



<https://doi.org/10.15407/cryo35.02.092>

УДК 611.018.53:618.48:57.086.13:577.121.7

П.М. Зубов *, О.Л. Зубова

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

* pmzubov@gmail.com

АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ: РОЛЬ ТРОЛОКСУ В ЗБЕРЕЖЕННІ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

У роботі представлено експериментальні дані з визначення кількісних та якісних характеристик ядровісних клітин (ЯВК), у тому числі гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК), кордової крові (КК) людини після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та антиоксиданта тролоксу і моделювання трансфузії *in vitro*. Результати дослідження показали, що інкубація деконсервованих ЯВК КК протягом години в фізіологічних умовах *in vitro* викликала зниження показників їх збереженості та життєздатності порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування. Ці зміни, ймовірно, пов'язані з руйнуванням частини клітин, які містили високий вміст активних форм кисню (АФК), через механічні та метаболічні порушення, викликані факторами заморожування-відігрівання. Додавання на етапі еквілібрації в кріозахисне ДМСО-вмісне середовище антиоксиданта тролоксу в концентраціях 50 або 70 мкМ сприяє зменшенню кількості клітин із надлишковим вмістом АФК та підвищенню показників їх збереженості та життєздатності як після розморожування суспензії клітин, так і після перенесення до фізіологічних умов *in vitro*. Отримані результати з визначення відстроченої виживаності клітин вказують на ефективність застосування антиоксиданту тролоксу та перспективність розробки тролокс-вмісних кріопротекторних сумішей для заморожування ядровісних, у тому числі ГПК, клітин КК людини та можуть стати передумовою для вдосконалення чинних та розробки нових підходів їх кріоконсервування та довгострокового зберігання в умовах низькотемпературного банку.

Ключові слова: кріоконсервування, диметилсульфоксид, кордова кров, ядровісні клітини, антиоксидант тролокс, моделювання трансфузії *in vitro*.

Довгострокове зберігання клітин кордової крові (КК) людини з використанням кріотехнологій є одним з ключових етапів у клітинній терапії, від якості якого залежить своєчасність, швидкість, безпека, а також ефективність застосування препаратів для лікування онкогематологічних, аутоімунних, генетичних та інших тяжких захворювань [4, 6, 19]. Однак навіть за умов сучасного розвитку науки залишається низка проблем, які можуть впливати

на ефективність застосування КК. Зокрема, під час заморожування-відігрівання в ядровісних клітинах (ЯВК), у тому числі гемопоетичних прогеніторних клітинах (ГПК), відбуваються виражені структурні та біохімічні зміни, які значною мірою можуть впливати на їхню життєздатність та функціональну активність після потрапляння в організм реципієнта. Тому одним із методів, що дозволяє оцінити якість збережених клітин перед клінічним застосу-

Цитування: Зубов ПМ, Зубова ОЛ. Антиоксидантний захист при кріоконсервуванні: роль тролоксу в збереженні ядровісних клітин кордової крові людини. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(2): 94–104. <https://doi.org/10.15407/cryo35.02.092>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

ванням, може стати моделювання трансфузії *in vitro*, яке забезпечує точний контроль умов експерименту та дає змогу виявляти зміни стану клітин через деякий час після розмороження.

У сучасних методах кріоконсервування ЯВК КК активно використовують диметилсульфоксид (ДМСО) як основний кріопротектор [12]. Ця речовина захищає клітини від ушкоджень, спричинених формуванням кристалів льоду під час заморожування, проте її застосування має й певні обмеження, пов'язані з цитотоксичністю, що виникає при високих концентраціях або недостатньому видаленні перед трансплантацією [9, 14]. Даний факт визначає актуальність досліджень, спрямованих на оптимізацію концентрації ДМСО та умов кріоконсервування.

Слід зауважити, що в процесі кріоконсервування клітини піддаються оксидативному стресу [13], який супроводжується накопиченням активних форм кисню (АФК) та пошкодженням клітинних мембран, білків і ДНК. Для мінімізації цих негативних ефектів все частіше використовують антиоксиданти, у тому числі тролокс — синтетичний аналог вітаміну Е [10, 16, 20]. Здатність знижувати рівень АФК і підтримувати життєздатність клітин обумовлює перспективність його застосування в кріопротекторних середовищах.

Виходячи з вищенаведеного, метою дослідження було визначення кількісних та якісних характеристик ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, клітин кордової крові людини після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією диметилсульфоксиду та водорозчинного аналога вітаміну Е — антиоксиданту тролоксу та моделювання трансфузії *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували КК людини, отриману з пуповини після нормальних пологів, за наявності інформованої згоди породіллі відповідно до вимог комісії з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Заготівлю крові здійснювали в скляний флакон ємністю 250 мл, що містив глюкозоцитратний антикоагулянт (Biopharma, Україна). Ядровмісні клітини із цільної КК виділяли шляхом седиментації в 6%-вому розчині поліглюкіну з молекулярною масою 60000 [1]. Для цього до флакона з кров'ю вносили поліглюкін (Yuria-Pharm, Україна), у співвідношенні 1 : 1, ретельно

перемішували та залишали на 30—50 хв до утворення чіткої межі між шаром еритроцитів та надосадам. Надосад відбирали в окремих скляний флакон ємністю 100 мл та центрифугували впродовж 15 хв при 800 g для осадження клітинної фракції та її подальшого концентрування.

Розчин антиоксиданту тролоксу (Sigma-Aldrich, США) готували на основі ДМСО та вносили в дослідні зразки до кінцевих концентрацій 20; 30; 50; 70 та 200 мкМ. До експериментальних проб вносили відповідні концентрації антиоксиданту та 25%-вий розчин ДМСО (Starlab, США), який був приготовлений на 6%-вому розчині поліглюкіну, до кінцевих концентрацій у пробі 2,5; 5; 7,5 %. Обробку проб ДМСО проводили крапельно при постійному перемішуванні на крижаній бані за температури 0—4 °С. Тривалість еквілібрації з кріопротектором перед перенесенням зразків до заморожувача становила 20 хв.

Заморожування проводили в пробірках «Nunc Cryotubes» (Thermo Fisher Scientific, США) зі швидкістю 1 °С/хв до –80 °С на програмному заморожувачі (ДВ СКТБ при ІПКіК НАН України) з подальшим зануренням у рідкий азот [1]. Відтавання зразків здійснювали за 37—40 °С на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази.

