холод в биологии и медицине
актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии
40

# Тезисы 40-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 23–24 мая 2016 г., г. Харьков


*Муценко В.В., Гришков А.П., Рогульская Е.Ю., Петренко Ю.А.* Предобработка сахарозой повышает криоустойчивость мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных на двух- и трехмерных носителях ..... 158
*Мартынова Ю.В., Бабийчук В.Г.* Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (–120°С) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс ..... 159
*Пуговкин А.Ю., Кононенко И.С., Кононенко Р.В., Буцкий К.И., Черепнин В.А., Копейка Е.Ф.* Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды ..... 160
*Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н., Останков М.В.* Влияние криоконсервирования на экспрессию stemness-генов в клетках фетальной печени мышей ..... 161
*Буркова В.В.* Хранение штаммов вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS при низких температурах под защитой криопротекторов ..... 162
*Огурцова В.В.* Коефіцієнти проникності мембран ентероцитів миші для води та кріопротекторів ..... 163
*Тарусин Д.Н., Муценко В.В., Зайков В.С.* Причины толерантности инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток к краткосрочному хранению ..... 164
*Таранник А.К., Останкова Л.В., Гриша И.Г., Сокол Л.В., Луценко Е.Д., Бондарович Н.А., Останков М.В., Гольцев А.Н.* Лиофилизированный лейкоконцентрат кордовой крови человека как корректор состояния иммунного статуса при лечении атопического дерматита (экспериментальное исследование) ..... 165
*Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Волина В.В., Сандомирский Б.П.* Структура сердца после терапевтической гипотермии и введения МСК при экспериментальном инфаркте миокарда ..... 166
*Юрчук Т.А., Петрушко М.П., Пиняев В.И.* Эффективность криоконсервирования экспандированных бластоцист человека методом витрификации с использованием коллапсирования ..... 167
*Бабинец О.М., Буряк И.А.* Лечение экспериментальной кишечной инфекции иммобилизованными в геле антибактериальными препаратами, хранившимися при низких температурах ..... 168
*Юхта М.С., Волкова Н.А., Степанюк Л.В., Чернышенко Л.Г., Гольцев А.Н.* Криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки в терапии экспериментального оофорита ..... 169
*Власов А.А., Ковалев Г.А., Белочкина И.В., Тынынука Л.Н., Сандомирский Б.П.* Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи ..... 170
*Чернявская Е.А., Бабийчук В.Г.* Влияние криоконсервированной кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс с алиментарным ожирением ..... 171
*Панов С.И., Белочкина И.В., Сандомирский Б.П.* Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови и фуллерена $C_{60}$ на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крыс с некрозом миокарда ..... 172
*Кисель А.В., Кирошка В.В., Бондаренко Т.П., Петрова В.А., Баклагина Ю.Г., Черняков Д.Д., Скорик Ю.А.* Характер распластывания и структура цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при культивировании на хитозановых матрицах ..... 173
*Нарожный С.В., Розанова С.Л.* Влияние низких температур на протекторное действие экстрактов плаценты человека по отношению к эритроцитам в условиях окислительного стресса ..... 174
*Васькович А.М., Кондаков И.И., Репин Н.В.* Влияние криоэкстракта плаценты на морфофункциональное состояние почек при экспериментальном нефрите Хеймана ..... 175
*Чуб О.В., Шевченко М.В., Прокопюк В.Ю.* Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения на клетки головного мозга новорожденных крыс в модели глутамат-индуцированной токсичности ..... 176
*Трутаева И.А., Кирошка В.В., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П.* Морфологические и биохимические характеристики овариальной ткани при разных режимах криоконсервирования ..... 177
*Новикова О.Ю., Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Лаврик А.А., Божок Г.А., Бондаренко Т.П.* Сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных ..... 178

