

Криотропное гелеобразование как путь формирования макропористых и сверхмакропористых гелевых матриц биотехнологического назначения

В.И. ЛОЗИНСКИЙ

Институт элементоорганических соединений им.А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва

Cryotropic Gel Formation as the Way of Forming Macroporous and Ultramacroporous Gel Matrixes of Biological Purpose

V.I. LOZINSKY

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds
of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Одним из интенсивно развивающихся направлений науки о полимерах является разработка новых специфических материалов для биотехнологии. В частности, полимерные системы должны быть нетоксичными и биосовместимыми, стабильными или, напротив, контролируемо биodeградируемыми, иметь достаточную механическую прочность, причем, очень часто, в сочетании с макропористой структурой. Последнее качество необходимо при работе с биологическими нано- и микрочастицами (биополимерные комплексы, вирусы, органеллы, целые клетки), чтобы пористость полимерной матрицы позволяла «большим» биологическим частицам проникать в массу материала и взаимодействовать с его компонентами по всему объему. Проблема пористости полимерного носителя актуальна для биокаталитических систем, например иммобилизованных ферментов или целых клеток, а также в случае биоаффинных сорбентов для выделения и очистки очень крупных объектов (вирусов и клеток). В настоящее время создаются сверхмакропористые объемные подложки для культивирования животных клеток и разрабатываются имплантаты, содержащие соответствующие клетки (например, стволовые).

Большинству требований соответствуют так называемые *криогели* – высокопористые гелевые материалы, формируемые в неглубоко замороженной среде. Характерной особенностью криогелей является их макропористость, причем поры в них взаимосвязаны. В зависимости от свойств и концентрации предшественников, а также от режимов *криотропного гелеобразования* можно получить криогели разной химической природы и пористости, а именно: *макропористые* матрицы с порами сечением от десятых долей до единиц микрометров и *сверхмакропористые* (губчатые) системы с порами в десятки и сотни микрометров. Благодаря такой морфологии криогелей возможно решение многих биотехнологических задач, т. к. биологические частицы могут проникать в объем материала, а не контактировать лишь с поверхностью полимерной матрицы.

One of the intensively developing directions in polymer science is the design of new specific materials for biotechnology. In particular, polymer systems should be non-toxic and biocompatible, stable or, in contrast, biodegraded under the control, with sufficient mechanical resistance, and very often together with macroporous structure. The latter quality is necessary when working with biological nano- and microparticles (biopolymer complexes, viruses, organelles, whole cells), in order to make the polymer matrix porosity capable of “big” biological particle penetration into the material mass and interaction with its components along the volume. The problem of polymer carrier porosity is actual for biocatalytic system, immobilized enzymes or the whole cells, for example, as well as in case of bioaffine sorbents to isolate and purify the very big objects (viruses and cells). Nowadays there are designed the ultraporous volumetric embeddings for animal cell culturing and elaborated the implants, comprising the corresponding cells (stem ones, for example).

The so-called *cryogels*: high porous gel materials, formed in superficially frozen medium, meet the most of requirements. The cryogel feature is the macroporosity, moreover its pores are interrelated. Depending on the properties and concentration of precursors, as well as the regimens of *cryotropic gel formation* it is possibly to obtain the cryogels of different chemical origin and porosity, such as: *macroporous* matrixes with pores of cross-section from deciles to units of micrometers and *ultramacroporous* (sponge) systems with pores in deciles and units of micrometers. Due to such a cryogel morphology it is possible to solve many biotechnological tasks, i. e. biological particles may penetrate into material volume, but not contact with polymer matrix surface only.

Сохранность жизнеспособности и морфофункциональных свойств бифидобактерий при криоконсервации в питательных средах

А.В. СИДОРЕНКО¹, Г.И. НОВИК¹, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Keeping of Viability and Morphofunctional Properties of Bifidus Bacteria During Cryopreservation in Nutrient Media

A.V. SIDORENKO¹, G.I. NOVIK¹, I.P. VYSEKANTSEV²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Исследована сохранность жизнеспособности, морфологических и функциональных свойств бифидобактерий после кратковременной криоконсервации в стерильной питательной среде MRS-C, традиционно используемой для культивирования данных микроорганизмов.

Установлено, что после замораживания в среде MRS-C количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в суспензии достоверно не изменялось, и не зависело от видовой принадлежности культур. Снижение скорости роста и удлинение лаг-фазы при развитии периодических культур бифидобактерий после замораживания не отмечались. Показатели накопления биомассы и активности кислотообразования, полученные при культивировании криоконсервированных клеток, статистически значимо не отличались от интактных культур. Снижения активности развития бифидобактерий в молоке после криоконсервации не наблюдалось: культуры сквашивали стерильное молоко через 12–18 ч культивирования, в зависимости от штамма, с образованием плотного сгустка без отделения сыворотки. Показатели активной кислотности (рН 3,5–4,2) и титр клеток ($2-5 \times 10^8 \dots 1-3 \times 10^9$ КОЕ/мл) в сквашенном молоке варьировали в зависимости от штаммовой принадлежности и не отличались от величин, характерных для интактных культур. Морфологические свойства бифидобактерий под влиянием криоконсервации существенных изменений не претерпевали. При посеве последовательных разведений в тиогликолевую среду бифидобактерии образовывали характерные белые колонии диаметром 1–3 мм в виде гречишных зерен, гвоздиков или комет. При микроскопическом исследовании установлено, что бифидобактерии представляли собой прямые или слегка изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах. Наблюдалось одиночное, парное, V- или Y-образное расположение клеток.

Установлено, что чувствительность бифидобактерий к тепловому и кислотному шоку после криоконсервации существенно не изменялась. Достоверного изменения антибиотикочувствительности бифидобактерий после криоконсервации также не было выявлено. Спектр сбраживаемых углеводов после замораживания не изменялся: все исследуемые культуры ферментировали глюкозу, галактозу, лактозу и фруктозу. Динамика развития бифидобактерий на средах с разными сахарами после криоконсервации достоверно не изменялась. Показатели накопления биомассы и активности кислотообразования, полученные при культивировании криоконсервированных клеток в питательной среде с рН 5,0, не отличались от величин, полученных для интактных клеток.

Таким образом, питательная среда MRS-C является эффективной защитной средой, обеспечивающей сохранность исходной жизнеспособности и морфофункциональных свойств бифидобактерий при криоконсервации.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № B07K-024.

The keeping viability and morphological and functional properties of bifidus bacteria after short-term freeze-thawing in MRS-C sterile nutrient medium, traditionally used for culturing of these microorganisms has been investigated.

