холодвбиологииимедицине 37
актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии

Тезисы 37-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2013, г. Харьков

Бондарович Н.А., Кузняков А.В., Останков М.В., Челомбитько О.В. Влияние разных протоколов замораживания на экспрессию поверхностных маркеров клеток фетальной печени разных сроков гестации ... 165
Рогульская Е.Ю., Муценко В.В., Петренко Ю.А. Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием олигосахаридов ... 166
Челомбитько О.В., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А., Останков М.В., Димитров А.Ю. Изменение молекулярно-генетических характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под воздействием факторов криоконсервирования ... 167
Подуфалий В.В. Криоконсервирование единичных эпидидимальных и тестикулярных спермиев в микрообъеме ... 168
Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н. Выбор «хаускипинг-гена» для анализа уровня экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР после криоконсервирования клеток ... 169
Михайлова О.А., Зубов П.М. Стадии апоптоза ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования ... 170
Севастьянов С.С., Осецкий А.И. Дифференциальная сканирующая тензодилатометрия в изучении процессов кристаллизации и плавления криопротекторных растворов ... 171
Говор И.В., Якименко Ю.С. Исследование антиоксидантной активности криопротекторов методом хемилюминесценции ... 172
Говорова Ю.С., Зинченко А.В. Исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n = 25 на конформационную стабильность гемоглобина человека ... 173
Вакарчук М.А. Влияние замораживания на антиагрегационные свойства экстрактов плаценты ... 174
Горячая И.П. Адаптивный ответ на окислительный стресс и устойчивость к холодовым воздействиям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ... 175
Бабинец О.М. Ферментативные свойства иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения ... 176
Руднева Ю.В., Бабийчук В.Г., Чернявская Е.А. Влияние ритмического экстремального охлаждения (–120°С) и ядросодержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс ... 177
Павлова Е.В. Критерии лабораторных показателей при общей воздушной криотерапии ... 178
Трофимова А.В., Чиж Н.А., Сандомирский Б.П. Электрокардиофизиологические показатели при охлаждении головы и шеи ... 179
Шканд Т.В., Чиж Н.А., Сандомирский Б.П. Исследование морфологии миокарда крыс в условиях экспериментального некроза сердца ... 180
Беспалова І.Г. Дозозалежний вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі ... 181
Муценко В.В., Рогульская Е.Ю., Петренко Ю.А. Культивирование и дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток в составе скаффолдов на основе скелетов морских губок *Ianthella basta* ... 182
Бабаева А.Г. Влияние экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят на уровень цитолиза и выраженность воспалительного процесса при экспериментальном некрозе миокарда ... 183
Рогоза Л.А. Корекція показників ЕКГ щурів із ішемією міокарда екстрактом кріоконсервованих фрагментів серця поросят ... 184
Горленко А.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние низких температур и ионизирующего облучения на физико-механические свойства фиброзной оболочки перикарда и лепестков аортального клапана свиньи ... 185
Шевченко Е.В., Тыныныка Л.Н., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние ионизирующего облучения и низких температур на морфологическое состояние изолированных артерий свиней ... 186

холодвбиологииимедицине 37
актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии

Тезисы 37-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2013, г. Харьков

Бондарович Н.А., Кузняков А.В., Останков М.В., Челомбитько О.В. Влияние разных протоколов замораживания на экспрессию поверхностных маркеров клеток фетальной печени разных сроков гестации ... 165
Рогульская Е.Ю., Муценко В.В., Петренко Ю.А. Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием олигосахаридов ... 166
Челомбитько О.В., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А., Останков М.В., Димитров А.Ю. Изменение молекулярно-генетических характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под воздействием факторов криоконсервирования ... 167
Подуфалий В.В. Криоконсервирование единичных эпидидимальных и тестикулярных спермиев в микрообъеме ... 168
Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н. Выбор «хаускипинг-гена» для анализа уровня экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР после криоконсервирования клеток ... 169
Михайлова О.А., Зубов П.М. Стадии апоптоза ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования ... 170
Севастьянов С.С., Осецкий А.И. Дифференциальная сканирующая тензодилатометрия в изучении процессов кристаллизации и плавления криопротекторных растворов ... 171
Говор И.В., Якименко Ю.С. Исследование антиоксидантной активности криопротекторов методом хемилюминесценции ... 172
Говорова Ю.С., Зинченко А.В. Исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n = 25 на конформационную стабильность гемоглобина человека ... 173
Вакарчук М.А. Влияние замораживания на антиагрегационные свойства экстрактов плаценты ... 174
Горячая И.П. Адаптивный ответ на окислительный стресс и устойчивость к холодовым воздействиям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ... 175
Бабинец О.М. Ферментативные свойства иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения ... 176
Руднева Ю.В., Бабийчук В.Г., Чернявская Е.А. Влияние ритмического экстремального охлаждения (–120°С) и ядросодержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс ... 177
Павлова Е.В. Критерии лабораторных показателей при общей воздушной криотерапии ... 178
Трофимова А.В., Чиж Н.А., Сандомирский Б.П. Электрокардиофизиологические показатели при охлаждении головы и шеи ... 179
Шканд Т.В., Чиж Н.А., Сандомирский Б.П. Исследование морфологии миокарда крыс в условиях экспериментального некроза сердца ... 180
Беспалова І.Г. Дозозалежний вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі ... 181
Муценко В.В., Рогульская Е.Ю., Петренко Ю.А. Культивирование и дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток в составе скаффолдов на основе скелетов морских губок *Ianthella basta* ... 182
Бабаева А.Г. Влияние экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят на уровень цитолиза и выраженность воспалительного процесса при экспериментальном некрозе миокарда ... 183
Рогоза Л.А. Корекція показників ЕКГ щурів із ішемією міокарда екстрактом кріоконсервованих фрагментів серця поросят ... 184
Горленко А.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние низких температур и ионизирующего облучения на физико-механические свойства фиброзной оболочки перикарда и лепестков аортального клапана свиньи ... 185
Шевченко Е.В., Тыныныка Л.Н., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Влияние ионизирующего облучения и низких температур на морфологическое состояние изолированных артерий свиней ... 186