Моделювання трансфузії *in vitro* проводили шляхом перенесення частини суспензії розморожених ЯВК до розчину Хенкса (1 : 10 за об'ємом, рН 7,4) з підтриманням температури інкубації 37 °С [18] впродовж години. Після цього проводили центрифугування при 800g впродовж 5 хв з подальшим видаленням супернатанта.

Підрахунок абсолютної кількості ЯВК КК у зразках проводили в камері Горяєва згідно зі стандартною методикою [7].

Втрати клітин у процесі заморожування-відігрівання та моделювання трансфузії *in vitro* (збереженість ЯВК) розраховували за формулами:

Збереженість ЯВК (ГПК) після кріоконсервування =

$$= \frac{\text{Кількість клітин після кріоконсервування}}{\text{Початкова кількість клітин до кріоконсервування}} \times 100 \%,$$

Збереженість ЯВК (ГПК) після трансфузії =

$$= \frac{\text{Кількість клітин після моделювання трансфузії in vitro}}{\text{Початкова кількість клітин до кріоконсервування}} \times 100 \%,$$

Життєздатність ЯВК та ГПК оцінювали за стандартним ISHAGE протоколом (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) з використанням моноклональних анти-тіл і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) методом протокової цитофлуориметрії [15]. Для цього до 50 мкл клітинної суспензії додавали по 10 мкл реагентів (FITC-мічений CD45, клон 2D1, PE-мічений CD34, клон 8G12 та вітальний ДНК барвник 7AAD). Перемішували та інкубували 15 хв за кімнатної температури в темряві. Для руйнування еритроцитів до кожної пробірки додавали 1 мл лізуючого розчину «BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer» (BD, США). Аналізували зразки за допомогою програмного забезпечення для протокової цитофлуориметрії «CELLQuest Pro» (BD). Для мінімізації похибки аналізували 20000 подій (ЯВК) або не менш ніж 200 CD34⁺-клітин.

Вихід життєздатних ядровмісних (CD45⁺ 7AAD⁻) та гемопоетичних прогеніторних (CD34⁺ 7AAD⁻) клітин після кріоконсервування (моделювання трансфузії *in vitro*) по відношенню до їх початкового рівня до кріоконсервування визначали за формулами:

Вихід життєздатних клітин після кріоконсервування =

$$= \frac{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин після кріоконсервування}}{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин до кріоконсервування}} \times 100 \%,$$

Вихід життєздатних клітин після моделювання трансфузії *in vitro* =

$$= \frac{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин після моделювання трансфузії *in vitro*}}{\text{Абсолютна кількість життєздатних клітин до кріоконсервування}} \times 100 \%,$$

Абсолютна кількість життєздатних клітин до кріоконсервування дорівнювала добутку абсолютної кількості клітин, які збереглися в зразку до кріоконсервування, та відсотку життєздатних клітин у пробі до кріоконсервування (визначали методом протокової цитофлуориметрії як 7AAD⁻-клітини).

Абсолютна кількість життєздатних клітин після кріоконсервування (після моделювання трансфузії *in vitro*) дорівнювала добутку абсолютної кількості клітин, які збереглися в зразку після кріоконсервування (після моделювання трансфузії *in vitro*) та відсотку життєздатних клітин у пробі після кріоконсерву-

вання (після моделювання трансфузії *in vitro*) (визначали методом протокової цитофлуориметрії як 7AAD⁻-клітини).

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-Уїтні при $p < 0,05$. Кількість експериментів у кожній серії дослідів була не менше п'яти.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Як показали наші попередні дослідження [21], під час кріоконсервування ЯВК КК зазнають значного стресорного впливу, внаслідок якого накопичуються високі концентрації АФК. Згідно з даними Р.М. Henson та співавт. [11], ці молекули можуть ініціювати розвиток апоптозу та загибель клітин до і особливо після кріоконсервування. Існує також теорія, що в процесі кріоконсервування клітини отримують певні пошкодження або сигнали, які роблять їх «схильними» до розвитку апоптотичних/некротичних процесів, але не ініціюють їх розвиток у цей момент [5]. Крім того відомо, що під час кріоконсервування знижується активність антиоксидантної системи, порушується впорядкованість структури мембрани та відбувається вихід глутатіону з органел, що може призводити до збільшення рівня АФК у клітинах після їх перенесення у кровеносне русло з розвитком перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Також у роботі Н.С. Пушкаря та співавт. [2] вказується, що максимальний розвиток ПОЛ, наприклад, в розморожених мітохондріях, виявляється не відразу після відігрівання, а через певний проміжок часу, як правило, через кілька годин. Існує припущення, що відразу після відігрівання рівень ПОЛ лімітується антиоксидантами глутатіонпероксидазної системи [3]. В міру руйнування/виснаження природних механізмів захисту (антиоксидантів) після відігрівання в мітохондріях процеси окиснення зростають. Одним із специфічних проявів окиснення ліпідів є швидкий розвиток ПОЛ у мембрані, коли будь-які ультраструктурні порушення не виявляються. Подібна специфіка розвитку ПОЛ у мембранах мітохондрій після низькотемпературного впливу і в процесі зберігання детально

описується відомим кріобіологічним феноменом — латентністю холодового пошкодження. У зв'язку з вищенаведеним, у першу чергу для прогнозування збереження структурно-функціональних властивостей ЯВК КК людини, а також їх терапевтичної ефективності важливим завданням є не тільки оцінка кількості клітин відразу після розморожування, а й визначення відстроченого виживання, яке ми моделювали шляхом перенесення аліквоти клітин до фізіологічних умов *in vitro*.

Для цього в експерименті застосовували просту модель, відтворюючи лише основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином у кровоносному руслі реципієнта, підтримання ізоосмотичності середовища та температури інкубації 37 °С [18]. Підтримання температури 37 °С впродовж усього періоду інкубації — важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму, оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс у метаболізмі через уповільнення всіх біохімічних процесів. Таким чином, дана модель фізіологічних умов *in vitro* забезпечує точний контроль основних параметрів середовища, необхідних для виявлення пошкоджень кріоконсервованих ЯВК КК, визначення їх стабільності в залежності від використаного підходу до кріоконсервування. Окрім цього, такий відносно простий методичний підхід повинен сприяти розвитку безпечних і ефективних біомедичних

досліджень та дозволить оптимізувати трансфузійну терапію.

На першому етапі досліджень доцільно було оцінити зміни кількісних та якісних характеристик кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО ЯВК КК після годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro* (контрольні зразки) у порівнянні з аналогічними пробами, проаналізованими відразу після розмороження.