It has been established that after freezing in MRS-C medium number of viable cells of bifidus bacteria in suspension did not change significantly, and did not depend on cultured cell stain. The reduction of growth rate and extension of lag phase at the development of periodical cultures of bifidus bacteria after freezing was not noted. The indices of biomass accumulation and activity of acid-formation derived during culturing of frozen-thawed cells statistically and significantly did not differ from the intact cultures. The reduction of activity of bifidus bacteria development in milk after freeze-thawing was not observed: the cultures soured the sterile milk in 12–18 hrs of culturing in dependence on a strain with the formation of dense clump without serum separation. The indices of active acidity (pH 3.5–4.2) and cell titer ($2-5 \times 10^8 \dots 1-3 \times 10^9$ CFU/ml) in soured milk varied in dependence on strain but did not differ from the corresponding values of intact cultures of the same strains. The morphologic properties of bifidus bacteria under the effect of cryopreservation were not changed significantly. During inoculation of serial dilutions into thioglycolic medium bifidus bacteria formed the specific white colonies of 1–3 mm diameter as buckwheat grains, tacks or comets. Microscopic investigation revealed that bifidus bacteria were as straight or slightly curved sticks with clavate bulbs on the tips. The location of cells as single, double, V- or Y-shaped was observed.

It has been established that sensibility of bifidus bacteria to heat and acid shock after freeze-thawing did not change significantly. No significant change of bifidus bacteria antibiotic sensibility after freeze-thawing has been manifested. Spectrum of fermented carbohydrates after freezing did not change: all investigated cultures fermented glucose, galactose, lactose and fructose. Dynamics of bifidus bacteria development in media with different sucroses after cryopreservation did not change significantly. The indices of biomass accumulation and acid formation, derived during culturing of cryopreserved cells in nutrient medium with pH 5.0 did not change from the values, derived for the intact cells.

Thus, MRS-C nutrient medium is effective protective medium, providing survival of initial viability and morphofunctional properties of bifidus bacteria during cryopreservation.

The work has been carried out with financial support from Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant №B07K-024.

Повреждение охлаждаемых биообъектов за счет образования криоколлоидных фракций

А.И. ОСЕЦКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Damage of Biological Objects Under Cooling Due to Formation of Cryocolloid Fractions

A.I. OSETSKY

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В современных представлениях о повреждении криоконсервируемых биообъектов за счет кристаллизации воды превалирует точка зрения о том, что основные механизмы таких повреждений действуют в температурных интервалах, лежащих значительно выше температуры стеклования T_g . Во многом это обусловлено попытками трактовать кристаллизацию водных растворов криопротекторных веществ в рамках классических диаграмм эвтектического типа, что предполагает завершение процессов льдообразования при температурах $T_{eut} \gg T_g$. Однако реально наблюдаемые процессы существенно отличаются от эвтектической кристаллизации: фазовый переход “вода-лед” протекает вплоть до температуры T_g , значительная часть молекул воды не кристаллизуется и переходит в аморфное состояние, в процессе охлаждения криопротекторных растворов и биообъектов может образовываться новая криоколлоидная фаза, состоящая из нанокристаллов льда и комплексов “вода – криопротекторное вещество” строго определенного состава.

В работе проанализированы основные причины таких отличий и определены правила построения реальных неравновесных диаграмм состояния охлаждаемых криопротекторных растворов. Показано, как на основе результатов по объемной сканирующей тензодилатометрии и термопластическому анализу установить параметры области существования криоколлоидной фазы на диаграммах состояния различных криопротекторных веществ. Рассмотрен новый метод определения количества сильносвязанной воды m_A , переходящей в аморфное состояние в составе комплексов “вода – криопротектор”. Установлены значения m_A для водных растворов глицерина и ПЭО-1500.

На основе полученных данных сформулированы возможные механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов вблизи температур стеклования и рассмотрены варианты их ингибирования.

The point of view, that main mechanisms of damages of the biological objects under cryopreservation take place within the temperature intervals being significantly higher the vitrification temperature T_g , prevails in contemporary notions about these damages due to water crystallization. Mainly this is stipulated with the attempts to interpret the crystallization of aqueous solutions of cryoprotective agents within the frames of classic diagrams of eutectic type, that supposes the competing of ice formation processes at $T_{eut} \gg T_g$. However actually observed processes significantly differ from eutectic crystallization: phase transition “water-ice” proceeds up to the temperature T_g , major part of water molecules is not crystallized and transforms into amorphous state, during the cooling of cryoprotective solutions and biological objects a new cryocolloid fraction consisting of ice nanocrystals and “water – cryoprotective substance” complexes of strictly certain composition may form.

In the research there were analyzed basic causes of these differences and the rules of building of metastable state diagrams of the cryoprotective agents to be cooled were defined. The way of establishing the parameters of the existing area of cryocolloid phase in diagrams of state of different cryoprotective agents has been shown on the basis of the results on volumetric scanning tensodilatometry and thermoplastic analysis. New method of determining of the amount of strongly bound water m_A , transforming into amorphous state as a component of the “water-cryoprotectant” complex has been examined. The values m_A for aqueous solutions of glycerol and PEO-1500 have been found.

With basing of the obtained results, there were defined the possible mechanisms of damage of biological objects under cryopreservation near the vitrification temperatures and the variants of their inhibiting were considered.

Механізми проникності клітинних мембран для води і кріопротекторів

О.І. ГОРДІЄНКО, О.В. ДАВИДОВА, О.В. САКУН

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Mechanisms of Cell Membrane Permeability for Water and Cryoprotectants

O.I. GORDIENKO, O.V. DAVYDOVA, O.V. SAKUN

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Проникність клітинних мембран для кріопротекторів є пасивною. В той же час, якщо кріопротекторна речовина задіяна в процесах метаболізму клітини, її проникання в клітину може забезпечуватись спеціальними механізмами. Пасивна проникність клітинної мембрани для кожної конкретної речовини визначається фізико-хімічними властивостями молекул цієї речовини.

Мета роботи – вивчення проникності мембран еритроцитів людини та дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* до низки кріопротекторів. Широкий спектр досліджених речовин обумовив можливість порівняти фізико-хімічні властивості молекул в гомологічних рядах та серед структурних ізомерів і з'ясувати вплив цих властивостей на їх проникність крізь біологічні мембрани.

