

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-384-388

УДК 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

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

### АНАЛІЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З ДМСО І АНТИОКСИДАНТАМИ ТА ПЕРЕНЕСЕННЯ ДО УМОВ, ЩО МОДЕЛЮЮТЬ ФІЗІОЛОГІЧНІ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

Olena.makashova@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дана робота виконана у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи відділу кріоцитології «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровмісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур», № державної реєстрації 0114U001320.

**Вступ.** Використання гемопоетичних прогеніторних клітин (ГПК) кордової крові (КК) людини міцно увійшло в практичну медицину розвинутих країн світу як ефективний метод лікування патологій крові, імунної системи, порушень обміну речовин, онкологічних та інших захворювань [5]. Завдяки її унікальним властивостям, відносній простоті та безпеці заготівлі, КК стала одним із найбільш затребуваних джерел ГПК [12]. Щорічно кількість проведених трансплантацій збільшується, а показання до даного виду терапії розширюються. Підвищення частоти застосування КК в клінічній практиці зумовили необхідність створення її запасів і тривалого зберігання. Розрив у часі між моментом заготівлі КК і введенням її в організм реципієнта визначає необхідність застосування технологій, що дозволяють зберігати матеріал в біологічно повноцінному стані. Вирішення цього завдання можливе лише при довгостроковому зберіганні КК в замороженому стані [3]. Існуючі протоколи низькотемпературного консервування ГПК засновані на використанні проникаючого кріопротектора ДМСО в різних концентраціях. Проте відомо, що під час кріоконсервування спостерігається пригнічення роботи антиоксидантної системи, порушення впорядкованості структури мембрани та вихід глутатіону з органел, що призводить до збільшення рівня АФК у клітинах після перенесення їх у кровеносне русло та розвитку переокисного окислення ліпідів [9]. До того ж, існують припущення, що в початковий період після відігрівання рівень ПОЛ лімітується структурними антиоксидантами глутатіонпероксидазної системи. У зв'язку з цим, для підвищення ефективності кріоконсервування препаратів кордової крові важливим завданням є не тільки проведення їх оцінки відразу після розморожування, а

й визначення відстроченого виживання клітин після перенесення до фізіологічних умов, а додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів може знизити інтенсивність утворення АФК при кріоконсервуванні та розвиток негативних процесів в клітинах [6].

Виходячи з цього, **метою роботи** було проаналізувати структурно-функціональний стан ГПК КК, кріоконсервованих у захисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та антиоксидантів, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

**Об'єкт і методи досліджень.** У роботі використовували КК людини, збір якої проводили після отримання інформованої згоди у вагітної, з попереднім проведенням ретельного допологового скринінгу на наявність протипоказань до донорства. Експузію крові здійснювали закритим шляхом у систему для забору крові з 25 мл антикоагулянту з пупкової вени під час природних пологів після народження дитини й відділення її від плаценти.

Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біофарма», Україна) з молекулярною масою 60000). Для цього спочатку до крові додавали поліглюкіні у співвідношенні 1:1, потім відстоювали до чіткого розподілу еритроцитарного шару та фракції ядровмісних клітин. Час седиментації складав від 30 до 50 хв, після чого супернатант відбирали та центрифугували протягом 5-7 хв. при 1000 об/хв для отримання концентрату ЯВК.

У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій у пробі 5; 7,5 та 10%. Суспензії клітин обробляли кріопротектором при низькій позитивній температурі (0–4°C). Перед змішуванням суспензію клітин і розчини кріопротектора доводили до відповідних температур; ДМСО додавали крапельно при постійному перемішуванні.

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

Зразки кріоконсервували в програмному заморозувачі «Cryoson» (Німеччина) зі швидкістю 1–3 град/хв до –80°C з наступним зануренням у рідкий

Таблиця.