Аналіз результатів збереженості ЯВК, у тому числі ГПК, показав, що даний показник був мінімальним у зразках, кріоконсервованих із ДМСО у концентрації 2,5 % (табл. 1).

У вказаних експериментальних групах втрати абсолютної кількості клітин були значуще більшими (до двох разів), ніж відразу після розморожування. Це пов'язано, у першу чергу, з недостатньою концентрацією ДМСО для кріоконсервування. У пробах, що містили 5 % ДМСО, спостерігалось зниження показника збереженості на 30—40 % порівняно з даними після розморожування. Найбільш захищеними виявилися клітини, кріоконсервовані з ДМСО у концентрації 7,5 % (табл. 1). За даної концентрації зниження показників збереженості було менш вираженим у порівнянні з іншими експериментальними групами (2,5 та 5 % ДМСО), хоча й значуще нижчим на 25—35 % порівняно з даними відразу після розморожування.

Слід зауважити, що такий показник, як життєздатність клітин (7AAD⁻-клітини), характеризується відносністю, оскільки в кожному проаналізованому на протоковому цитофлуо-

Таблиця 1. Збереженість і життєздатність CD45⁺- та CD34⁺-клітин кордової крові, кріоконсервованих у розчинах ДМСО різної концентрації, після годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro*, %; M ± SE

Концентрація ДМСО, %	Ядровмісні клітини (CD45 ⁺)		Гемопоетичні прогеніторні клітини (CD34 ⁺)	
	Збереженість	Життєздатність	Збереженість	Життєздатність
2,5				
A	50,6 ± 4,9	50,9 ± 2,4	50,6 ± 3,2	50,4 ± 3,8
B	28,7 ± 5,0 *	76,0 ± 3,4 *	25,9 ± 2,5 *	59,7 ± 6,8
5				
A	65,2 ± 3,6	59,5 ± 3,3	73,9 ± 3,2	61,9 ± 3,2
B	38,0 ± 4,6 *	75,4 ± 2,7 *	51,2 ± 2,5 *	63,3 ± 3,6
7,5				
A	78,4 ± 3,0	67,9 ± 1,7	81,4 ± 2,9	68,9 ± 2,2
B	49,2 ± 5,0 *	74,3 ± 0,9 *	59,6 ± 9,7 *	66,7 ± 2,7

Примітка: А — дані, отримані одразу після розморожування; В — дані, отримані після кріоконсервування та годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro*; * — різниця значуща по відношенню до відповідних контрольних значень, отриманих одразу після розморожування; *p* < 0,05.

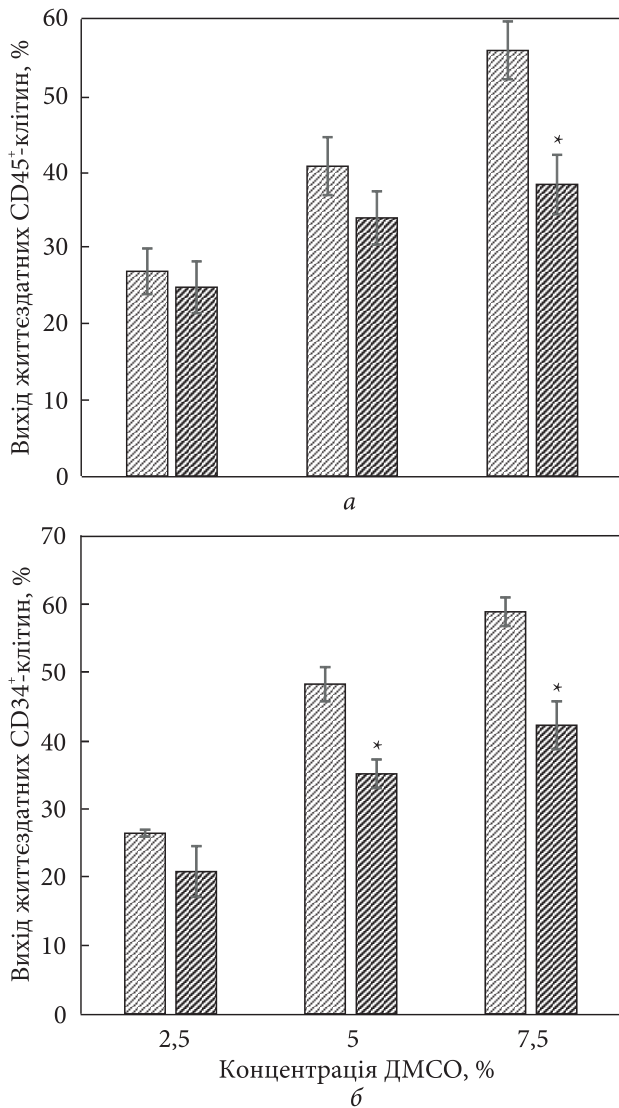


Рис. 1. Вихід життєздатних CD45⁺-клітин (а) та CD34⁺-клітин (б) після криоконсервування в розчинах ДМСО різної концентрації (▨) та перенесення до фізіологічних умов *in vitro* (▧); * — різниця значуща по відношенню до відповідної групи клітин одразу після розморожування, $p < 0,05$; $M \pm SE$

риметрі зразку будь-яка кількість клітин, що залишилася в пробі, приймається за 100%. Однак при такому аналізі кількісні показники, зокрема, абсолютна кількість клітин (втрата/руйнування клітин), не враховуються. Як видно з табл. 1, внаслідок значної руйнації під час криоконсервування, у першу чергу мертвих або пошкоджених клітин, кількість 7AAD⁻-ЯВК КК після годинної інкубації в умовах, які моделюють фізіологічні, значно перевищує кількість живих клітин, визначених відразу після розмороження. Виходячи з цього, для об'єктивної оцінки ефективності криоконсервування дос-