В результаті проведених досліджень показано, що малі гідрофільні молекули (діаметром приблизно до 4Å) вільно проникають крізь водні канали, утворені білковими структурами в мембрані еритроцита людини. В деякій мірі вони проникають також і крізь ліпідну фазу. При зростанні ліпофільності молекул збільшується ймовірність їх проникання крізь ліпідну фазу. В той же час проникання крізь ліпідний бішар характеризується більшим значенням енергії активації. Цілком можливо, що механізм проникання малих гідрофільних молекул крізь ліпідний бішар відрізняється від механізму проникання ліпофільних молекул шляхом розчинення безпосередньо в ліпідній фазі. Але в цих випадках розмір молекул також може впливати на коефіцієнт проникності: в першому випадку – через обмеження розмірів флукуаційних гідрофільних пор або дефектів у ліпідному бішарі, в другому – внаслідок залежності енергії переходу з однієї фази в іншу від площі поверхні молекули. Аналіз результатів дослідження впливу температури на проникність мембран еритроцитів для кріопротекторів свідчить про існування термоіндукованих змін енергії активації проникності еритроцитарних мембран при температурах 8–12, 18–20 та 25–30°C. Визначені температури зломів ареніусових залежностей знаходяться в інтервалах температур, відомих як критичні, де відбуваються зміни швидкостей багатьох біологічних процесів, пов'язаних із мембранами еритроцитів. За температурними залежностями визначені енергії активації процесу переносу кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів та дріжджів. Відомо, що гліцерин є суттєвим компонентом метаболізму дріжджових клітин, а їх мембрани містять спеціалізовані канали транспорту гліцерину і води. Це підтверджується нижчими значеннями енергії активації проникання гліцерину у дріжджові клітини порівняно з еритроцитами людини (26 та 40 кДж/моль відповідно).

Cell membrane permeability for cryoprotectants is passive. At the same time if cryoprotective substance is involved in cell metabolic processes, its permeability into a cell may be provided by special mechanisms. Passive permeability of cell membrane for each substance is determined by physical and chemical properties of this substance molecules.

The research was aimed to study the membrane permeability in human erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells for some cryoprotectants. A wide range of substances under study stipulated the possibility to compare physical and chemical properties of molecules in homologous series and among structural isomers and to find-out the effect of these peculiarities on their permeability through biological membranes.

As a result of the research performed, the small hydrophil molecules (of about 4Å diameter) were shown as easily penetrating through water channels, formed by protein structures in human erythrocyte membrane. They penetrate in some extent through a lipid phase as well. With an increase in molecule lipophilicity, the probability of their penetration through lipid phase augments as well. At the same time the penetration through lipid bilayer is characterised by a high value of activation energy. It is fully possible that the penetration mechanism of small hydrophil molecules through a lipid bilayer differs from that of lipophil molecules via dissolving directly in a lipid phase. However in these cases the molecule size may also affect the permeability coefficient: via limiting sizes of fluctuating hydrophil pores or defects in lipid bilayer in the first case and as a result of the dependency of transition energy from one phase into another on the molecular surface area in the second one. The analysis of investigation results of temperature effect on erythrocyte membrane permeability for cryoprotectants testifies to the existing of heat-induced changes in activation energy of erythrocyte membrane permeability at 8–12, 18–20 and 25–30°C. The revealed temperatures of kinks on Arrhenius dependencies are within the temperature range, known as critical, where the changes in the rates of many biological processes, associated to erythrocyte membranes, occur. The activation energies of cryoprotectant transfer process through erythrocyte and yeast membranes have been determined by temperature dependencies. Glycerol is known as the essential component of metabolism in yeast cells and their membranes contain the specialised channels for glycerol and water transport. This is confirmed by lower values of activation energy of glycerol penetration into yeast cells than in human erythrocytes (26 and 40 kJ/mol, correspondingly).

Перспективы применения оксида азота, оксида углерода, сероводорода и озона в криобиологии

В.Д. ЗИНЧЕНКО, И.А. БУРЯК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Perspectives of Application of Nitrogen Oxide, Carbonic Oxide, Hydrogen Sulfide and Ozone Application in Cryobiology

V.D. ZINCHENKO, I.A. BURYAK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Оксид азота (NO), оксид углерода (CO) и сероводород (H₂S) – газы, потенциально токсичные в высоких концентрациях, в малых же количествах они являются необходимыми медиаторами в организме. Оксид азота – уникальная сигнальная молекула, принимающая участие в регуляции мышечных ритмов, передаче нервных импульсов, дифференцировке стволовых клеток, а также являющаяся вазодилатором. Это свойство NO используется в клинической практике.

Сероводород, синтезируемый в организме из L-цистеина, может дополнять действие NO при поддержании нормального давления в сосудах.

Ингаляция CO в низких дозах способствует снижению воспаления в поврежденных скелетных мышцах.

В последние годы в некоторых криобиологических лабораториях проводятся альтернативные исследования индуцирования гипометаболизма и толерантности к гипоксии с применением CO и H₂S. Применение CO на эмбрионах *Caenorhabditis elegans* при среднем уровне гипоксии приводило к модуляции выработки энергии по анаэробному пути и повышению уровня антиоксидантов. Оксид углерода используется для стабилизации эритроцитов в технологическом цикле их криоконсервирования.

Опубликована серия экспериментов по применению H₂S для создания гипометаболизма и толерантности к гипотермии у мышей.

Было показано, что обработка эритроцитов веществами, продуктом реакции которых является NO, в некоторых оптимальных концентрациях повышала деформируемость эритроцитов.

Биологическое действие озона (O₃) можно сравнить с действием описанных выше газов. Токсичный в высоких дозах, в низких дозах O₃ вызывает стимуляцию различных физиологических функций биологических объектов.

Нами были выполнены экспериментальные исследования возможностей применения O₃ для повышения эффективности криоконсервирования клеток. Было обнаружено повышение жизнеспособности микроорганизмов *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, а также повышение осмотической устойчивости эритроцитов под действием низких доз O₃ после замораживания-оттаивания.

Известные к настоящему времени результаты дают основание полагать, что биологические эффекты низких доз NO, CO, H₂S и озона требуют дальнейшего систематического исследования для применения их в криобиологии.

Nitrogen oxide (NO), carbonic oxide (CO), hydrogen sulfide (H₂S) gases are potentially toxic in high concentrations, but in low ones they are essential mediators in an organism. Nitrogen oxide is unique signal molecule, taking part in regulation of muscular rhythms, transition of nerve impulses, differentiation of stem cells, and is a vasodilator. This property of nitrogen oxide is used in clinical practice.

Hydrogen sulfide, synthesized from L-cysteine, in an organism may complete the NO activity at maintenance of normal pressure in vessels.

Inhalation of CO in low doses contributes to inflammation reducing in damaged skeletal muscles.