**Збереженість та життєздатність гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні, %**

| Конц. ДМСО, % |   | Гемопоетичні прогеніторні клітини (CD34 <sup>+</sup> ) |                |
|---------------|---|--|----------------|
|               |   | Збереженість   | Життєздатність |
| 5             | А | 70,1±2,4   | 80,1±3,2       |
|               | Б | 41,2±3,1*  | 50,2±2,4*      |
| 7,5           | А | 78,3±3,1   | 82,6±2,4       |
|               | Б | 59,8±2,2*  | 65,4±1,9*      |
| 10            | А | 79,1±2,9   | 81,4±2,1       |
|               | Б | 62,3±1,5*  | 61,8±2,7*      |

**Примітка:** Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE. А – дані, отримані одразу після розморожування; Б – дані, отримані після кріоконсервування та перенесення до умов, що моделюють фізіологічні;

\* – різниця статистично значуща по відношенню до контрольних значень, отриманих одразу після розморожування; p<0,05.

азот (-196°C) [1]. Відігрівання здійснювали за температури 37–40°C на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази.

Абсолютну кількість клітин підраховували в камері Горяєва згідно зі стандартної методики [7]. Збереженість клітин визначали як відсоток кількості клітин у досліджуваному зразку по відношенню до початкової їх кількості до будь-якого впливу (інкубація з кріопротектором, заморожування-відігрів).

Життєздатність CD34<sup>+</sup>-клітин оцінювали за стандартним протоколом ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) з використанням моноклональних антитіл CD45FITC, CD34PE і ДНК-барвника 7-аміноактиноміцину D (7AAD) [15] методом проточної цитофлуориметрії. Для цього до 50 мкл цільної крові додавали по 10 мкл реагентів. Перемішували й інкубували 15 хв за кімнатної температури в темряві. Для лізису еритроцитів до кожної пробірки додавали 1 мл розчину хлориду амонію («BD», США). Аналізували проби за допомогою програмного забезпечення «CELLQuest Proc («BD»).

Моделювання трансфузії проводили шляхом перенесення клітин у розчин Хенкса і інкубації їх при 37°C протягом години. Розведення складало 1:10. Після інкубації клітинної суспензії в розчині Хенкса проводили центрифугування при 1000 об/хв (ОПН-3) протягом 5 хв з подальшим видаленням супернатанту.

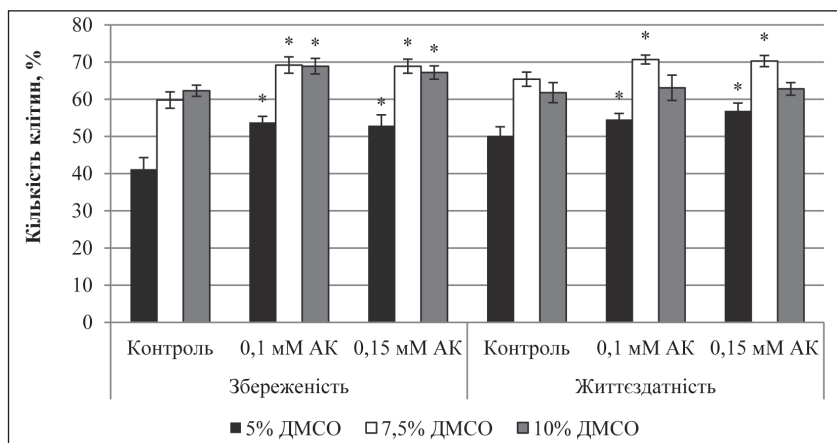
Статистичну обробку результатів проводили методом Стью-

дента-Фішера з використанням програми «Excel» («Microsoft Office», США), після встановлення нормальності розподілу. Дані представлено як M±m. Відмінності вважали статистично значущими при p<0,05.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Оскільки в наших роботах [2, 10] було показано, що під час кріоконсервування ядровмісні клітини, складаючи значному окисному стресу, що в подальшому може призвести до зниження ефективності препаратів КК, нами була проведена оцінка відстроєності збереженості та життєздатності клітин після розморожування. Для цього ми застосували підхід із моделювання трансфузії. В експерименті застосували просту модель, відтворюючи лише основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином у кровоносному руслі реципієнта, ізоосмотичність середовища та температуру інкубації (37°C). Підтримання температури 37°C протягом усього періоду інкубації клітин — важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму, оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс у клітинному метаболізмі в силу уповільнення практично всіх процесів зі зниженням температури. При моделюванні трансфузії було прийнято 10-кратне розведення суспензії кріоконсервованих ЯВК.