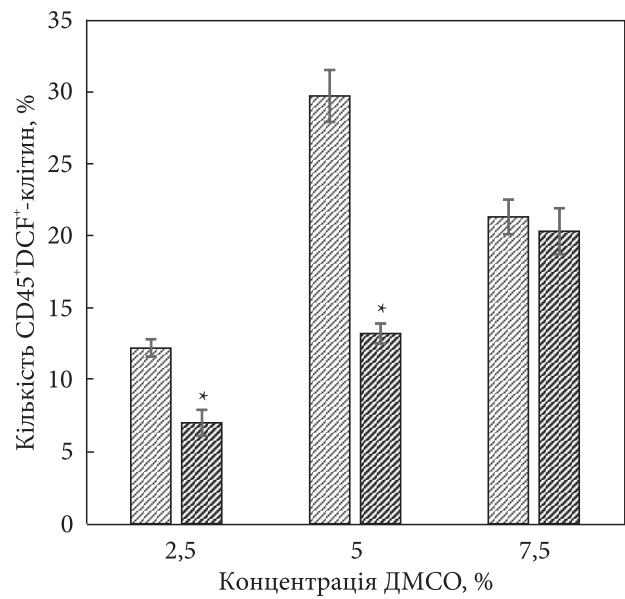


Рис. 2. Кількість ядровмісних клітин кордової крові з надлишковим вмістом АФК після криоконсервування в розчинах ДМСО різної концентрації (▨) та перенесення до фізіологічних умов *in vitro* (▧); * — різниця значуща по відношенню до відповідної групи клітин одразу після розморожування, $p < 0,05$; $M \pm SE$

ліджуваних зразків, крім контролю кількісних і якісних показників популяції ГПК, які є основними ефекторами в терапії різних захворювань, ми визначали кількість життєздатних CD45⁺-клітин у зразках по відношенню до їх початкової кількості до криоконсервування (вихід життєздатних клітин).

Отримані результати показали, що перенесення деконсервованих клітин у фізіологічні умови *in vitro* призводило до зниження виходу життєздатних ЯВК (рис. 1).

ДМСО в концентрації 2,5 % виявився не ефективним для криоконсервування, про що свідчив найнижчий вихід життєздатних клітин (до 25—28 %) по відношенню до їх початкової кількості до заморожування. При використанні 5 % ДМСО вихід життєздатних клітин після моделювання трансфузії складав у середньому 35 %. Найбільші значення даного показника після годинної інкубації в розчині Хенкса (до 47 %) фіксували після використання крио-протектора в концентрації 7,5 % (рис. 1).

На наступному етапі роботи для з'ясування ступеня залучення оксидативних процесів під час криоконсервування ЯВК КК визначали кількість клітин із надмірним вмістом АФК. Для цих досліджень було застосовано цитофлуориметричний метод з використанням дихлор-

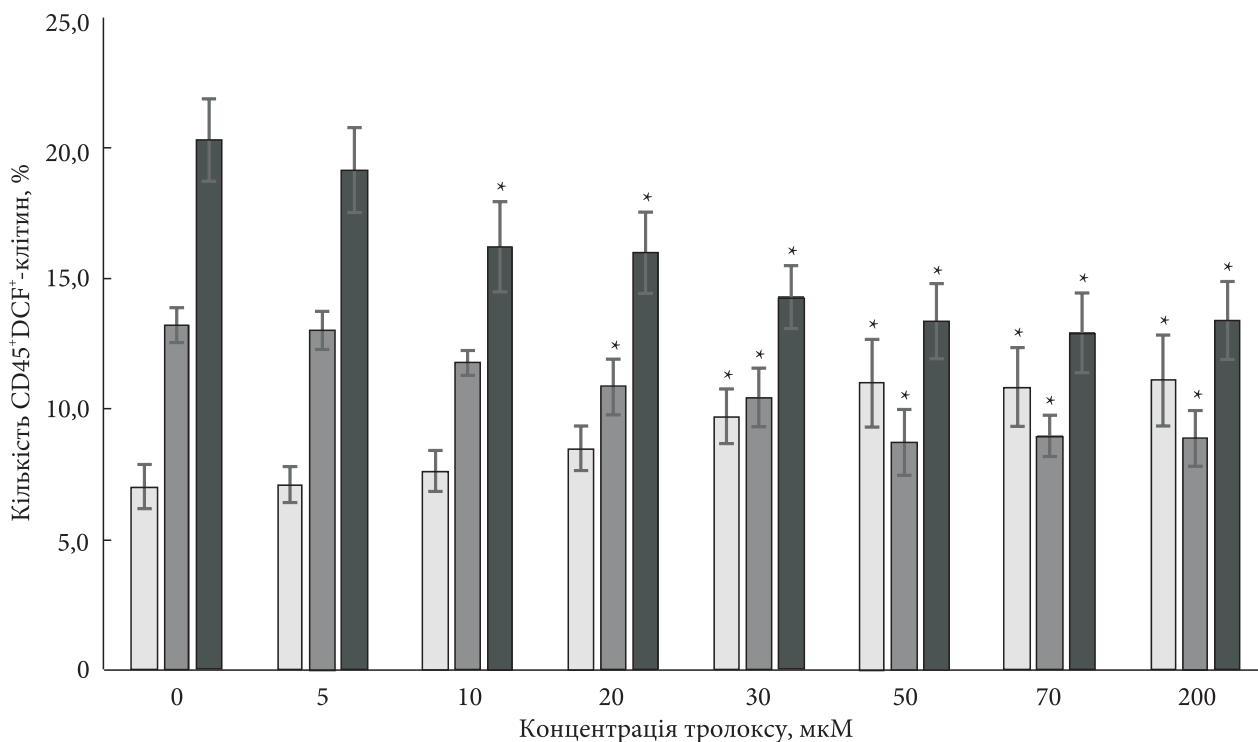


Рис. 3. Кількість ядровмісних клітин кордової крові з надлишковим вмістом АФК після криоконсервування в розчинах, що містять ДМСО і тролокс різної концентрації, та моделювання трансфузії *in vitro*: ■ — криопротекторне середовище з 2,5 % ДМСО; ■ — криопротекторне середовище з 5 % ДМСО; ■ — криопротекторне середовище з 7,5 % ДМСО; * — різниця значуща по відношенню до відповідної контрольної групи без додавання тролоксу, $p < 0,05$; $M \pm SE$

флуоресцеїн діацетату (DCFH₂-DA), який після відщеплення внутрішньоклітинною формою естерази діацильної групи втрачає здатність вільно залишати клітину, а утворений нефлуоресцентний DCFH₂ (за наявності АФК) переходить у високофлуоресцентну форму DCF, флуоресценція якого прямо пропорційно залежить від кількості внутрішньоклітинних АФК, у першу чергу перекису водню [17].

Аналіз кількості клітин із надлишковим вмістом АФК у зразках, криоконсервованих із наднизькою (2,5 %) та низькою (5 %) концентраціями криопротектора (рис. 2), продемонстрував значуще зменшення кількості CD45⁺DCF⁺-клітин приблизно у 2 рази порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування.