Recently in some cryobiological laboratories the alternative researches of hypometabolism and tolerance induction to hypoxia with CO and H₂S were carried out. Application of CO in *Caenorhabditis elegans* embryos at the average level of hypoxia results in modulation of energy generation for the anaerobic pathway and increasing of antioxidants' level. The carbonic oxide is used for the erythrocytes' stabilisation in technologic cycle of their cryopreservation.

Series of experiments of H₂S application for formation of hypometabolism and tolerance to hypothermia in mice were published.

It has been shown that the treatment of erythrocytes with substances, which reaction product is NO, increases the erythrocytes deformability under some optimal concentrations.

One may compare the biological ozone (O₃) activity with the one of gases described above. O₃ which is toxic in high doses, but in low doses triggers the stimulation of different physiological functions of biological objects.

The experimental researches of O₃ application possibility for increasing of efficiency of cell cryopreservation were carried out by us. The viability increase of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* microorganisms, and rise of erythrocyte osmotic resistance under the action of O₃ low doses after freeze-thawing were found out. The results known today suggest that the biological effects of low doses of NO, CO, H₂S and ozone require the further systematic research for their application in cryobiology.

Влияние низкотемпературного хранения плаценты на свойства ее экстрактов

О.А. НАРДИД, Е.Д. РОЗАНОВА, Л.В. ЦЫМБАЛ, С.В. РЕПИНА, Е.И. НАУМЕНКО,
Д.Н. ПОГОЖИХ, Н.Т. МАРКОВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low-Temperature Storage of Placenta on Its Extract Properties

NARDID O.A., ROZANOVA E.D., TSYMBAL L.V., REPINA S.V.,
NAUMENKO E.I., POGOZHNIK D.N., MARKOVA N.T., VYSEKANTSEV I.P.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Плацента человека и препараты из нее широко применяются в разных отраслях медицины. Существенным ограничением для использования в клинической практике плацентарного материала является небольшой срок его хранения вследствие автолиза даже в условиях гипотермии. Разработка методов низкотемпературного хранения позволяет расширить перспективы использования ткани плаценты в медицине.

В работе представлены результаты сравнительного исследования состава и свойств водно-солевых экстрактов, полученных из свежей и хранящейся при -20 и -196°C ткани плаценты человека. В качестве параметров, характеризующих экстракты плаценты человека (ЭПЧ), использовали концентрацию и распределение по молекулярным массам белков, содержание продуктов перекисного окисления, каталазную активность, степень окисленности гемового железа. Чтобы охарактеризовать биологическое действие ЭПЧ, изучали их влияние на структурно-функциональные параметры различных клеток: эритроцитов, СПЭВ и фибробластов.

Показано, что взаимодействие компонентов ЭПЧ проявляется на состоянии мембран и цитозоля клеток. Хранение тканей плаценты при -196°C в течение года позволяет получать ЭПЧ, в которых сохраняется способность оказывать стабилизирующее действие на клетки: повышать кислотную и осмотическую устойчивость и стабилизировать состояние цитозоля эритроцитов, повышать осмотическую устойчивость клеток СПЭВ и фибробластов, активизировать процессы дыхания в клетках СПЭВ и фибробластах. В то же время низкотемпературное хранение тканей значительно снижает мембранотропное действие, которое наблюдается у некоторых ЭПЧ, полученных из свежих тканей.

Экстракты плаценты человека, выделенные из тканей, хранящихся в течение 1 месяца при -20°C , проявляют такие же свойства, как и ЭПЧ, полученные из тканей, хранившихся при -196°C . Более длительное хранение при -20°C приводит к снижению стабилизирующего действия экстрактов, а после 3 месяцев хранения их свойства проявляют дестабилизирующее действие на клетки.

Human placenta and preparations derived from it are widely used in different branches of medicine. The significant limitation for the application of placental material in clinical practice is a short term of its storage due to autolysis even at hypothermia conditions. Investigation of low-temperature storage methods enables to extend the perspectives of placenta tissue application in medicine.

In the work the results of comparative study of the content and properties of water-saline extracts, obtained from fresh and stored at -20 and -196°C human placenta tissue, have been shown. As the parameters, characterizing the human placenta extracts (HPE), the concentration and distribution on molecular masses of proteins, the content of peroxidation products, catalase activity, oxidation level of heme iron were used. To characterize biological activity of HPE, their effect on structure-functional parameters of different cells: erythrocytes, SPEV and fibroblasts were studied.

It has been shown that the interaction of HPE components is manifested in membrane and cell cytosol conditions. The storage of placenta tissues at -196°C for a year enables to derive the HPE, in which there is preserve an ability to have a stabilizing activity on cells: to increase acid and osmotic resistance, to stabilize the condition of cytosol erythrocytes, to increase the osmotic resistance of SPEV and fibroblast cells, to activate respiration processes in SPEV and fibroblast cells. At the same time the low-temperature storage of tissues considerably decreases the membrane-tropic activity, observed in some HPE, obtained from fresh tissues.

Human placenta extracts isolated from tissues stored for 1 month at -20°C exhibit the same properties, as HPE, obtained from the tissues, stored at -196°C . Longer storage at -20°C results in decrease of stabilizing activity of the extracts, but after 3 months' storage their properties storage exhibit the destabilizing activity on cells.

Криоконсервирование клеток редких субтипов лейкоза у мышей инбредной линии AKR/JY

А.А. КОСТЯЕВ, Н.М. ПОЗДЕЕВ, Л.К. КОВАЛЕВА, С.В. УТЕМОВ, Н.Л. ЕЖОВА,
Ю.В. ЗИНОВЬЕВ, Н.В. РЯБОВ, С.А. КОЗЛОВ
Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Cryopreservation of Cells of Rare Sub-Types of Leucosis in AKR/JY Inbred Mice

A.A. KOSTYAEV, N.M. POZDEEV, L.K. KOVALEVA, S.V. UTEMOV, N.L. EZHOVA,
YU.V. ZINOVYEV, N.V. RYABOV, S.A. KOZLOV
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В результате экспериментальных исследований на мышцах инбредной линии AKR/JY были диагностированы: миелобластный (5%), пролимфоцитарный (0,8%), монобластный (2%) и мегакариоцитарный (менее 1%) варианты лейкоза. Редкое распространение выявленных вариантов лейкоза обусловило необходимость их сохранения в виде перевиваемых штаммов.

Цель – определить возможность использования метода криоконсервирования для долгосрочного хранения опухолевых клеток мышей инбредной линии AKR/JY.

Опыты проведены на 20 мышцах линии AKR/JY двух полов, поколений (F) 208 – 214, массой тела от 20 до 30 г.