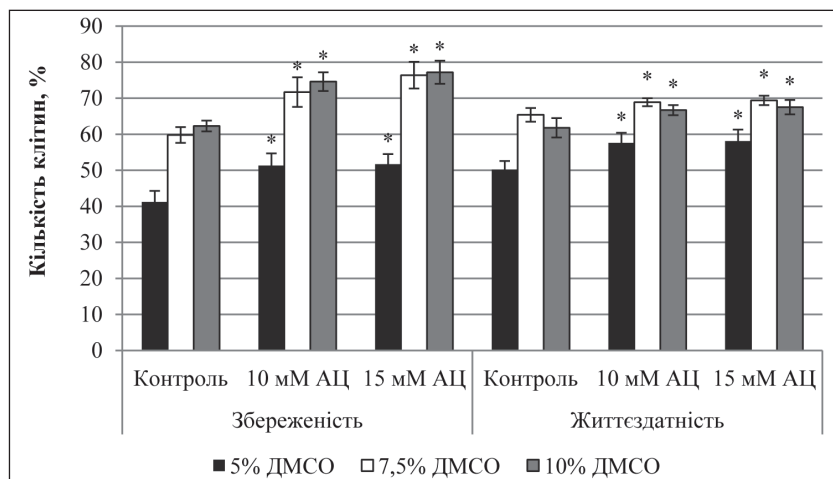
Таким чином, дана модель умов, що моделюють фізіологічні, забезпечує контроль основних параметрів середовища для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК.

Отримані результати після годинної інкубації показали, що найбільші показники збереженості та життєздатності ГПК були у пробах із ДМСО в концентраціях 7,5% та 10%, хоча й у даних групах спостерігалось достовірне зниження даних показників на 20% порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування (**табл.**). У пробах, кріоконсервованих із 5% ДМСО, життєздатність була на рівні 50%.



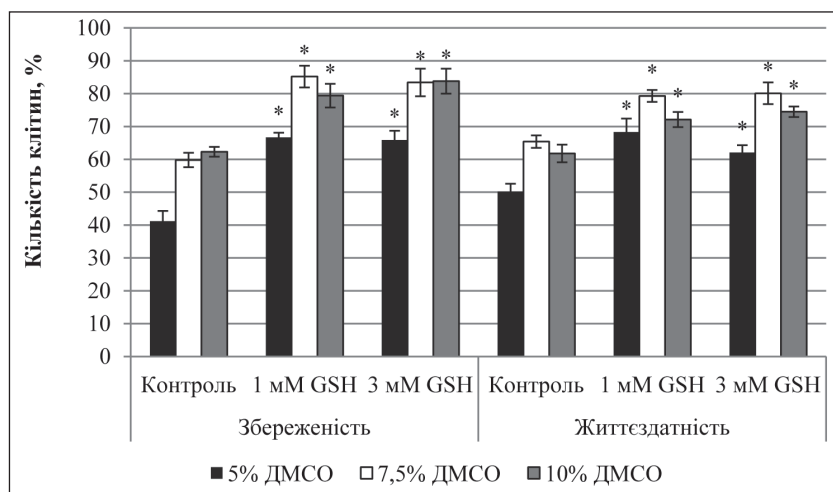
**Рис. 1. Збереженість та життєздатність гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО і аскорбінової кислоти, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.**

**Примітка:** Дані представлено у відсотках, у вигляді M±SE. \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта; p<0,05.



**Рис. 2.** Збереженість та життєздатність гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО і N-ацетил-L-цистеїна, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

**Примітка:** Дані представлено у відсотках, у вигляді  $M \pm SE$ . \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта;  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.** Збереженість та життєздатність гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові, кріоконсервованих в розчинах із різною концентрацією ДМСО і глутатіону, після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

**Примітка:** Дані представлено у відсотках, у вигляді  $M \pm SE$ . \* – різниця статистично значуща по відношенню до відповідних контрольних значень без додавання антиоксиданта;  $p < 0,05$ .

У зв'язку з цим, доцільно було провести дослідження з оцінки ефективності внесення антиоксидантів у кріозахисні розчини з метою запобігання розвитку окисного стресу в клітинах після кріоконсервування.