Ці дані, як зазначалося раніше, можна пояснити руйнуванням під час годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro* значної кількості пошкоджених клітин, що корелює з даними збереженості (табл. 1). З підвищенням концентрації ДМСО в пробах спостерігається збільшення кількості клітин із високим вмістом АФК. Це пов'язано з посиленням криопротек-

торного ефекту розчину ДМСО, який забезпечує збереженість більшої кількості клітин у пробі з вмістом криопротектора 7,5 %. Високий відсоток CD45⁺DCF⁺-клітин у пробах з 5 % ДМСО відразу після криоконсервування, ймовірно, пов'язаний з тим, що дана концентрація ДМСО здатна забезпечувати високу збереженість, проте не життєздатність клітин, і ці нестабілізовані клітини за час інкубації в розчині Хенкса руйнуються (рис. 2, табл. 1).

Таким чином, виявлена значна кількість клітин з надлишковим рівнем АФК у пробах після моделювання трансфузії *in vitro* та обумовлений цим ймовірний розвиток окисних процесів робить логічним та послідовним наступний етап досліджень — оцінку ефективності внесення антиоксидантів у криозахисні розчини з метою зменшення окисаційних процесів у клітинах та, як наслідок, підвищення рівня збереженості й життєздатності клітин після криоконсервування та годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro*. В рамках цього дослідження визначали антиоксидантну та цитопротекторну активність тролоксу.

Тролокс (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота (C₁₄H₁₈O₄)) — водорозчинна синтетична форма вітаміну Е, що є похідним токоферолу. Тролокс діє як потужний донор електронів, нейтралізуючи вільні радикали (супероксид, гідроксильний радикал, пероксильні радикали), що допомагає запобігати окиснювальному пошкодженню біомолекул [16, 20]. Після віддачі електрона тролокс перетворюється на стабільний тролокс-радикал, що знижує ймовірність його участі в ланцюгових окисних реакціях. Також показано, що тролокс ефективно інгібує пероксидацію ліпідів, захищаючи клітинні мембрани та ліпопротеїни низької щільності від окиснення [8, 10].

Виходячи з вищенаведеного, в наступній серії експериментів були проведені дослідження по визначенню впливу тролокс-вмісних кріопротекторних розчинів на стан ЯВК КК, у тому числі ГПК, після розморожування та моделювання трансфузії *in vitro*.

Визначення на першому етапі кількості ядровмісних клітин з надмірним вмістом АФК (CD45⁺DCF⁺) після годинної інкубації в розчині Хенкса є одним із ключових інтегральних параметрів оцінки стану ЯВК як під час впливу різних концентрацій кріопротектора, так і після внесення антиоксиданту. Було виявлено залежність даного показника від концентрації ДМСО, яку застосовували для заморожування клітин (рис. 3).

При використанні 2,5% ДМСО кількість DCF-позитивних клітин у тролокс-вмісних зразках збільшується у порівнянні з контролем. При концентрації антиоксиданту 30 мкМ і вище відмінності мають значущий характер. Максимальна кількість АФК фіксується у пробах, що містять 50—200 мкМ тролоксу. Таке збільшення CD45⁺DCF⁺-клітин не можна розглядати як однозначно негативне явище, оскільки, як буде продемонстровано далі, в цих зразках, незважаючи на наднизьку концентрацію ДМСО,

Таблиця 2. Збереженість і життєздатність CD45⁺- та CD34⁺-клітин кордової крові після кріоконсервування в розчинах, що містять ДМСО і тролокс різної концентрації, та моделювання трансфузії *in vitro*, %; M ± SE

Концентрація ДМСО, %	Концентрація тролоксу, мкМ	Ядровмісні клітини (CD45 ⁺)		Гемопоетичні прогеніторні клітини (CD34 ⁺)	
		Збереженість	Життєздатність	Збереженість	Життєздатність
2,5	Контроль	28,7 ± 5,0	76,0 ± 3,4	25,9 ± 2,5	59,7 ± 6,8
	5	29,5 ± 5,1	77,1 ± 2,3	25,9 ± 2,5	60,3 ± 6,6
	10	29,5 ± 5,1	76,8 ± 2,8	25,9 ± 2,5	60,4 ± 6,7
	20	30,8 ± 5,1	77,0 ± 2,8	30,0 ± 3,0	57,4 ± 6,9
	30	31,9 ± 4,7	76,4 ± 2,0	31,4 ± 2,3	58,3 ± 7,0
	50	34,1 ± 4,1	76,5 ± 3,2	35,3 ± 1,8 *	56,4 ± 6,5
	70	33,8 ± 4,0	76,7 ± 2,7	35,7 ± 2,0 *	56,0 ± 6,3
	200	33,5 ± 4,4	76,5 ± 2,9	36,1 ± 1,2 *	54,7 ± 6,8
	5	Контроль	38,0 ± 4,6	75,4 ± 2,7	51,2 ± 2,5
5		39,5 ± 4,6	76,1 ± 2,7	51,9 ± 2,4	64,2 ± 3,7
10		39,5 ± 4,6	76,6 ± 2,4	51,9 ± 2,4	64,8 ± 3,7
20		40,1 ± 4,8	76,7 ± 1,6	56,4 ± 1,2 *	63,1 ± 2,9
30		41,5 ± 4,7	77,2 ± 1,3	61,5 ± 2,8 *	61,8 ± 3,4
50		44,5 ± 4,2	76,1 ± 1,9	62,6 ± 2,4 *	62,0 ± 2,6
70		44,8 ± 4,0	75,7 ± 2,0	62,6 ± 2,4 *	62,1 ± 3,1
200		44,5 ± 4,0	75,2 ± 1,9	60,4 ± 3,0 *	61,4 ± 2,5
7,5		Контроль	49,2 ± 4,3	74,3 ± 0,9	59,6 ± 4,8
	5	50,0 ± 5,0	74,4 ± 0,6	59,6 ± 4,8	67,2 ± 2,7
	10	50,0 ± 5,0	75,2 ± 0,8	59,6 ± 4,8	68,0 ± 2,8
	20	52,8 ± 4,6	74,5 ± 0,4	65,0 ± 4,9	66,0 ± 3,1
	30	53,9 ± 4,8	75,6 ± 1,0	66,6 ± 5,3	65,2 ± 3,0
	50	59,3 ± 4,1 *	75,6 ± 0,3	71,1 ± 3,5 *	63,7 ± 3,2
	70	59,6 ± 3,9 *	74,9 ± 0,5	71,5 ± 3,1 *	64,1 ± 3,5
	200	59,6 ± 4,0 *	73,1 ± 0,6	70,5 ± 3,7 *	62,5 ± 3,2

Примітка: * — різниця значуща по відношенню до відповідної контрольної групи без додавання тролоксу, $p < 0,05$.