Стадии апоптоза ядросодержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования

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

Apoptosis Stages in Cord Blood Nucleated Cells Depending on Cryopreservation Method

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

Криоконсервирование ядросодержащих клеток (ЯСК) кордовой крови (КК), широко используемых для лечения различных заболеваний, является единственным способом их долгосрочного хранения. Определение путей гибели клеток в процессе криоконсервирования важно при подборе оптимальных криозащитных сред и условий замораживания клеток. Целью данной работы было оценить стадии апоптоза/некроза ЯСК КК в зависимости от метода криоконсервирования.

Объектом исследования служили ЯСК КК человека. Стадии апоптоза оценивали методом проточной цитометрии с использованием комбинации Annexin V и витального красителя 7AAD, который позволяет идентифицировать четыре типа клеток: живые (AnnexinV$^-$7AAD$^-$); находящиеся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV$^+$7AAD$^-$); на стадии позднего апоптоза/некроза (AnnexinV$^+$7AAD$^+$) и мертвые некротические (AnnexinV$^-$ 7AAD$^+$).

Показано, что метод выделения ЯСК с помощью полиглюкина и последующее их замораживание под защитой 5% ДМСО, а также выделение разработанным методом двухэтапного центрифугирования с последующим замораживанием под защитой 10% ПЭО-1500 позволяют сохранить до 80 и 73% живых (AnnexinV$^-$ 7AAD$^-$) клеток соответственно. Замораживание клеток, выделенных в градиенте плотности фиколла, снижает данный показатель до 56% при использовании 5% ДМСО и до 47% – 10% ПЭО-1500. Оценка стадий апоптоза/некроза поврежденных клеток показала, что независимо от метода криоконсервирования для большей их части характерны нарушение целостности мембраны и фрагментация ДНК в ядре при сохранении в ней упорядоченности фосфолипидов, что свойственно клеткам, находящимся на стадии некроза (AnnexinV$^-$7AAD$^+$). Установлено, что в процессе криоконсервирования основные потери клеток происходят в результате их быстрой гибели под влиянием повреждающих факторов замораживания-отогрева, на которые клетки не могут или не успевают отреагировать с помощью своих защитных систем. Клеток, находящихся на начальной стадии апоптоза (AnnexinV$^+$7AAD$^-$), гораздо меньше. Небольшой процент из всех поврежденных в процессе криоконсервирования ЯСК составляют клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза/некроза (AnnexinV$^+$7AAD$^+$), т. е. которые имеют нарушения целостности плазматической мембраны и упорядоченности в ней фосфолипидов.

При анализе стадий апоптоза/некроза в популяциях ЯСК (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) было показано, что основные повреждения при криоконсервировании происходят в гранулоцитах, а в лимфоцитах и моноцитах процессы апоптоза инициируются в меньшей степени, что указывает на большую их устойчивость к факторам криоконсервирования.

Cryopreservation of cord blood (CB) nucleated cells (NCs), widely used in treatment of various diseases, is the only way of their long-term storage. Identification of cell death pathways following cryopreservation is important for the selection of the optimal cryoprotective media and freezing regimens. The aim of this study was to assess the stages of apoptosis/necrosis of CB nucleated cells, depending on the cryopreservation method.

The object of study were human CB NCs. Assessment of apop-tosis stages was performed by flow cytometry method using the combination of Annexin V and vital dye 7AAD, that allows to identify four types of cells: living cells (AnnexinV$^-$7AAD$^-$); the cells at the early stages of apoptosis (AnnexinV$^+$7AAD$^-$); the cells at the stage of late apoptosis/necrosis (AnnexinV$^+$7AAD$^+$); and dead necrotic cells (AnnexinV$^-$7AAD$^+$).

It was shown that the method of NCs isolation using polyglucinum and subsequent freezing with 5% DMSO, as well as by developed two-step centrifugation method and subsequent freezing with 10% PEO-1500 allowed to preserve up to 80 and 73% living AnnexinV$^-$7AAD$^-$ cells, respectively. Freezing of the cells isolated by ficoll density gradient reduced this index down to 56% when using 5% DMSO, and down to 47% in the case of 10% PEO-1500. Evaluation of apoptosis/necrosis stages in injured cells showed that regardless of the cryopreservation method, most of them were characterized by membrane damage and fragmentation of nuclear DNA, while phospholipids arrangement was preserved, that was characteristic for the cells at the stage of necrosis (AnnexinV$^-$7AAD$^+$). It is evident that cryopreservation leads to a cell loss mainly due to their rapid destruction caused by freezing and thawing factors, which the cells can not or have no time to react using protective systems. There were found only few cells on the initial stage of apoptosis (AnnexinV$^+$7AAD$^-$). Small amount of all damaged during cryopreservation NCs, were the cells at a late stage of apoptosis/necrosis (AnnexinV$^+$7AAD$^+$), which had disturbances of the plasma membrane and phospholipids arrangement.

The analysis of apoptosis/necrosis stages of NC populations (lymphocytes, monocytes, granulocytes) showed that the major damages following from cryopreservation occured in granulocytes, while lymphocytes and monocytes were shown as suffering less from apoptosis, that indicated their greater resistance to the factors of cryopreservation.