https://doi.org/10.15407/cryo26.02.183

Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови

Е.Е. Макашова, О.Л. Зубова, П.М. Зубов
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of N-Acetyl-L-Cysteine Antioxidant in Cryopreservation of Cord Blood Nucleated Cells

E.Ye. Makashova, O.L. Zubova, P.M. Zubov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Использование клеточных препаратов кордовой крови (КК) в клинической практике вызывает необходимость их долгосрочного хранения. Общепринятым криопротектором для криоконсервирования ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови является ДМСО, который при определенных условиях может оказывать токсический эффект, в частности нарушать оксидантно-прооксидантное равновесие, усиливать образование активных форм кислорода (АФК), способствовать развитию окислительного стресса и гибели клеток [Fry L.J., 2015]. Для предотвращения избыточного накопления содержания АФК в клетках перспективным направлением может оказаться добавление в криозащитную среду антиоксидантов, одним из которых является N-ацетил-L-цистеин (АЦ) [Chaudhari A.A., 2007].

Цель данной работы – определение количества ЯСК КК с избыточным содержанием АФК и их жизнеспособности на разных этапах криоконсервирования в криопротекторных растворах, содержащих разные концентрации ДМСО и АЦ.

В работе использовали КК человека. Фракцию ЯСК КК выделяли седиментацией с использованием 6%-го раствора полиглюкина. Суспензию клеток обрабатывали 25%-м раствором ДМСО до конечных концентраций 5; 7,5; 10% и охлаждали со скоростью 1–3 град/мин до –80°С с последующим погружением в жидкий азот. N-ацетил-L-цистеин присутствовал в средах криоконсервирования в концентрациях 5, 10, 15 и 30 ммоль. Количество клеток с избыточным содержанием АФК определяли методом проточной цитофлуориметрии по накоплению 2',7'-дихлорфлуресцеина. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью ДНК-красителя 7-AAD.

После размораживания препаратов ЯСК КК было выявлено, что добавление 5 ммоль раствора АЦ в криопротекторные среды не приводило к значимым изменениям количества клеток с избыточным содержанием АФК. N-ацетил-L-цистеин в концентрации 30 мМ также не проявлял антиоксидантного действия, а в некоторых случаях даже наблюдался его прооксидантный эффект. Добавленный в среду криоконсервирования АЦ в концентрации 10–15 мМ способствовал значимому уменьшению количества клеток с избыточным содержанием АФК после размораживания. При этом наименьшее количество ЯСК КК с избыточным содержанием АФК отмечалось при использовании 10 мМ АЦ в сочетании с 7,5% (8,7 ± 1,5 (без АЦ – 20,6 ± 3,2)) и 10% ДМСО (8,3 ± 0,9 (без АЦ – 21,2 ± 1,9)). Жизнеспособность клеток при этом возросла на 7–14% по сравнению с соответствующими контрольными группами без АЦ.

Таким образом, добавление в суспензию клеток АЦ в концентрации 10–15 мМ способствует снижению уровня АФК, а значит – предотвращению развития окислительного стресса и, тем самым, повышению эффективности криоконсервирования.

The use of cord blood (CB) cell preparations in clinical practice necessitates their long-term storage. DMSO is traditionally used as cryoprotective agent to cryopreserve the nucleated cells (NCs) of cord blood. DMSO can be toxic under certain conditions, in particular, it can break the oxidant-prooxidant balance, enhance the formation of reactive oxygen species (ROS), contribute to the development of oxidative stress and cell death [Fry L.J., 2015]. An excessive accumulation of ROS in cells could be prevented by supplementation of antioxidants to cryoprotective media [Chaudhari A.A., 2007]. One of those is N-acetyl-L-cysteine (NAC).

This research was aimed to determine the content of CB NCs with an excessive ROS content and their viability at different stages of cryopreservation in cryoprotective solutions containing different concentrations of DMSO and NAC.

In the research we used human CB. The fraction of CB NCs was isolated by sedimentation using 6% Polyglucinum solution. The cell suspension was supplemented with 25% DMSO solution up to its final concentrations of 5; 7.5; 10%, cooled at 1–3 deg/min down to –80°C, and then immersed into liquid nitrogen. N-acetyl-L-cysteine was added to cryopreservation media up to the concentrations of 5, 10, 15 and 30 mM. The number of cells with excessive ROS was determined by flow cytometry by accumulation of 2',7'-dichlorofluorescein. Cell viability was assessed by 7-AAD DNA dye.

After thawing of the CB NCs preparations it was revealed that presence of 5 mM NAC solution in cryoprotective media did not lead to significant changes in the number of cells with excessive ROS content. N-acetyl-L-cysteine in concentration of 30 mM also did not demonstrate any antioxidant activity, and in some cases there was even observed a prooxidant effect. Presence of 10–15 mM NAC in cryopreservation medium resulted in a sharp decrease in the cell number with excessive ROS after thawing. As well the least number of CB NCs with an excessive ROS content was observed when 10 mM NAC was in combination with 7.5% (8.7 ± 1.5 (without NAC 20.6 ± 3.2)) and 10% DMSO (8 3 ± 0.9 (without NAC 21.2 ± 1.9)). Herewith, cell viability increased by 7–14% if compared with the corresponding control groups without NAC.

Thus, supplementation of cell suspension with NAC in concentration of 10–15 mM contributed to the reduction of ROS level and consequently to the prevention of oxidative stress, thereby to enhancing the efficiency of cryopreservation.