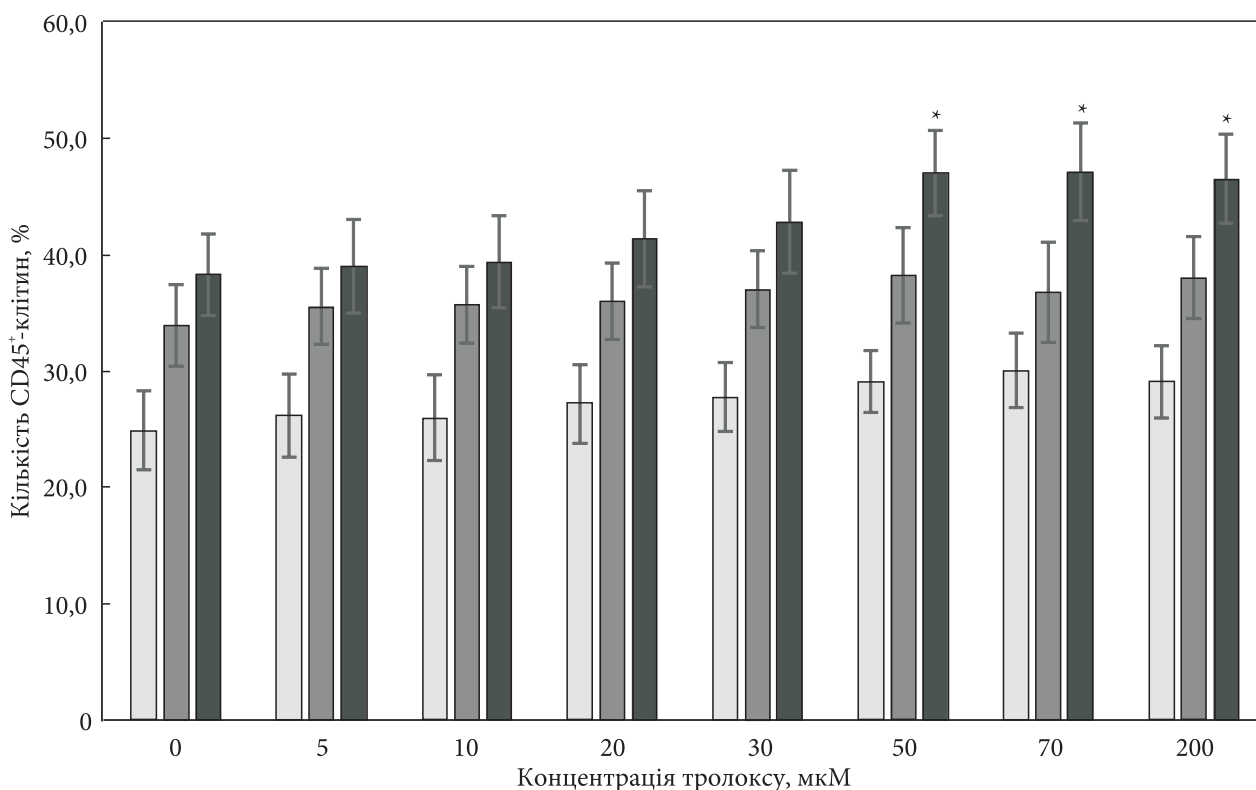


Рис. 4. Вихід живих CD45⁺-клітин після кріоконсервування в розчинах, що містять ДМСО і тролокс різної концентрації, та моделювання трансфузії *in vitro* відносно їх початкового рівня до заморожування: ■ — кріопротекторне середовище з 2,5 % ДМСО; ■ — кріопротекторне середовище з 5 % ДМСО; ■ — кріопротекторне середовище з 7,5 % ДМСО; * — різниця значуща по відношенню до відповідної контрольної групи без додавання тролоксу, $p < 0,05$; $M \pm SE$

спостерігається деяке збільшення кількості збережених клітин, хоча, можливо, вони також дестабілізовані. У пробах, що містили 5 % ДМСО (рис. 3), виявляється протилежна тенденція: зі підвищенням концентрації тролоксу в пробах зменшується кількість клітин з надмірним вмістом АФК у порівнянні з контролем, який не містив антиоксидант (мінімальна кількість АФК була в пробах з 50—200 мкМ тролоксу). У пробах, кріоконсервованих з 7,5 % ДМСО, відбуваються аналогічні зміни: значуще зниження кількості АФК вже при вмісті 10 мкМ тролоксу. Максимальний ефект проявляється в пробах із 50—70 мкМ антиоксиданту (зниження на 36,5 % порівняно з конт-рольними значеннями) (рис. 3).

Аналіз збереженості ЯВК КК після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО і тролоксу та моделювання трансфузії *in vitro* виявив виражену значущу залежність даного показника від застосованої концентрації кріопротектора (табл. 2). Встановлено, що мінімальні значення збереженості (біля 29—35 %) очікувано були у пробах, які містили 2,5 %

ДМСО, а максимальні (до 65 %) — у пробах з 7,5 % ДМСО. При застосуванні ДМСО в концентрації 5 % збереженість у пробах, що містили антиоксидант, становила до 49 %.

Аналіз впливу різних концентрацій тролоксу не виявив значущих відмінностей від свого контролю в пробах, що містили 2,5 та 5% ДМСО. В цих зразках можна говорити лише про тенденцію до збільшення кількості збережених клітин.

У пробах, кріоконсервованих у присутності 7,5 % ДМСО та тролоксу в концентрації 5—30 мкМ, спостерігалася також тенденція до росту збереженості, а значуще збільшення було в пробах з 50—200 мкМ антиоксиданту (підвищення збереженості складало від 21 до 28 %) (табл. 2).

