ХОЛОД
в биологии и медицине
Актуальные проблемы криобиологии,
трансплантологии и биотехнологии

Тезисы конференции молодых ученых "Холод в биологии и медицине 2011" 18–19 мая 2011, г. Харьков

Богданчикова О.А., Овсянников С.Е., Компаниец А.М. Функциональная полноценность криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режимов замораживания 194
Сосимчик И.А., Черкашина Д.В. Фетальные биорегуляторы снижают повреждения печени при гипотермическом хранении..... 195
Пономарева В.Л. Влияние режимов охлаждения и консервирующих сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*..... 196
Кучков В.Н. Особенности распределения криопротекторов между вне- и внутриклеточной средой эритроцитов млекопитающих..... 197
Розанова С.Л., Нардид О.А. Влияние быстрого и медленного замораживания на антиоксидантные свойства экстрактов плаценты..... 198
Петрик М.А., Мартынюк И.Н. Снижение цитотоксичности мембранотропных криопротекторов до замораживания спермы индюка в присутствии белковых добавок..... 199
Давыдова Е.В., Осецкий А.И. Кластерная кристаллизация водных растворов глицерина 200
Маркова К.В., Бондаренко В.А. Связь между изменениями формы эритроцитов при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса и хлорпромазина (ХПР) и чувствительностью эритроцитов к холодовому шоку 201
Венцковская Е.А. Сон и тиреоидные гормоны у крыс при холодовой акклимации 202
Чернобай Н.А., Гурина Т.М., Пахомов А.В. Проникающая способность и криозащитная эффективность ряда криопротекторов..... 203
Малюкина М.Ю., Кавок Н.С., Боровой И.А. Влияние криопротекторов ДМСО, 1,2-пропандиола и криовоздействия на чувствительность митохондриального потенциала одиночных гепатоцитов к регуляции фенилэфрином при оценке флуоресцентным методом..... 204
Вязовская О.В., Николенко А.В. Корреляционный анализ показателей сохранности эритроцитов до и после замораживания в криозащитных средах различного состава на основе оксиэтилированного метилцеллозольва..... 205
Стриха О.А., Смольянинова Е.И. Определение удельной электрической проводимости ооцитов мыши в растворах сахарозы и проникающих криопротекторов методом импульсной кондуктометрии 206
Муценко В.В., Петренко Ю.А. Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием сахарозы... 207
Михайлова О.А., Зубов П.М., Рязанцев В.В., Бабийчук Л.А. Структурно-функциональное состояние ядросодержащих клеток кордовой крови в процессе криоконсервирования 208
Говорова Ю.С., Зинченко А.В. Влияние фракций экстрактов плаценты человека на фазовые переходы в клеточных суспензиях эритроцитов и *Saccharomyces cerevisiae* 209
Ляшенко Т.Д. Влияние ДМСО на поведение нервных клеток новорожденных крыс в условиях культивирования *in vitro* после замораживания-отогрева..... 210
Димитров А.Ю., Луценко Е.Д., Челомбитько О.В., Останков М.В., Гольцев А.Н. Криоконсервирование как фактор модуляции иммунокорригирующего потенциала клеток фетальной печени..... 211
Дейнеко Т.И., Маркова К.В., Рамазанов В.В., Бондаренко В.А. Постгипертонический стресс и осмотические свойства замороженных-отогретых эритроцитов..... 212
Лысак Ю.С. Сохранность меристем винограда в процессе низкотемпературного консервирования..... 213
Юрчук Т.А., Божок Г.А., Боровой И.А., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П. Влияние криоконсервирования на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс..... 214
Дорофеева Т.В., Пишко О.В. Сохранность клеток микроорганизмов после иммобилизации в различных гелях с последующим замораживанием до –70°С..... 215
Дудецкая Г.В., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс..... 216
Рогоза Л.А. Спектрофлуориметрические характеристики экстрактов сердца животных..... 217
Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И. Экспрессия β-III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят..... 218
Бызов Д.В., Сандомирский Б.П. Применение физических факторов при создании девитализированных сосудистых скаффолдов..... 219
Горина О.Л., Моисеева Н.Н., Гулевский А.К. Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на функциональную активность нейтрофилов донорской крови, подвергнутых гипотермическому хранению..... 220
Бабинец О.М. Сравнительное изучение терапевтического действия нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, при экспериментальном дисбиозе 221
Шевченко М.В. Экстракт печени оказывает угнетающее действие на нервные клетки новорожденных крыс, культивируемые *in vitro*..... 222
Порожан Е.А., Останков М.В. Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на стромальные и цитокин-продуцирующие клетки тимуса при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита..... 223
Прокопюк В.Ю. Клинико-экспериментальная оценка эффективности криоконсервированной сыворотки кордовой крови в прегравидарной подготовке при антифосфолипидном синдроме..... 224
Тищенко Ю.О., Кирошка В.В., Бондаренко Т.П. Значение стадии гистогенеза неонатальной овариальной ткани для ее развития в условиях гетеротопической трансплантации..... 225