При появлении признаков спонтанного лейкоза животных выводили из эксперимента путем декапитации. Из селезенки готовили 6%-ю клеточную суспензию. Подсчитывали количество ядродержащих клеток, оценивали их жизнеспособность по Шреку. После смешивания суспензии клеток с криопротектором (5%-й раствор диметилсульфоксида) криопробирки с биообъектом помещали в пары жидкого азота (–140°C) для последующего хранения. По истечении 10 дней образцы с клеточной суспензией отогревали на водяной бане, отмывали от криопротектора, центрифугировали и осевшие клетки ресуспендировали в 1 мл полиглюкина. В подготовленном образце подсчитывали количество ядродержащих клеток, определяли их жизнеспособность, затем клеточную взвесь вводили здоровым мышам линии AKR/JY. При появлении признаков перевивного лейкоза мышей выводили из эксперимента и проводили морфологическую оценку субтипа лейкозного процесса.

Заморожено 23 образца 6%-й суспензии клеток селезенки мышей инбредной линии AKR/JY, из них 5 – образцы пролимфоцитарного лейкоза, 5 – монобластного и 13 – миелобластного. Разморожено и перевито 7-и здоровым мышам линии AKR/JY 4 образца, из которых 3 – образцы монобластного лейкоза и 1 – миелобластного. После инокуляции размороженных опухолевых клеток у всех животных развился перевивной лейкоз. Исследование мазков-отпечатков свидетельствовало об идентичности морфологической картины органов у мышей-доноров опухолевых клеток морфологическим признакам лейкозного процесса у мышей-реципиентов.

Таким образом, использование метода криоконсервирования клеточного материала позволяет сохранить редкие субтипы лейкозов мышей инбредной линии AKR/JY в течение длительного времени.

As a result of experimental studied in AKR/JY inbred mice there were diagnosed: myeloblast (5%), prolymphocyte (0.8%), monoblast (2%) and megakaryocyte variants of leucosis (under 1%). Rare distribution of the revealed leucosis variants stipulated the necessity of their preservation as the passaged strains.

The aim was to determine the possible use of the cryopreservation method for long-term storage of tumour cells of AKR/JY inbred mice.

The experiments were carried out in 20 AKR/JY mice of both sexes, of generations (F) 208-214, with the body weight from 20 to 30g.

At the appearance of the signs of spontaneous leucosis the animals were decapitated. The suspension of 6% was prepared from the spleen. The number of nucleated cells was counted, their viability was assessed according to Schreck. After mixing the cell suspension with cryoprotectants (5% dimethyl sulfoxide solution), the cryovials with biological object were placed into the vapours of liquid nitrogen (–140°C) for following storage. Ten days later the samples with cell suspension were thawed on water bath, washed out from cryoprotectant, centrifuged and sedimented cells were resuspended in 1 ml of polyglucin. In the prepared sample the number of nucleated cells was counted, their viability was examined, afterwards cell suspension was introduced to healthy AKR/JY mice. At the appearance of the signs of passaged leucosis the mice were decapitated and sub-type of leucosis process was morphologically assessed.

There were frozen 23 assays of 6% spleen cell suspension of AKR/JY mice, 5 among them were the samples of prolymphocyte leucosis, 5 of monoblast one and 13 of myeloblast leucosis. There were thawed and passaged 4 samples to 7 healthy AKR/JY mice, 3 of them were the samples of monoblast leucosis and 1 of myeloblast. After inoculation of thawed tumour cells in all animals the inoculated leucosis developed. The investigation of the smear prints testified to identity of morphological pictures for the organs of mice, the donors of tumour cells to morphological principles of leucosis process in recipient's mice.

Thus the use of cryopreservation method of cell material enables to preserve rare subtypes of leucosis in AKR/JY mice for a long time.

Влияние замораживания на сохранность культур клеток, полученных из эмбрионов мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка

И.В. САВИНЦЕВА, А.А. СМЕРНОВ, Н.Ю. САХАРОВА, Б.К. ГАВРИЛЮК

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушино

Freezing Effect on Integrity of Cell Cultures, Derived from Murine Embryos with Enhanced Green Fluorescent Protein Gene

I.V. SAVINTSEVA, A.A. SMIRNOV, N.YU. SAKHAROVA, B.K. GAVRILYUK

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Клетки животных, содержащих в геноме трансген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP), являются перспективным материалом для получения клеточных и тканевых культур. EGFP – клеточный маркер, который позволяет длительно наблюдать за конкретными клетками при культивировании. Для серийных экспериментов клетки желательно сохранять в криобанке. В связи с этим необходимо исследовать влияние низких температур на состояние EGFP и способность клеток, перенесших процедуры замораживания-размораживания, и экспрессировать этот белок. Мы изучали экспрессию EGFP в эмбриональных клетках после их замораживания по стандартной методике и хранения при температуре -196°C .

В первой серии экспериментов использовали культуру клеток, полученных из кожно-мышечной ткани 14-дневных эмбрионов гемизиготных самок линии C57BL/6-Tgn(АСТbEGFP)10sb-J после их скрещивания с самцами исходной линии C57BL/6, не несущими гена EGFP (–/–). Эмбриональные фибробластоподобные клетки, прошедшие 2-3 пассажа, помещали в криобирки объемом 1,8 мл. Замораживание проводили в специальной камере для криоконсервации до $-40\dots-50^{\circ}\text{C}$, затем объекты переносили в сосуд Дьюара. Образцы хранили в жидком азоте от 24 часов до 10 месяцев. После оттаивания жизнеспособность клеток оценивали под микроскопом по состоянию их морфологической целостности, степени адгезии и расплывания, а также по пролиферативной активности. Показано, что хранение в жидком азоте не отражалось на способности мышечных фибробластоподобных клеток экспрессировать EGFP. Интенсивно светящиеся клетки были характерны для культур как непосредственно после оттаивания, так и после нескольких пассажей при дальнейшем культивировании. Полученные после размораживания клетки могли быть использованы в различных экспериментах вплоть до 9-10 пассажа.

Во второй серии проводили замораживание 2-клеточных эмбрионов, полученных от самок –/EGFP после спаривания с самцами –/–. Такие эмбрионы содержат EGFP, синтезированный ещё в ооцитах гемизиготной самки. Экспрессия же собственного гена EGFP начинается на стадии 8 бластомеров во время компактизации. Таким образом, в этих опытах мы изучали действие криоконсервации на белок материнского происхождения. После размораживания в 2-клеточных зародышах не было обнаружено свечения EGFP, что, по-видимому, свидетельствует о его денатурации.

Сравнение этих данных, которые носят предварительный характер, с данными, полученными в опытах по замораживанию клеток 14-дневных эмбрионов, показывает, что материнский “зеленый” белок, содержащийся в клетках ранних эмбрионов, может быть менее устойчивым в условиях криоконсервации, чем белок, экспрессированный на собственных матрицах.