*Али С.Г., Лаврик А.А., Божок Г.А.* Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов ... 179
*Третьяк Д.В., Гулевский А.К.* Исследование количественного и качественного состава низкомолекулярных веществ белково-пептидной природы из личинок *Tenebrio molitor* до и после холодовой акклимации ... 180
*Севастьянов С.С., Осецкий А.И., Гурина Т.М.* Термомеханический анализ кластерной кристаллизации водных растворов полиэтиленгликоля с м. м. 1500 ... 181
*Семионова Е.А., Ершова Н.А.* Постгипертонический лизис эритроцитов человека в присутствии хлорпромазина ... 182
*Макашова Е.Е., Зубова О.Л., Зубов П.М.* Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при криоконсервировании ядросодержащих клеток кордовой крови ... 183
*Улізко П.Ю., Боброва О.М.* Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика ... 184
*Кулик В.В., Бабийчук В.Г.* Ультраструктурные перестройки гипоталамуса старых крыс после ритмических экстремальных холодовых воздействий ... 185
*Первушина О.А.* Применение криоконсервированной эритроцитарной массы при коррекции анемического синдрома у собак, вызванного *Babesia canis* ... 186
*Роенко А.А., Пасиешвили Н.М.* Назначение иммуномодуляторов при материнско-плодовой инфекции снижает инфицированность плаценты и ее оболочек ... 187
*Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Легач Е.И., Божок Г.А.* Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии ... 188
*Гребенюк А.И., Чиж Н.А., Бызов Д.В., Рогоза Л.А., Антоненко Е.А., Лукьяненко П.Г., Сандомирский Б.П.* Разработка установки для эндоскопических операций на экспериментальных животных ... 189
*Мотко А.В., Долгопятенко А.Д., Чиж Н.А., Аврунин О.Г., Сандомирский Б.П.* Разработка инсуффлятора для проведения эндоскопических операций на экспериментальных животных ... 190
*Богуславский К.И., Алабедалькарим Н.М., Пахомов А.В., Божок Г.А.* Влияние инкубации с криопротекторами на присутствие эпитопа Gal-alpha-1,3-Gal в клетках линии PK-15 ... 191

coldinbiologyandmedicine
current issues of cryobiology, transplantology and biotechnology

## Abstracts of the 40th Annual Conference of Young Scientists 'Cold in Biology and Medicine. Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology' May 23–24, 2016, Kharkov, Ukraine

*Mutsenko V.V., Gryshkov A.P., Rogulskaya E.Yu., Petrenko Yu.A.* Pretreatment with Sucrose Increases Cryoresistance of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved on Two- and Three-Dimensional Carriers ... 158
*Martynova Yu.V., Babiichuk V.G.* Influence of Repeated Cycles of Rhythmic Extreme Whole-Body Cooling (–120°C) on Myocardium Structure in Dynamics of Rats' Aging ... 159
*Puhovkin A.Yu., Kononenko I.S., Kononenko R.V., Butskyi K.I., Cherepnin V.A., Kopeika E.F.* Cryopreservation of Sterlet Sperm: Optimization of Cryoprotective Medium Composition ... 160
*Borysov P.A., Dimitrov A.Yu., Goltsev A.N., Ostankov M.V.* Effect of Cryopreservation on Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells ... 161
*Burkova V.V.* Storage of Rabies Virus Strains *L. Pasteur* and CVS at Low Temperatures Using Cryoprotectants ... 162
*Ogurtsova V.V.* Permeability Coefficients of Murine Enterocyte Membranes for Water and Cryoprotectants ... 163
*Tarusin D.N., Mutsenko V.V., ZaikovV.S.* Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage ... 164
*Tarannik A.K., Ostankova L.V., Grisha I.G., Sokol L.V., Lutsenko E.D., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Goltsev A.N.* Frozen-Dried Human Cord Blood Leukoconcentrate as Correcting Agent of Immune Status when Treating Atopic Dermatitis (Experimental Study) ... 165

# 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.