Аналіз збереженості ГПК показав, що у пробах з 2,5 % ДМСО збереженість клітин була мінімальною і складала близько 25 % у контролі та до 37 % у пробах із антиоксидантом (табл. 2). Незважаючи на наднизьку концентрацію кріопротектора, внесення тролоксу сприяло під-

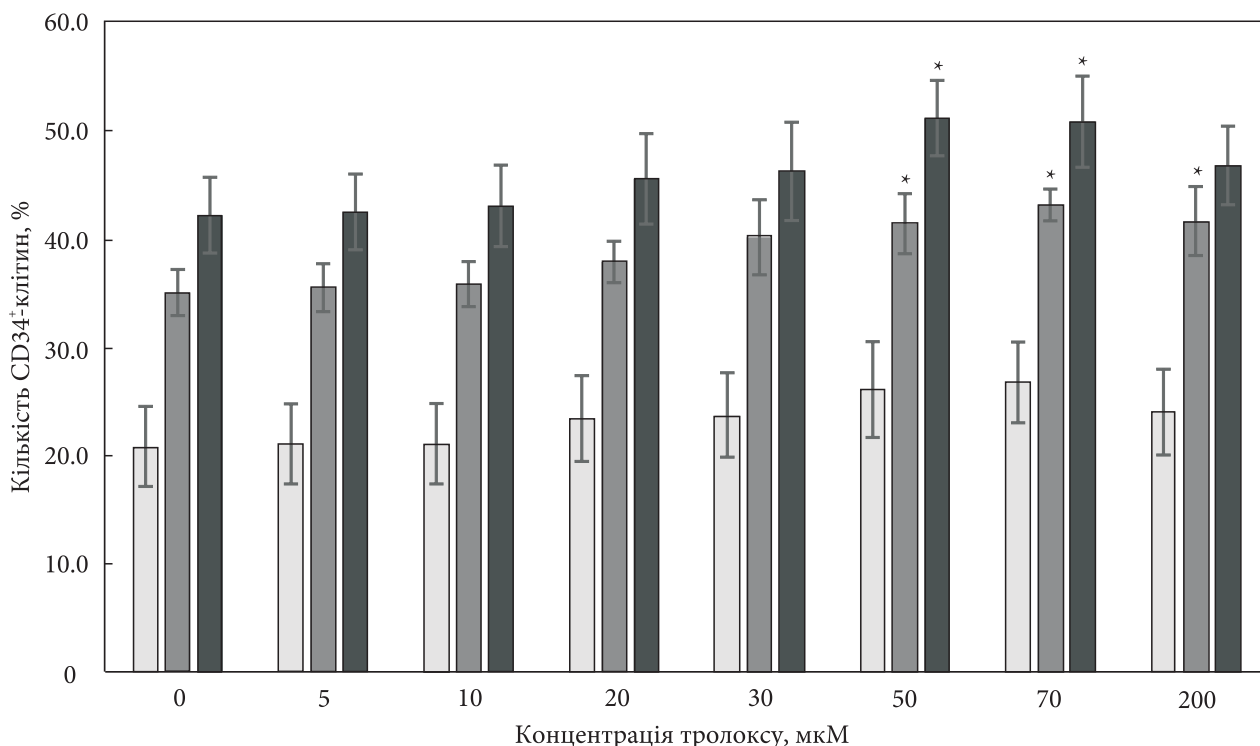


Рис. 5. Вихід живих CD34⁺-клітин після кріоконсервування в розчинах з ДМСО і тролоксом різної концентрації та моделювання трансфузії *in vitro* відносно їх початкового рівня до заморожування: ■ — кріопротекторне середовище з 2,5 % ДМСО; ■ — кріопротекторне середовище з 5 % ДМСО; ■ — кріопротекторне середовище з 7,5 % ДМСО. * — різниця значуща по відношенню до відповідної контрольної групи без додавання тролоксу, $p < 0,05$; $M \pm SE$

вищенню показника збереженості клітин (до 38 %) у даних експериментальних умовах, при цьому значущі відмінності спостерігалися в пробах з 50—200 мкМ тролоксу. Збільшення концентрації кріопротектора у середовищі заморожування до 5 % забезпечувало підвищення показника збереженості практично у 2 рази порівняно з 2,5 % ДМСО (до 62,6 % у тролокс-вмісних пробах). Значущі відмінності фіксувалися вже при концентрації антиоксиданту у пробі 20 мкМ. Максимальне підвищення показника збереженості (на 22 %) було у пробах з 50—70 мкМ тролоксу. У пробах, кріоконсервованих з 7,5 % ДМСО, спостерігалася максимальна збереженість клітин (до 74 %) при вмісті тролоксу в концентрації 50—200 мкМ.

Таким чином, отримані результати демонструють, що збереженість ГПК дещо перевищує таку ЯВК КК, особливо за оптимальних концентрацій кріопротектора та антиоксиданту. Даний факт свідчить про більшу їх стійкість до криогенних впливів.

Аналіз життєздатності ЯВК, у тому числі ГПК, КК за методом протокової цитофлуориметрії не

виявив значущих змін серед усіх досліджуваних експериментальних груп (табл. 2). Даний параметр складав близько 75 % для ЯВК, та 65 % для ГПК. Оскільки ці результати не дають повного уявлення про кількість живих клітин, які зберігаються у пробах після процедури кріоконсервування і подальшого моделювання трансфузії *in vitro*, та не враховують збереженість клітин, визначали вихід живих CD34⁺ 7AAD⁻ та CD45⁺ 7AAD⁻-клітин. Даний підхід дозволяє враховувати показники як відносної життєздатності клітин (описано вище), так і їх абсолютної кількості у пробі, за яким можна визначити ефективні кріопротекторні розчини, що здатні стабілізувати клітини та підвищити їх стійкість до факторів кріоконсервування.

Результати досліджень показали, що вихід живих CD45⁺-клітин після кріоконсервування в розчинах з 2,5 і 5 % ДМСО та тролоксом різної концентрації, а також моделювання трансфузії *in vitro* має лише тенденцію до підвищення порівняно з контролем. Слід зазначити, що кріоконсервування у розчинах з 5 % ДМСО забезпечувало значуще більший (у середньому на 35 %)

вихід живих клітин порівняно з 2,5 % ДМСО (рис. 4). Аналіз виходу живих клітин у пробах з 7,5 % ДМСО та тролоксом показав, що внесення антиоксиданту в концентрації 5—30 мкМ покращувало цей параметр, проте дані значуще не відрізнялися від контролю. При цьому концентрації тролоксу 50—200 мкМ забезпечували значуще збільшення виходу живих клітин на 23 % порівняно з контролем (рис. 4).

Виражені зміни виходу кількості живих клітин спостерігалися при аналізі ГПК. Якщо внесення тролоксу в досліджуваних концентраціях у зразки з 2,5 % ДМСО не призводило до значущих змін, то вихід живих ГПК у пробах, кріоконсервованих із 5 % ДМСО, був значущо вищим порівняно з контролем у зразках із 50—200 мкМ тролоксу (рис. 5).