Animal cells, having transgene of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in genome, are the perspective material to obtain cell and tissue cultures. EGFP is a cell marker, enabling a long-term observation for particular cells during culturing. For experimental sessions cells are advisable to be stored in cryobank. Due to this fact of necessary is to investigate the way of low temperature influence on EGFP state and the capability of cells, underwent the freeze-thawing procedure, to express this protein. We have studied the EGFP expression in embryonic cells after their freezing according to the standard technique and storage at -196°C .

In the first experimental session we have used the cell culture, derived from skin-muscle tissue of 14 days' embryos of C57BL/6-Tgn(АСТbEGFP)10sb-J hemizygous females after their crossing with males of C57BL/6 initial line without EGFP gene (–/–). Embryonic fibroblast-like cells, underwent 2-3 passages, were placed into 1.8 ml cryovials. Freezing was carried-out in a special chamber for cryopreservation down to $-40\dots-50^{\circ}\text{C}$ with following object transfer into Dewar vessel. Samples were stored in liquid nitrogen from 24 hrs to 10 months. After thawing we have microscopically assessed the cell viability by the state of morphological integrity, adhesion and flattening degrees, proliferative activity as well. Storage in liquid nitrogen was shown as not reflecting on the capability of murine fibroblast-like cells to express EGFP. Cells with an intensive luminescence were typical for cultures both right after thawing and after some passages during following culturing. Cells, procured after freeze-thawing might be used in different experiments up to 9-10 passages.

The 2-cell embryos, procured in females –/EGFP after coupling with males –/–, were frozen in the second session. Such embryos contain EGFP, synthesized even in oocytes of hemizygous female. Expression of the own EGFP gene begins at 8 blastomeres' stage during compactisation. Thus, in these experiments we have studied the cryopreservation effect on protein of maternal origin. No EGFP fluorescence was revealed in 2-cell embryos after thawed, that apparently testified to its denaturation.

The comparison of these data of preliminary character with those, obtained in experiments on freezing cells of 14 days' embryos demonstrates the mother “green” protein, containing in cells of early embryos, as less resistant under cryopreservation condition, than the protein, expressed on the own matrices.

Влияние проникающих криопротекторов на осмотическую устойчивость и электрические параметры ооцитов мыши

Е.И. СМОЛЯНИНОВА¹, В.А. ШИГИМАГА², Е.В. ДАВЫДОВА¹,
А.А. КОЛЕСНИКОВА², Е.Г. ЛИСИНА², Е.А. ГОРДИЕНКО¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Институт животноводства УААН, п. Кулинич, Харьковская обл.

Effect of Penetrating Cryoprotectants on Osmotic Resistance and Electric Parameters of Murine Oocytes

E.I. SMOLYANINOVA¹, V.A. SHIGIMAGA², E.V. DAVYDOVA¹,
A.A. KOLESNIKOVA², E.G. LISINA², E.A. GORDIENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Cattle Breeding Institute of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kulinichi, Kharkov Region, Ukraine

Поиск путей оптимизации программ криоконсервирования ооцитов млекопитающих тесно связан с исследованиями, направленными на поиск эффективных криопротекторов и снижение их токсичного влияния на клетки. Однако критериев, по которым можно вести предварительный отбор эффективных криопротекторов, недостаточно, что обусловлено отсутствием адекватных методических подходов к исследованию комплексного влияния криопротекторов на мембранные и цитоплазматические структуры клетки.

Цель работы – исследование влияния проникающих криопротекторов на осмотическую устойчивость и электрическую проводимость ооцитов мыши.

Методом световой микроскопии и теоретического моделирования исследовано осмотическое поведение ооцитов мыши МП в 1,0 М растворах наиболее часто используемых в практике криоконсервирования криозащитных веществ: сахарозы, этиленгликоля, глицерина, 1,2-пропандиола, ацетамида, диметилсульфоксида, а также определены коэффициенты проницаемости их плазматических мембран для указанных веществ. Методом электропорации определяли зависимость электрической проводимости ооцитов мыши в процессе их эквипотенциации в указанных растворах от величины напряженности приложенного электрического поля. Показано, что проводимость ооцитов мыши возрастает с увеличением амплитуды прикладываемого импульса, причем характер этой зависимости близок к линейному. Следует отметить, что ооциты мыши, экспонированные в растворах исследуемых криопротекторов, обладают различной устойчивостью к действию импульсного электрического поля. Этиленгликоль и ацетамид, несмотря на практически одинаковую их способность проникать через плазматические мембраны ооцитов мыши ($K_p = 0,95 \times 10^{-7}$ м/с и $K_p = 0,78 \times 10^{-7}$ м/с), оказывают различное влияние на ооциты, что отражается на их устойчивости к действию электрического импульса. На основе фундаментальных положений теории упругости тонких оболочек, электродинамики и биофизики построена теоретическая модель электрического пробоя клеточных мембран. Установлена количественная зависимость между напряжением электрического поля на мембране клетки и ее модулем упругости. Различная устойчивость клеточных мембран к электрическому пробоя в растворах криопротекторов объясняется их влиянием на модуль изотропного растяжения плазматической мембраны.

The search for ways to optimise the cryopreservation programs for mammalian oocytes is tightly related to the researches, oriented to select the efficient cryoprotectants and reduce their toxic effect on cells. However, there is an insufficient number of criteria for preliminary selection of efficient cryoprotectants, stipulated by the absence of any adequate methodical approach in studying a combined effect of cryoprotectants on membrane and cytoplasm cell structures.

The research was targeted to investigate the effect of penetrative cryoprotectants on an osmotic resistance and electric conductivity of murine oocytes.

An osmotic behaviour of murine oocytes MII in 1.0 M solutions of cryoprotective substances, being most frequently used in cryopreservation practice such as: sucrose, ethylene glycol, glycerol, 1,2-propanediol, acetamide, dimethyl sulfoxide (DMSO), has been investigated with light microscopy and theoretic modelling methods, as well as the permeability coefficients of their plasmatic membranes for the mentioned substances have been determined. The dependency of electrical conductivity of murine oocytes during equilibration in the mentioned solutions on the applied electric field intensity value has been detected with electroporation method. Murine oocyte conductivity was shown as increasing with amplitude augmentation of the applied impulse, moreover this dependency character was close to a linear one. Of note is the fact that the murine oocytes, exposed to the studied cryoprotectant solutions have different resistance to the impulse electric field effect. Ethylene glycol and acetamide in spite of their quite an equal ability to penetrate through plasmatic membranes of murine oocytes ($C_p = 0.95 \times 10^{-7}$ m/sec and $C_p = 0.78 \times 10^{-7}$ m/sec) differently affect the oocytes, that is reflected on their electric impulse resistance. Basing on the fundamental statements of the elasticity theory of thin-walled shells, electrostatics and biophysics there was built a theoretic model of electric breakdown of cell membranes. Quantity dependency between electric field tension on cell membrane and its elasticity modulus has been established. Different cell membrane resistance to electric breakdown in cryoprotectant solution is explained by their effect on the modulus of plasmatic membrane isotrop tension.

