

Тезисы 39-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2015 г., г. Харьков

Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф. Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L)..... 165
Мартынова Ю.В., Бабийчук В.Г. Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (–120°С) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс..... 166
Kilbride P., Selden C., Fuller B., Morris J. Хранение инкапсулированных сфероидов, состоящих из клеток печени, при –80°С после хранения при температуре жидкого азота..... 167
Буцкий К.И., Дюбко Т.С., Федуняева И.А., Татарец А.Т., Копейка Е.Ф. Определение вероятности образования микроскопических пор в мембранах криоконсервированных сперматозоидов карпа (*Cyprinus carpio*)..... 168
Севастьянов С.С., Осецкий А.И. Влияние водородных связей на диаграммы состояния криопротекторных растворов..... 169
Буркова В.В., Лаврик А.А. Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах..... 170
Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н. Анализ уровня экспрессии генов в криоконсервированных клетках фетальной печени в процессе рекультивирования..... 171
Муценко В.В., Рогульская Е.Ю., Тарусин Д.Н. Ответ мезенхимальных стромальных клеток на криоконсервирование в составе скаффолдов, полученных из скелетов морских губок *Ianthella basta* (пилотное исследование)..... 172
Розанова С.Л. Влияние низких температур на гемоглобин, встроенный в альгинатные микросферы..... 173
Михайлова О.О., Зубов П.М. Стан популяцій ядровмісних клітин кордової крові залежно від методу кріоконсервування... 174
Дябина О.А., Винник Ю.А., Останков М.В. , Бондарович Н.А. , Гольцев А.Н. Корреляция между stemness-like состоянием клеток аденокарциномы Эрлиха и количеством циклов замораживания-отогрева..... 175
Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф. Терапевтическая эффективнось иммобилизованного препарата антибиотика и пробиотика после низкотемпературного хранения..... 176
Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Практический опыт экспериментальных микрососудистых операций..... 177
Юрчук Т.А., Петрушко М.П., Пиняев В.И. Вклад индивидуальных морфологических характеристик в результативность витрификации бластоцист человека..... 178
Манченко А.А. Исследования биоинтеграции соединительнотканных трансплантатов при создании тканезамещающих биоматериалов..... 179
Беспалова І.Г., Рогоза Л.А., Гірич М.С. Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ..... 180
Свидко Е.Н., Демин Ю.А. Компенсация лимбальной недостаточности роговицы ядросодержащими клетками кордовой крови..... 181
Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Манченко А.А., Шаблий В.А., Сандомирский Б.П. Функциональное состояние миокарда после комбинированного использования терапевтической гипотермии и мезенхимальных стромальных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда..... 182
Тарусин Д.Н., Зайков В.С., Муценко В.В., Петренко Ю.А. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер..... 183



Тезисы 39-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2015 г., г. Харьков

Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф. Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L)..... 165
Мартынова Ю.В., Бабийчук В.Г. Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (–120°С) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс..... 166
Kilbride P., Selden C., Fuller B., Morris J. Хранение инкапсулированных сфероидов, состоящих из клеток печени, при –80°С после хранения при температуре жидкого азота..... 167
Буцкий К.И., Дюбко Т.С., Федуняева И.А., Татарец А.Т., Копейка Е.Ф. Определение вероятности образования микроскопических пор в мембранах криоконсервированных сперматозоидов карпа (*Cyprinus carpio*)..... 168
Севастьянов С.С., Осецкий А.И. Влияние водородных связей на диаграммы состояния криопротекторных растворов..... 169
Буркова В.В., Лаврик А.А. Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах..... 170
Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н. Анализ уровня экспрессии генов в криоконсервированных клетках фетальной печени в процессе рекультивирования..... 171
Муценко В.В., Рогульская Е.Ю., Тарусин Д.Н. Ответ мезенхимальных стромальных клеток на криоконсервирование в составе скаффолдов, полученных из скелетов морских губок *Ianthella basta* (пилотное исследование)..... 172
Розанова С.Л. Влияние низких температур на гемоглобин, встроенный в альгинатные микросферы..... 173
Михайлова О.О., Зубов П.М. Стан популяцій ядровмісних клітин кордової крові залежно від методу кріоконсервування... 174
Дябина О.А., Винник Ю.А., Останков М.В. , Бондарович Н.А. , Гольцев А.Н. Корреляция между stemness-like состоянием клеток аденокарциномы Эрлиха и количеством циклов замораживания-отогрева..... 175
Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф. Терапевтическая эффективнось иммобилизованного препарата антибиотика и пробиотика после низкотемпературного хранения..... 176
Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Практический опыт экспериментальных микрососудистых операций..... 177
Юрчук Т.А., Петрушко М.П., Пиняев В.И. Вклад индивидуальных морфологических характеристик в результативность витрификации бластоцист человека..... 178
Манченко А.А. Исследования биоинтеграции соединительнотканных трансплантатов при создании тканезамещающих биоматериалов..... 179
Беспалова І.Г., Рогоза Л.А., Гірич М.С. Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ..... 180
Свидко Е.Н., Демин Ю.А. Компенсация лимбальной недостаточности роговицы ядросодержащими клетками кордовой крови..... 181
Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Манченко А.А., Шаблий В.А., Сандомирский Б.П. Функциональное состояние миокарда после комбинированного использования терапевтической гипотермии и мезенхимальных стромальных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда..... 182
Тарусин Д.Н., Зайков В.С., Муценко В.В., Петренко Ю.А. Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер..... 183

Стан популяцій ядровмісних клітин кордової крові залежно від методу кріоконсервування

О.О. Михайлова, П.М. Зубов
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

State of Human Cord Blood Nucleated Cell Populations Depending on Cryopreservation Method

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

Досліджено структурно-функціональний стан та життєздатність різних популяцій ядровмісних клітин (ЯВК, CD45$^+$) кордової крові людини (КК), у тому числі й гемопоетичних стовбурових клітин-попередників (CD34$^+$), залежно від способів їх виділення з цільної крові, використання кріопротекторів із різним механізмом дії та низьких температур.