Існують дані, що під час кріоконсервування аскорбінова кислота (АК) покращує кріотолерантність клітин та підвищує проліфераційну та мітохондріальну активність, а також експресію генів антиоксидантних ферментів СОД і глутатіонпероксидази та значно знижує рівні внутрішньоклітинного пероксиду [4]. Інші дані свідчать, що високі концентрації АК індукують потік  $H_2O_2$  в присутності іонів каталітичного металу, що призводить до окислювального стресу в клітинах та апоптозу [14]. Тому при використанні

АК необхідно ретельно підбирати її концентрацію.

Аналіз даних щодо збереженості  $CD34^+$ -клітин після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні, показав достовірне збільшення рівня досліджуваного показника в усіх досліджуваних зразках із концентраціями АК 0,1 та 0,15 мМ (рис. 1). Це може бути пов'язано напряду з антиоксидантним ефектом даної кислоти, який обумовлений перехопленням АФК і їх відновленням [8]. Причому важливо відзначити, що додавання даної біологічно активної речовини до ДМСО у низькій концентрації (5%) також здатне підвищити збереженість ГПК навіть після перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні. Аналіз кількості життєздатних ГПК (рис. 1) показав, що збільшення даного показника на 4-6% спостерігалось в групах, які були кріоконсервовані під захистом ДМСО в концентрації 5 та 7,5% у комбінації з аскорбіновою кислотою в концентрації 0,1 і 0,15 мМ.

Дані літератури показують, що N-ацетил-L-цистеїн (АЦ) здатен значно знизити рівень АФК, запобігти зниженню мітохондріального мембранного потенціалу та життєздатності, захистити від апоптотичних змін у клітинах, а також зменшити перекисне окислення ліпідів після кріоконсервування [11]. Тому наступним антиоксидантом, який було використано в роботі став N-ацетил-L-цистеїн. Аналіз даних, отриманих після перенесення ГПК, кріоконсервованих під захистом ДМСО та антиоксиданта АЦ у концентрації 10 мМ та 15 мМ, до умов, що моделюють фізіологічні (рис. 2), продемонстрував достовірне

підвищення рівня збереженості в усіх експериментальних групах та, особливо в пробах із ДМСО в концентрації 7,5% ( $71,7\% \pm 4,1$  та  $76,4\% \pm 3,7$ ) і 10% ( $74,6\% \pm 2,6$  та  $77,2\% \pm 3,2$ ).

Застосування розчинів (10 та 15 мМ) даного антиоксиданту сприяло збільшенню рівня життєздатності в усіх пробах. Додавання даних концентрацій до 7,5 та 10% ДМСО здатне зберегти в життєздатному стані до 70%  $CD34^+$ -клітин, а в групах із 5% ДМСО – до 57%.

Оскільки важливою складовою антиоксидантного захисту є система глутатіону, що нейтралізує перекиси ліпідів і підтримує у відновленому стані SH-групи білків, забезпечуючи їх функціональну активність [13], на наступному етапі було досліджено

вплив глутатіону на відстрочену в часі загибель деконсервованих гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові.

Аналіз збереженості CD34<sup>+</sup>-клітин після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні, продемонстрував підвищення рівня даного параметра у групах, кріоконсервованих із додаванням глутатіону (рис. 3). Використання глутатіону у концентраціях 1 та 3 мМ у комбінації з ДМСО в концентраціях 7,5% і 10% дозволяло зберігати до 85% CD34<sup>+</sup>-клітин в життєздатному стані, що на 25% більше порівняно з контрольними значеннями. Слід зазначити, що результати кріоконсервування CD34<sup>+</sup>-клітин в розчинах, що містять 5% ДМСО та ефективні концентрації глутатіону були на рівні даних, отриманих із загальноживаними концентраціями ДМСО (7,5% і 10%) без застосування антиоксиданту.

**Висновки.** Отримані результати свідчать про те, що інкубація протягом години деконсервованих ГПК в умовах, що моделюють фізіологічні, призводить до зниження показників збереженості й життєздатності порівняно з даними, отриманими одразу після кріоконсервування. Тобто, стан клітин, визначений

одразу після розморожування не може дати повну оцінку якості препаратів кордової крові.

Додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів забезпечувало достовірне підвищення збереженості та життєздатності ГПК. При цьому додавання аскорбінової кислоти до проб з 7,5-10% ДМСО підвищувало кількість життєздатних клітин до 62-70%, використання АЦ – до 66-70%. Найбільший цитопротекторний ефект мав глутатіон, який сприяв підвищенню рівня збереженості та життєздатності ЯВК КК до 80-85% після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

**Перспективи подальших досліджень.** Оскільки надлишкове накопичення АФК в клітинах здатне привести до подальшої загибелі клітин шляхом апоптозу або некрозу, доцільно буде провести дослідження впливу антиоксидантів на кількість ядромісних клітин, до складу яких входять гемопоетичні прогеніторні клітини, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування з ДМСО та перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні.

### Література

1. Armitage S. Cord blood banking standards: autologous versus altruistic. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:94.
2. Babijchuk LA, Makashova EE, Zubova OL, Zubov PM. Evaluation of the antioxidant properties of ascorbic acid at cryopreservation of cord blood nucleated cells with DMSO. *Transplantation – present, past and future*; 2014 Nov 7; Kyiv. *Klitynna ta organa transplantologiya*. 2015;2(2):166.
3. Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005;105:3786-92.
4. Castillo-Martín M, Bonet S, Morató R, Yeste M. Supplementing culture and vitrification-warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. *Cryobiology*. 2014;68(3):451-8.
5. Chakraborty SK, Banu LA, Rahman MF, Paul S. Cord blood stem cells – a dream for future medicine. *Mymensingh Med J*. 2014;23(3):614-20.
6. Cheng H, Gao Y, Shi M, Hu L. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood*. 2014;124(20):45-8.
7. Davis JM, editor. *Basic cell culture. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford; 2002. 382 p.
8. Garcia-Krauss A, Ferrada LA, Astuya N, Salazar K, Cisternas P, Martinez F, et al. Dehydroascorbic acid promotes cell death in neurons under oxidative stress: a protective role for astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):5847-63.
9. Maeshima Y, Makino H. Molecular mechanism of cell injury. *Contrib Nephrol*. 2003;139:32-43.
10. Mykhailova OY, Makashova OY, Zubov PM, Babijchuk LA. Improving of cryoprotectant media for human cord blood nucleated cells cryopreservation. *IIR Workshop on cold Applications in Life Sciences*; 2016 Sept 8-9; Dresden; 2016. p. 131-4.
11. Partyka A, Niżański W, Bajzert J, Lukaszewicz E, Ochota M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology*. 2013;67(2):132-6.
12. 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 Haematol*. 2009;147(2):262-74.
13. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:1191-212.
14. Wang L, Luo X, Li C, et al. Triethylenetetramine synergizes with pharmacologic ascorbic acid in hydrogen peroxide mediated selective toxicity to breast cancer cell. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3481710.
15. Zemruski NC, Schmid I, Stache V, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*. 2012;429(1):79-81.

### АНАЛІЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ГЕМОПОЕТИЧНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ З ДМСО І АНТИОКСИДАНТАМИ ТА ПЕРЕНЕСЕННЯ ДО УМОВ, ЩО МОДЕЛЮЮТЬ ФІЗІОЛОГІЧНІ

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

**Резюме.** У роботі проведено порівняльний аналіз впливу кріопротекторних сумішей, що містять різні концентрації проникаючого кріопротектора ДМСО та антиоксидантів, при кріоконсервуванні гемопоетичних прогеніторних клітин кордової крові людини та після перенесення їх до умов, наближених до фізіологічних. Показано, що додавання до кріозахисного середовища аскорбінової кислоти, N-ацетил-L-цистеїна або глутатіону сприяє підвищенню показників збереженості та життєздатності гемопоетичних прогеніторних клітин після перенесення їх до умов, що моделюють фізіологічні. Найбільший цитопротекторний ефект спостерігається в пробах, кріоконсервованих із 7,5 і 10% ДМСО з додаванням глутатіону в концентрації 1 та 3 мМ, де зберігається до 80% гемопоетичних клітин в життєздатному стані, порівняно з двома іншими антиоксидантами в оптимальних концентраціях, які забезпечують життєздатність клітин до 70%.

**Ключові слова:** гемопоетичні прогениторні клітини кордової крові, криоконсервування, ДМСО, аскорбінова кислота, N-ацетил-L-цистеїн, глутатіон.