Криохирurgia: новые механизмы повреждения биологической ткани *in vivo*

Н.Н. КОРПАН

Международный институт криохирургии, г. Вена, Австрия

Cryosurgery: The New Mechanisms of Biological Tissue Injury *in vivo*

N.N. KORPAN

International Institute for Cryosurgery, Department of Surgery, Rudolfinerhaus, Vienna, Austria

Многие теоретические и экспериментальные исследования как *in vitro*, так и *in vivo* проводились с целью объяснения действия низких температур на ткань. Очевидно, что температурные параметры, использованные ранее для замораживания при криохирургии, не были точны; возможно, это и было причиной неудач при лечении. Цель работы – описание ранних ультраструктурных особенностей паренхимы поджелудочной железы с использованием криохирургии *in vivo*.

Продемонстрировано воздействие процессов замораживания-оттаивания при различных температурах. В эксперименте использовали 48 животных. Исследовали ответную реакцию паренхимы поджелудочной железы на криохирургию.

Анализ с помощью электронной микроскопии показал, что после локальной криодеструкции при температурах -80 и -180°C сходные процессы происходят в ткани поджелудочной железы в раннюю посткриохирургическую фазу и в пределах суток после низкотемпературной экспозиции ткани. Экзокринные клетки поджелудочной железы в центре криозоны изменялись после размораживания. Увеличивались ультраструктурные изменения в экзокринных клетках, в которых были отмечены первые признаки дистрофических процессов. Такие ультраструктурные изменения в клетках поджелудочной железы обеспечивают лучшее понимание механизмов повреждения и патогенеза обмороживания после криохирургии. При криохирургии свойства ответной реакции паренхимы поджелудочной железы после низкотемпературного воздействия важны для понимании механизмов повреждения и криогенного патологического изменения после оттаивания.

Полученные данные подтверждают, что именно на клеточном уровне происходит внезапное и прогрессирующее повреждение клеток поджелудочной железы в посткриохирургической зоне, что приводит к асептическому крионекрозу, а затем и асептическому криоаптозу живой нормальной ткани. Изменения сосудистых капилляров и циркуляторная стагнация указывают на ангиогенезный механизм, который вместе с криоапонекрозом и криоаптозом являются основными механизмами повреждения биологической ткани после низкотемпературного воздействия.

A number of theoretical and experimental studies, both *in vitro* and *in vivo*, have been performed to explain the action of low temperatures on tissue. It is now evident that the thermal parameters used in the past for freezing during cryosurgery were not precise; this may have resulted in the failure of treatment. For the first time, this report describes the early ultrastructural features of pancreatic parenchyma after low temperature exposure, i.e. cryosurgery, *in vivo*.

We demonstrate the effect of freeze-thawing processes using temperatures of various intensities. 48 animals were used for the experiment. The cryosurgical response of pancreas parenchyma, i.e. ultra-structural cellular changes in pancreas tissue, was investigated.

The electronic microscopic analysis showed that, after local cryodestruction at temperatures of -80 and -180°C , similar processes occurred within the pancreas tissue in the early postcryosurgical phase – immediately and up to 24 hours after low temperature exposure on tissue. The exocrine pancreatic cells in the center of the cryozone changed upon thawing. Ultrastructural changes in the exocrine pancreatic cells, where the first signs of dystrophic processes had been noticed, were increased. These ultrastructural changes in the pancreatic cells provide a platform to better understand the mechanisms of damage and the pathogenesis of frostbite after cryosurgery. The properties of the pancreas parenchyma response after low temperature exposure provide important insights into the mechanisms of damage and the cryogenic lesion immediately after thawing in cryosurgery.

Our new insights prove on the cell level that suddenly and progressively damaged pancreatic cells in the postcryosurgical zone lead to aseptic cryonecrosis and then to aseptic cryoapoptosis of vital normal tissue. The vascular capillary changes and circulatory stagnation demonstrate the anti-angiogenesis mechanism, which, together with cryoaponecrosis and cryoapoptosis, are some of the main mechanisms of biological tissue injury following the low temperature exposure.

Морфологические и функциональные особенности кадаверной гемопоэтической ткани после 20-летней консервации при -196°C

А.А. КОСТЯЕВ, С.В. УТЕМОВ, Н.Л. ЕЖОВА, Н.В. ИСАЕВА
Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Morphological and Functional Peculiarities of Cadaveric Hemopoietic Tissue

After 20-years' Preservation at -196°C

A.A. KOSTYAEV, S.V. UTEMOV, N.L. EZHOVA, N.V. ISAYEVA
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В 80 годах XX столетия разрабатывали и широко использовали способы заготовки и длительного хранения биологического материала от кадаверов в ранние пост-мортальные сроки. На базе Кировского института до 1991 года был создан банк кадаверной гемопоэтической ткани (КГТ).

Цель настоящего исследования – изучение морфологических и функциональных особенностей КГТ после длительного (более 20 лет) хранения с криоконсервантом «Гемжел» в среде жидкого азота.

Были исследованы 7 образцов КГТ. До криоконсервирования жизнеспособные клетки в пробе с витальным красителем составляли от 60 до 91%, после размораживания – 58–89%. Количество восстановленных кадаверных миелокариоцитов после замораживания-отогревания было равным 82%. Морфологический анализ образцов показал, что для деконсервированных клеток характерны: вакуолизация цитоплазмы, снижение нейтрофильной зернистости, увеличение голядерных элементов. В то же время процентное содержание мононуклеаров в исходных и размороженных образцах было близким.

Содержание CD34-позитивных клеток варьировало от 0,47 до 0,53 %, жизнеспособность миелокариоцитов по показателю включения 7-AAD составляла 97,5–98,0%, что несколько ниже нормы. Нами было зарегистрировано снижение интенсивности экспрессии антигенов на размороженных миелокариоцитах, выявленное по показателю интенсивности флуоресценции.