Свидко Е.Н., Демин Ю.А. Экспериментальная модель лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия для исследования действия криоконсервированных клеток крови..... 226
Кравченко М.А., Бондарович Н.А., Челомбитько О.В., Осецкий А.И., Гольцев А.Н. Влияние криоэкстракта липидов плаценты на структурно-функциональные изменения в региональных лимфоузлах крыс при адъювантном артрите..... 227
Бабаева А.Г., Чиж Н.А. Сравнительная характеристика ишемического и крионекроза миокарда..... 228
Капустянська А.А., Ждан В.М., Шепітько В.І., Челішвілі А.Л. Використання кріоконсервованого екстракту плаценти в комплексному лікуванні подагричного артриту у хворих з ожирінням..... 229
Беспалова И.Г., Богатырева Е.О. Пептидный состав кожи крыс при холодовой травме..... 230
Кожина О.Ю., Онасенко Е.С., Бондарович Н.А., Гольцев А.Н. Механизмы формирования противовирусной резистентности после введения препарата “Криоцелл-Гемокорд”..... 231
Юхта М.С., Волкова Н.А., Гончарук Е.И., Грищенко В.И. Восстановление дегенеративно измененной хрящевой ткани межпозвонковых дисков после неинъекционного введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток..... 232
Грицай Д.В., Козлова А.О., Лебединский А.С. Трансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени, заселенных в макропористые губки, крысам с печеночной недостаточностью..... 233
Гольцев К.А., Кожина О.Ю., Сафранчук О.В., Останков М.В., Гольцев А.Н. Особенности изменения иммунного статуса крыс с острым гнойным перитонитом после лечения препаратом “Криоцелл-Гемокорд”..... 234

cold
in biology and medicine
Current problems in cryobiology,
transplantology, and biotechnology

Abstracts of the Conference of Young Scientists “Cold in Biology and Medicine 2011” May, 18–19th, 2011, Kharkov, Ukraine

