugesan M, Nair CK, Nayanar SK, Pentapati KC. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: A comparison between single- versus dual-platform methodology using the ISHAGE protocol. *Asian J Transfus Sci*. 2019; 13(1): 43–6.
  12. Oram JF, Wolfbauer G, Vaughan AM, et al. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(52): 52379–85.
  13. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5): 981–90.
  14. Rocha V, Gluckman E. Eurocord-Netcord registry and European blood and marrow transplant group. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br J Haematology*. 2009; 147(2): 262–74.
  15. Varo-Ghiuru F, Miclea I, Hettig A, et al. Lutein, trolox, ascorbic acid and combination of trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. *CryoLetters*. 2015; 36(1): 1–7.
  16. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39–51.
  4. Davis JM, editor. *Basic cell culture. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 2002. 382p.
  5. Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 18(4): 725–73.
  6. Giordano ME, Caricato R, Lionetto MG. Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in HeLa cells: involvement in the induction of apoptotic volume decrease. *Antioxidants* [Internet]. 2020 Oct 29 [cited 2022 Sept 19]; 9(11): 1058. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1058>
  7. Ha SJ, Kim BG, Lee YA, et al. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells. *PLoS One* [Internet]. 2016 Aug 22 [cited 2022 Sept 12]; 11(8): e0161372. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161372>.
  8. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21<sup>st</sup> century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014; 124(3): 334–43.
  9. Massey KD, Burton KP. Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of alpha-tocopherol, trolox and phytol. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(5): 449–58.
  10. Minaei M, Barbarestani M, Nekoonam S, et al. Effect of trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iran J Reprod Med*. 2012; 10(2): 99–104.
  11. Murugesan M, Nair CK, Nayanar SK, Pentapati KC. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: A comparison between single- versus dual-platform methodology using the ISHAGE protocol. *Asian J Transfus Sci*. 2019; 13(1): 43–6.
  12. Oram JF, Wolfbauer G, Vaughan AM, et al. Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(52): 52379–85.
  13. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5): 981–90.
  14. Rocha V, Gluckman E. Eurocord-Netcord registry and European blood and marrow transplant group. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br J Haematology*. 2009; 147(2): 262–74.
  15. Varo-Ghiuru F, Miclea I, Hettig A, et al. Lutein, trolox, ascorbic acid and combination of trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. *CryoLetters*. 2015; 36(1): 1–7.
  16. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39–51.