Значний ефект від внесення тролоксу також спостерігався в зразках, що містили 7,5 % ДМСО та 50—70 мкМ антиоксиданту. У цих пробах вихід живих клітин був на 20 % більшим за контроль, в який не вносили антиоксидант. Також необхідно відзначити, що вихід живих ГПК у пробах, що містили 7,5 % ДМСО, був найвищим і складав до 55 % в тролокс-вмісних середовищах (50—70 мкМ). Одержані дані свідчать про те, що вихід живих ГПК після кріоконсервування стабільно перевищує вихід CD45⁺-клітин, особливо за оптимальних концентрацій кріопротектора та антиоксиданту. Це також вказує на їхню вищу кріостійкість, імовірно, пов'язану з більшою толерантністю до осмотичних змін та оксидативного стресу в умовах заморожування-відігрівання.

Отже, проведене дослідження підтвердило важливість комбінованого підходу до кріокон-

сервування клітин КК, який передбачає поєднане використання антиоксиданту тролоксу та ДМСО. Даний підхід суттєво підвищує збереженість і життєздатність клітин після розморожування, зменшує негативні наслідки оксидативного стресу та відкриває нові перспективи для підвищення ефективності клітинної терапії та регенеративної медицини. Отримані результати можуть бути основою для подальшої оптимізації методів довгострокового зберігання клітин з метою успішного застосування в клінічній практиці.

ВИСНОВКИ

Інкубація протягом години деконсервованих ЯВК КК у фізіологічних умовах *in vitro* знижує показники збереженості та життєздатності ЯВК, у тому числі ГПК, порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування, що може бути спричинено руйнуванням частини клітин з високим вмістом АФК.

Встановлено, що кріоконсервування ЯВК під захистом 7,5 % ДМСО та з додаванням водорозчинного аналогу вітаміну Е — тролоксу у концентрації 50—70 мкМ забезпечувало зниження кількості клітин із високим вмістом АФК та дозволяло зберігати на 13—25 % більше життєздатних ЯВК, включно з ГПК, після годинної інкубації в фізіологічних умовах *in vitro* порівняно з контрольними зразками, в які не вносили антиоксидант.

Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення чинних підходів до розрахунку ефективної дози клітинних препаратів кордової крові шляхом обчислення коефіцієнта втрати клітин при введенні до організму реципієнта.

REFERENCES

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. Пушкарь НС, Белоус АМ. Введение в кріобіологію. Київ: Наукова Думка; 1975. 343 с.
3. Пушкарь НС, Капрельянц АС, Панков ЕЯ. Ультраструктура клетки при низких температурах. Київ: Наукова Думка; 1978; 140 с.
4. Allan DS. Using umbilical cord blood for regenerative therapy: proof or promise? *Stem Cells*. 2020; 38(5): 590—5.
5. Baust JM, Vogel MJ, Buskirk RV, et al. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant*. 2001; 10: 561—71.
6. Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, et al. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert. Opin. Biol Ther*. 2017; 17(6): 691—9.
7. Davis JM, editor. Basic cell culture. A practical approach. Oxford: Oxford University Press; 2002. 382 p.
8. Distelmaier F, Valsecchi F, Forkink M. Trolox-sensitive reactive oxygen species regulate mitochondrial morphology, oxidative phosphorylation. *Antioxid Redox Sign*. 2012; 17: 1652—69.

9. Fry LJ, Querol S, Gomez SG, et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox Sang.* 2015; 109(2): 181—90.
10. 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 (Basel).* 2020; 9: 1058—69.
11. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(8): 627—33.
12. Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and future perspectives for the cryopreservation of cord blood stem cells. *Transfus Med Rev.* 2021; 35(2): 95—102.
13. Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to minimize various stress-related freeze-thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Biopreserv Biobank.* 2019; 17(6): 603—12.
14. Mancías-Guerra C, Sánchez-García S, Carreño-Salcedo S, et al. Dimethyl sulfoxide toxicity in umbilical cord blood transplantation in patients less than 4.5 kilos of weigh. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2023; 45(1): 106—9.
15. 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.
16. Nekoonam S, Shabani M, Naji M. Effect of trolox on sperm quality in normozospermia and oligozospermia during cryopreservation. *Cryobiology.* 2016; 72(2): 106—11.
17. Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells.* 2010; 29(6): 539—49.
18. Scott KL, Lecal J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: past, present and future. *Transfus Med Rev.* 2005; 19(2):127—42.
19. Sun JM, Kurtzberg J. Cord blood for brain injury. *Cytotherapy.* 2015; 17(6): 775—85.
20. 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.
21. Zubov PM, Zubova OL, Babijchuk LO. Trolox antioxidant as a factor in stabilization of human cord blood nucleated cells during cryopreservation. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2023; 33(2): 122—32.

Отримано 05.02.2025

Прийнято до друку 19.06.2025

P.M. Zubov, O.L. Zubova

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

* pmzubov@gmail.com

ANTIOXIDANT PROTECTION IN CRYOPRESERVATION:

THE ROLE OF TROLOX IN PRESERVING HUMAN CORD BLOOD NUCLEATED CELLS

The paper presents experimental data on determining quantitative and qualitative characteristics of human cord blood (CB) nucleated cells (NCs), including hematopoietic progenitor cells (HPCs), after cryopreservation in solutions with different concentrations of DMSO and antioxidant Trolox and *in vitro* transfusion simulation. Our findings showed that the incubation of frozen-thawed cord blood NCs for an hour under *in vitro* physiological conditions caused a decrease in their survival and viability compared to the data obtained immediately after thawing. These changes are likely due to the destruction of some cells, contained high level of reactive oxygen species (ROS) because of mechanical and metabolic injuries caused by freeze-thawing factors. The supplement of antioxidant Trolox at concentrations of 50 or 70 μM to the cryoprotective DMSO-containing medium at equilibration stage promotes the reduction of cells with excessive ROS content and increases their survival and viability both after thawing the cell suspension and after transferring to *in vitro* physiological conditions. The results obtained for determining the delayed cell survival demonstrate the efficiency of using antioxidant Trolox and the prospects for developing Trolox-containing cryoprotective mixtures for freezing cord blood NCs, including HPCs, and may become a prerequisite for improving the existing approaches and developing the new ones to their cryopreservation and long-term storage in low-temperature banks.

Key words: cryopreservation, dimethyl sulfoxide, cord blood, nucleated cells, antioxidant Trolox, *in vitro* transfusion simulation.