Bogdanchikova O.A., Ovsyannikov S.Ye., Kompaniets A.M. Functional Value of Cryopreserved Platelets Depending on Freezing Regimens..... 194
Sosimchyk I.A., Cherkashina D.V. Fetal Bioregulators Attenuate Liver Damage During Hypothermic Storage..... 195
Ponomareva V.L. Effect of Freezing Regimens and Preserving Media Containing Sodium Alginate on *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cell Viability..... 196
Kuchkov V.N. Peculiarities of Cryoprotectant Distribution between Extra- and Intracellular Medium of Mammalian Erythrocytes 197
Rozanova S.L., Nardid O.A. Influence of Rapid and Slow Freezing on Antioxidant Properties of Human Placenta Extract..... 198
Petrik M.A., Martynyuk I.N. Cytotoxicity Reduction of Membrane-Tropic Cryoprotectants Prior to Freezing of Turkey Sperm in Presence of Protein Additives 199
Davydova E.V., Osetskiy A.I. Cluster Crystallization of Aqueous Glycerol Solutions..... 200
Markova K.V., Bondarenko V.A. Relationship between Changes of Erythrocyte Shape under Effect of Cytoskeleton-Membrane Complex Modifiers and Chlorpromazine and Erythrocyte Sensitivity to Cold Shock..... 201
Ventskovska O.A. Sleep and Thyroid Hormones in Rats during Cold Acclimation..... 202
Chernobai N.A., Gurina T.M., Pakhomov A.V. Permeability and Cryoprotective Efficiency of Several Cryoprotectants..... 203
Malyukina M.Yu., Kavok N.S., Borovoy I.A. Influence of DMSO, 1,2-Propanediol Cryoprotectants and Cryoexposure on Sensitivity of Single Hepatocyte Mitochondrial Potential to Regulation with Phenylephrine Assessed by Fluorescent Method..... 204
Vyazovska O.V., Nikolenko A.V. Correlation Analysis of Erythrocyte Survival Parameters Prior to and After Freezing in Cryoprotective Media of Different Composition Based on Oxyethylated Methyl Cellosolve..... 205
Strikha O.A., Smolyaninova E.I. Determination of Mouse Oocyte Specific Electric Conductivity in Solutions of Sucrose and Permeative Cryoprotectants Using Electroporation Method 206
Mutsenko V.V., Petrenko I.A. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Sucrose..... 207
Mykhailova O.A., Zubov P.M., Ryazantsev V.V., Babiychuk L.A. Structural and Functional State of Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation..... 208
Govorova Yu.S., Zinchenko A.V. Effect of Human Placental Extracts’ Fractions on Phase Transitions in Cell Suspensions of Erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae*..... 209
Lyashenko T.D. DMSO Effect on Behavior of Nerve Cells of New-Born Rats During In Vitro Culturing after Freeze-Thawing..... 210
Dimitrov A.Yu., Lutsenko Ye.D., Chelombitko O.V., Ostankov M.V., Goltsev A.N. Cryopreservation as Modulation Factor for Immune Correcting Potential of Fetal Liver Cells of Different Gestation Terms..... 211