Показано високу ефективність виділення ЯВК із цільної КК методом двохетапного центрифугування, який не передбачає використання хімічних речовин і дозволяє виділяти більше 90% CD45$^+$- і CD34$^+$-клітин без втрати їх життєздатності. Також високу ефективність виділення ЯВК забезпечував метод седиментації у поліглюкіні – більше 80% CD45$^+$- і CD34$^+$-клітин. Встановлено, що кріоконсервування ЯВК, виділених у поліглюкіні, під захистом ДМСО, а також ЯВК виділених двохетапним центрифугуванням, під захистом ПЕГ-1500 дозволяє зберегти у життєздатному стані більше 80% CD45$^+$- і більше 90% CD34$^+$-клітин.

Показано різну чутливість популяцій ЯВК до пошкоджуючої дії факторів кріоконсервування: максимальною кріостійкістю характеризуються лімфоцити і моноцити (життєздатність понад 95 і 90% відповідно). При цьому основне зменшення кількості ЯВК та зниження показника їх життєздатності відбувалось за рахунок гранулоцитів.

Продемонстровано збереження асиметричного розподілу фосфоліпідів у 99% лімфоцитів, 96% моноцитів і 83% гранулоцитів КК, кріоконсервованих під захистом як ДМСО, так і ПЕГ-1500, після виділення клітин у поліглюкіні та двохетапного центрифугування відповідно. Встановлено підвищення вмісту в клітинах активних форм кисню після кріоконсервування з ДМСО і ПЕГ-1500, яке не є критичним і може розглядатися як реакція клітин на вплив факторів кріоконсервування.

Проведений аналіз стадій апоптозу ЯВК показав, що виділення у поліглюкіні та кріоконсервування з 5%-м ДМСО, а також виділення методом двохетапного центрифугування та заморожування з 10%-м ПЕГ-1500 зберігало живими (Annexin V$^-$7AAD$^-$) більшість клітин, а їх пошкодження відбувалось шляхом некрозу (Annexin V$^-$ 7AAD$^+$). Основний відсоток ушкоджених клітин при використанні будь-якої з технологій кріоконсервування припадав на популяцію гранулоцитів, а лімфоцити та моноцити мали високу кріостійкість.

Таким чином, представлені методи кріоконсервування, які базуються на виділенні клітин у поліглюкіні та методом двохетапного центрифугування та застосуванні ДМСО і ПЕГ-1500, забезпечують високий рівень збереженості та життєздатності ЯВК, незважаючи на формування АФК, що зумовлює високий потенціал клітин для використання в клінічній практиці.

We studied structural and functional states as well as viability of various populations of human cord blood (CB) nucleated cells (NCs, CD45$^+$), including hematopoietic progenitor cells (HPCs, CD34$^+$), depending on the method of whole cord blood separation and choice of cryoprotectants with different mechanism of action and low temperatures.

The experiments showed high efficiency of the NCs isolation from the whole CB by the two-step centrifugation without use of additional chemicals that allowed to collect more than 90% of CD45$^+$ and CD34$^+$ cells without loss of their viability. High efficiency was also provided by sedimentation in dextran solution: more than 80% CD45$^+$ and CD34+ cells. It was established that NCs isolation in dextran solution and subsequent freezing under 5% DMSO protection, as well as cells isolation by two-step centrifugation and subsequent freezing under 10% PEG-1500 protection, kept viable more than 80% CD45$^+$ and 90% CD34$^+$ cells. Different sensitivity of NC populations to the damaging effects of cryopreservation factors was shown: lymphocytes and monocytes were the most cryoresistant (more than 95 and 90% viable cells, correspondingly). Herewith, the main decrease in cells amount and their viability was due to granulocytes.

There was shown the preservation of asymmetric phospholipid distribution in 99% lymphocytes, 96% monocytes and 83% granulocytes of CB, cryopreserved under the protection of DMSO and PEG-1500 after cells isolation in dextran solution and by two-step centrifugation respectively. It was established that an increased content of intracellular reactive oxygen species (ROS) after cryopreservation with DMSO and PEG-1500 was not critical and could be considered as cells response to the stress effects of freeze-thawing.

The analysis of apoptosis stages in CB NCs showed that isolation in dextran solution and cryopreservation with 5% DMSO, as well as isolation by two-step centrifugation and cryopreservation with 10% PEG-1500, kept alive (Annexin V$^-$7AAD$^-$) the majority of cells, and cell damage occurred primarily by necrosis (Annexin V$^-$7AAD$^+$). Major percentage of damaged cells in any of the utilized cryopreservation methods was due to granulocyte population, and lymphocytes and monocytes were highly cryoresistant.

To emphasize, we can conclude that the presented methods of cryopreservation of CB NCs based on isolation in dextran solution and by two-step centrifugation and application of DMSO and PEG-1500, provided a high level of survival and viability in spite of ROS formation, that provided their high potential for application in clinical practice.