### **АНАЛИЗ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ С ДМСО И АНТИОКСИДАНТАМИ И ПЕРЕНОСЕНИЯ В УСЛОВИЯ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ**

**Макашова Е. Е., Зубова О. Л., Зубов П. М., Бабийчук Л. А.**

**Резюме.** В работе проведен сравнительный анализ влияния криопротекторных смесей, содержащих различные концентрации непроникающего криопротектора ДМСО и антиоксидантов, при криоконсервировании гемопоэтических прогениторных клеток кордовой крови и после переноса их в условия, приближенные к физиологическим. Показано, что добавление к криозащитной среде аскорбиновой кислоты, N-ацетил-L-цистеина или глутатиона способствует повышению показателей сохранности и жизнеспособности гемопоэтических прогениторных клеток после переноса их в условия, моделирующие физиологические. Наибольший цитопротекторный эффект наблюдается в пробах, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО с добавлением глутатиона в концентрации 1 и 3 мМ, где сохраняется до 80% гемопоэтических клеток в жизнеспособном состоянии, по сравнению с двумя другими антиоксидантами в оптимальных концентрациях, которые обеспечивают жизнеспособность только до 70% клеток.

**Ключевые слова:** гемопоэтические прогениторные клетки кордовой крови, криоконсервирование, ДМСО, аскорбиновая кислота, N-ацетил-L-цистеин, глутатіон.

### **ANALYSIS OF THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF HUMAN CORD BLOOD HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS AFTER CRYOPRESERVATION WITH DMSO AND ANTIOXIDANTS AND TRANSFER TO CONDITIONS CLOSE TO PHYSIOLOGICAL**

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

**Abstract.** The use of cord blood (CB) hematopoietic progenitor cells (HPCs) for the past 15 years has been firmly establishing in practical medicine as an effective treatment for diseases of various origins. In this regard, it remains relevant for the development of protocols for cells storage at low temperature. Most of them are based on the use of penetrating cryoprotectant DMSO in effective concentrations. However, they do not take into account that during cryopreservation HPCs are subjected to a significant stress, resulting in the decrease of the antioxidant system work, disruption of the membrane structure and the glutathione release from the organelles, which leads to an increase in the level of ROS in cells after transferring them to the bloodstream and the development of lipid peroxidation. In addition, there are suggestions that in the initial period after warming, the level of lipid peroxidation is limited by the structural antioxidants of the glutathione peroxidase system.

In this regard, to increase the efficiency of cryopreservation of cord blood preparations, an important task is not only to evaluate them immediately after thawing, but also to determine the delayed survival of cells after transport them to conditions close to physiological. The addition of antioxidants to the cryoprotective medium can improve the preservation rate and viability of HPCs both immediately after cryopreservation and after transfer to conditions that are close to physiological.

Based on this, the aim of the work was to analysis of the structural and functional state of human cord blood hematopoietic progenitor cells after cryopreservation with cryoprotectant DMSO and antioxidants and transfer to conditions close to physiological

The efficacy of ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine and glutathione application in combination with DMSO in cryopreservation of HPCs has been evaluated. It has been shown that in the process of cryopreservation with DMSO and after transferring to conditions that are close to physiological, the preservation and viability of HPCs decreases on 20% in the samples, cryopreserved with 7.5-10% DMSO. One of the reasons for this may be the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells during freezing. The addition of antioxidants to the cryoprotective medium can significantly increase the stability of the HPCs against the effects of cryopreservation factors and improve the preservation and viability indices. A comparative analysis of antioxidants revealed that ascorbic acid at concentrations of 0.1 and 0.15 mM and N-acetyl-L-cysteine (10 and 15 mM) in combination with 7.5% and 10% DMSO increased the number of preserved viable HPCs up to 70% in comparison to the samples without adding the antioxidants. Addition of glutathione at a concentration of 1 and 3 mM to cryoprotective medium with 7.5% and 10% DMSO was able to maintain a viable state of up to 80% of the HPCs. This may be due to the fact that glutathione reduced the number of cells with excess content of ROS after transferring the cells to conditions that are close to physiological.

**Key words:** cord blood hematopoietic progenitor cells, cryopreservation, DMSO, ascorbic acid, N-acetyl-L-cysteine, glutathione.

*Рецензент – проф. Міщенко І. В.  
Стаття надійшла 27.01.2018 року*