Deyneko T.I., Markova K.V., Ramazanov V.V., Bondarenko V.A. Post-Hypertonic Stress and Osmotic Properties of Frozen-Thawed Erythrocytes..... 212
Lysak Yu.S. Survival of Grape Meristems During Low-Temperature Preservation..... 213
Yurchuk T.A., Bozhok G.A., Borovoy I.A., Gurina T.M., Bondarenko T.P. Cryopreservation Effect on Formation of J-Aggregates in Rat Adrenal Cortex Cells..... 214
Dorofeyeva T.V., Pishko O.V. Integrity of Microorganisms' Cells after Immobilization in Different Gels with Following Freezing Down to –70°C..... 215
Dudetskaya G.V., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Selection of Culturing Conditions for Cells of Adult Rat Adrenal Glands..... 216
Rogoza L.A. Spectrofluorimetric Characteristics of Animal Heart Extracts..... 217
Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I. Expression of β-III Tubulin in Newborn Piglet Adrenal Cell Culture..... 218
Byzov D.V., Sandomirskiy B.P. Application of Physical Factors when Designing Devitalized Vascular Scaffolds..... 219
Gorina O.L., Moiseyeva N.N., Gulevsky A.K. Influence of Cord Blood Low-Molecular Fraction on Functional Activity of Human Blood Neutrophils after Hypothermic Storage..... 220
Babinets O.M. Comparative Studying of Therapeutical Effect of Native and Cryopreserved Probiotics Immobilized on Enterosorbents during Experimental Dysbiosis..... 221
Shevchenko M.V. Liver Extract Suppress *In Vitro* Cultured Nerve Cells of Newborn Rats..... 222
Porozhan Ye.A., Ostankov M.V. Influence of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Stromal and Cytokine-Producing Thymus Cells during Development of Experimental Allergic Encephalomyelitis..... 223
Prokopyuk V.Yu. Clinical and Experimental Assessment of Efficiency of Cryopreserved Cord Blood Serum in Pregnancy Preparing at Anti-Phospholipid Syndrome..... 224
Tischenko Yu.O., Kiroshka V.V., Bondarenko T.P. Importance of Histogenesis Stage of Neonatal Ovarian Tissue for Its Development under Conditions of Heterotopic Transplantation..... 225
Svidko Ye.N., Demin Yu.A. Experimental Model of Limbal Inefficiency of Cornea Epithelia Regional Stem Cells for Investigation of Cryopreserved Blood Cell Influence..... 226
Kravchenko M.A., Bondarovich N.A., Chelombitko O.V., Osetsky A.I., Goltsev A.N. Influence of Placental Lipid Cryoextract on Structure-Functional Changes in Regional Lymph Nodes of Rats with Adjuvant Arthritis..... 227
Babayeva A.G., Chizh N.A. Comparative Characteristics of Ischemic Necrosis and Myocardium Cryonecrosis..... 228
Kapustyanska A.A., Zhdan V.M., Shepitko V.I., Chelishvili A.L. Application of Cryopreserved Placenta Extract in Combined Treatment of Gout Arthritis in Patients with Obesity..... 229
Bespalova I.G., Bogatyreva E.O. Peptide Composition of Rat Skin After Cold Trauma..... 230
Kozhyna O.Yu., Onasenko Ye.S., Bondarovich N.A., Goltsev A.N. Mechanisms of Antiviral Resistance Formation after Injection of Preparation "Cryocell-Hemocord"..... 231
Iukhta M.S., Volkova N.A., Goncharuk Ye.I., Grischenko V.I. Reparation of Degenerative Changes in Intervertebral Disc Cartilage after Non-Injecting Introduction of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells 232
Gritsay D.V., Kozlova A.O., Lebedinsky A.S. Transplantation of Cryopreserved Fetal Liver Cells Immobilized in Macroporous Sponge in Rats with Liver Failure..... 233
Goltsev K.A., Kozhyna O.Yu., Safranchuk O.V., Ostankov M.V., Goltsev A.N. Peculiarities of Changes of Rats Immune Status with Acute Purulent Peritonitis after Treatment with Preparation "Cryocell-Hemocord"..... 234

Структурно-функциональное состояние ядросодержащих клеток кордовой крови в процессе криоконсервирования

О.А. Михайлова, П.М. Зубов, В.В. Рязанцев, Л.А. Бабийчук
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural and Functional State of Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation

O.A. Mykhailova, P.M. Zubov, V.V. Ryazantsev, L.A. Babiychuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время при лечении многих заболеваний используют криоконсервированную суспензию ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови (КК) в качестве препарата, содержащего гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Эффективность их применения во многом определяется сохранением структурно-функциональной полноценности ЯСК после размораживания. В связи с этим целью данной работы было исследование сохранности и жизнеспособности ЯСК КК, состояния их антиоксидантной системы (АОС), а также изменений липидной асимметрии мембран клеток на всех этапах криоконсервирования по разработанному нами методу.

Выделение фракции ЯСК из цельной КК человека производили с использованием декстрана (м.м. 60000). Замораживали клетки под защитой 5% ДМСО по разработанной нами программе. Фенотипирование ЯСК ($CD45^+$) КК проводилось на проточном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием реагентов BD. Жизнеспособность (7AAD), нарушение липидной асимметрии мембран (AnnexinV) и продукцию активных форм кислорода (АФК) ($DCFH_2$-DA) ЯСК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что при выделении и обработке ЯСК ДМСО сохранность и жизнеспособность клеток снижались. Анализ изменений липидной асимметрии мембран с помощью AnnexinV (маркера начальной стадии апоптоза) не показал увеличение количества $AnnexinV^+$-клеток по сравнению с цельной КК. Интенсивность флуоресценции DCF (I_{DCF}) ЯСК после процедуры выделения существенно не отличалась от показателей в цельной КК, а обработка клеток ДМСО приводила к повышению уровня внутриклеточных АФК, о чем свидетельствует прирост I_{DCF}. Добавление экзогенной H_2O_2 как к выделенным, так и к обработанным ДМСО ЯСК не влияло на временную динамику I_{DCF} по сравнению с клетками цельной КК, что свидетельствует о сохранении АОС клеток в состоянии, сходном с нативным в цельной КК.

Дальнейшая процедура замораживания-отогрева позволяла получить до 80% ЯСК с сохранением высокого уровня их жизнеспособности (81,3±2,5% $CD45^+7AAD^-$). При этом количество $AnnexinV^+$-клеток составляло 7,35± 1,25%, что свидетельствует о сохранении структурной полноценности ЯСК. I_{DCF} после криоконсервирования ЯСК существенно не изменялась, однако при добавлении экзогенной H_2O_2 временная динамика I_{DCF} отличалась от показателей до замораживания, но с течением времени данные различия нивелировались, что говорит об отсутствии существенных изменений в работе АОС клеток после размораживания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что криоконсервирование ЯСК КК по разработанному нами методу позволяет сохранять структурно-функциональную полноценность и жизнеспособность клеток на достаточно высоком уровне.

Nowadays the treatment of many diseases is performed with cryopreserved suspension of cord blood (CB) nucleated cells (NC), as a preparation containing hematopoietic stem cells (HSC). Efficiency of their application is mainly determined by the preservation of structural and functional integrity of NC after thawing. In this context, the research aim was to investigate the integrity and viability of CB NC, the state of their antioxidant system (AOS), as well as the changes of lipid asymmetry in cell membranes at all the stages of cryopreservation method developed by us.

NC fraction was isolated from the whole cord blood using dextran (m.m. 60,000). Cells were frozen under protection of 5% DMSO by designed by us program. Phenotyping of CB NC ($CD45^+$) was carried out by means of flow cytometer FACS Calibur using BD reagents. The viability (7AAD), disorder of lipid membrane asymmetry (AnnexinV) and production of reactive oxygen species (ROS) ($DCFH_2$-DA) of the NC was evaluated by the method of flow cytometry. It was shown that during NC isolation and their treatment by DMSO the survival and viability decreased. The analysis of membrane lipid asymmetry changes with AnnexinV (the marker of initial apoptosis stage) did not show the increase of $AnnexinV^+$ cells comparing with the data of untreated whole cord blood. The DCF fluorescence intensity (I_{DCF}) in NC after isolation did not differ significantly from the indices of the whole CB, and the treatment of cells with DMSO led to the rise of intracellular ROS level, testified by the increased $I_{DCF.}$ The addition of exogenous H_2O_2 to the isolated as well as to the treated by DMSO cells did not affect the temporal dynamics of I_{DCF} comparing with the cells of the untreated whole CB testifying to the preservation of AOS in the state similar with native one in the whole CB.

Further freeze-thawing allowed to obtain up to 80% of NC with a high viability level (81.3 ± 2.5% $CD45^+7AAD^-$). Moreover, the number of $AnnexinV^+$ cells was 7.35 ± 1.25%, that testified to the preservation of structural integrity of NC. I_{DCF} after NC cryopreservation was not changed significantly, however, after the addition of exogenous H_2O_2 the temporal dynamics of I_{DCF} differed from the indices before the freezing but in due time these differences were neutralized that may testify to the absence of significant changes in the function of AOS cells after thawing.

Thus, the obtained results testify to the fact that cryopreservation of CB NC according the method developed by allows to preserve structural-functional integrity and viability of cells at quite a high level.