При культивировании был получен стабильный рост клеток в 5 образцах из 7. Отмечен рост 2 видов колоний: гранулоцитарных и макрофагальных, в среднем 67,2 на 10^5 миелокариоцитов. Все клеточные агрегаты, включенные в подсчет, состояли из 100 и более клеток. Однако ни в одном образце не отмечен рост эритроидных колоний. Также не было обнаружено колоний смешанного типа, образующихся из наиболее ранних предшественников 2–5 кроветворных ростков.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки КГТ удовлетворительно переносят процесс криоконсервирования и длительное хранение в жидком азоте под защитой раствора «Гемжел», а миелокариоциты сохраняют способность к восстановлению гемопоэза.

In the 80s of 20 century there have been designed and widely applied the ways for procurement and long-term storage of biological material from cadavers in early post-mortal terms. At the base of Kirov Institute before 1991 there has been established the bank for cadaveric hemopoietic tissue (CHT).

This research was aimed to study the CHT morphological and functional peculiarities after a long-term storage (over 20 years) with “Haemgel” cryopreservative in a liquid nitrogen medium.

There were investigated 7 samples of CHT. Prior to cryopreservation and after thawing the amount of viable cells in a sample with vital dye was from 60 to 91% and 58-89%, correspondingly. The number of recovered cadaveric myelocaryocytes after freeze-thawing was 82%. Morpho-logical analysis of samples has shown the following features for frozen-thawed cells: cytoplasm vacuolisation, decrease in neutrophil granulation and increase in bare nuclear elements. At the same time a percentage content of mononuclears in the initial and frozen-thawed samples was close.

The content of CD34-positive cells varied from 0.47 to 0.53%, myelocaryocyte viability was 97.5–98.0% by 7-AAD inclusion index, that was slightly lower than the norm. We have recorded a decrease in the intensity of antigen expression to frozen-thawed myelocaryocytes, revealed by fluorescence intensity index.

During culturing there was obtained a stable cell growth in 5 samples from 7. The growth of 2 colony types: granulocytes and macrophages, in average 67.2 per 10^5 myelocaryocytes, was noted. All calculated cell aggregates consisted of 100 and more cells. However no sample was with growth of erythroid colonies. No colonies of mixed type, formed from the earliest precursors of 2-5 hemopoietic lineages, were found-out as well.

Thus, the results obtained testify to the fact that the CHT cells endure quite well cryopreservation and a long-term storage in liquid nitrogen under “Haemgel” solution and the myelocaryocytes preserve the capability of hemopoiesis recovery.

Модификация сахарозо-содержащего раствора для хранения печени

Д.В. ЧЕРКАШИНА¹, О.А. СЕМЕНЧЕНКО¹, Е.Н. ТКАЧЕВА¹, А.Ю. СОМОВ¹,
А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ¹, Б.ДЖ. ФУЛЛЕР², А.Ю. ПЕТРЕНКО¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²University Department of Surgery, Royal Free & UCL Medical School

Modification of Sucrose-Based Solution for Liver Storage

D.V. CHERKASHINA¹, O.A. SEMENCHENKO¹, E.N. TKACHEVA¹, A.YU. SOMOV¹,
A.S. LEBEDINSKY¹, B.J. FULLER², A.YU. PETRENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²University Department of Surgery, Royal Free & UCL Medical School

Сегодня не вызывает сомнений актуальность поиска новых и усовершенствования существующих сред для безопасного гипотермического хранения (ГХ) изолированных органов. Нами был разработан сахарозо-содержащий раствор (ССР), эффективность применения которого была показана при долгосрочном ГХ изолированных гепатоцитов и целой печени. Вместе с тем возможность его внедрения в клиническую практику лимитирована наличием двух компонентов: 1 – бычий сывороточный альбумин (БСА), обеспечивающий необходимое онкотическое и осмотическое давление, а также связывающий токсические продукты и свободные жирные кислоты, но обладающий иммуногенностью и повышающий вероятность закупорки мелких капилляров печени на этапе перфузии; 2 – трис-НС1 буфер, поддерживающий постоянство рН при хранении, но обладающий, по мнению некоторых авторов, способностью стимулировать тромбообразование и цитотоксичностью.

Цель работы – оценка корректности полноценной замены в составе ССР альбумина на высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ-8000) и трис-НС1 буфера на общепринятый – фосфатный.

В работе использовали белых беспородных крыс-самок. После перфузии печени *in situ* ее изолировали и помещали в растворы хранения, в состав которых входили: 1 – трис-НС1+БСА; 2 – трис-НС1+ПЭГ-8000; 3 – фосфатный буфер+БСА; 4 – фосфатный буфер + ПЭГ-8000. Содержание БСА и/или ПЭГ-8000 составляло 1%. Трис-НС1 и фосфатный буфер были эквимоларны. Исследования проводили после 1 или 18 ч ГХ органа, а также последующей реперфузии в течение 60 мин при 37°C. Степень повреждения органа оценивали по базальному уровню и скорости накопления ТБК-активных продуктов, а энергетическое состояние – по содержанию АТФ.

Показано, что независимо от состава раствора хранения уже после 1 ч ГХ в печени повышается базальный уровень ТБК-активных продуктов без изменения скорости их накопления. При этом содержание АТФ остается достаточно высоким. Продление сроков ГХ печени во всех типах растворов до 18 ч практически не влияло на базальный уровень ТБК-активных продуктов, в то время как скорость их накопления увеличивалась при проведении тепловой реперфузии, хотя в ССР на основе фосфатного буфера, содержащего ПЭГ-8000, это повышение было менее выражено. Аналогичная картина наблюдалась при исследовании содержания АТФ: после 18 ч ГХ значения были ниже, чем после 1 ч, эта ситуация усугублялась в ходе реперфузии, однако в указанной группе показатель был достоверно выше, чем в остальных.

Таким образом, состав раствора хранения может быть успешно модифицирован путем замены альбумина на ПЭГ-8000, а трис-НС1 – на фосфатный буфер.

Nowadays the relevance of search for novel and advanced existing media for safe hypothermic storage (HS) of isolated organs is beyond doubt. We have designed a sucrose-based solution (SBS), which application efficiency was shown under long-term HS of isolated hepatocytes and the whole liver. However the possibility of its introduction into a clinical practice is limited by the presence of two components: 1 – bovine serum albumin (BSA), providing a necessary oncotic and osmotic pressure, as well as binding toxic products and free fat acids, but having an immunogenicity and increasing the probability of liver small capillary blocking at perfusion stage; 2 – tris-HCl buffer, maintaining pH constancy under storage, but, as some authors believe, capable to stimulate the clottage and cytotoxicity.

The research was aimed to estimate the correctness of integral replacement of albumin as a part of SBS for a high molecular polyethylene glycol (PEG-8000) and tris-HCl buffer for the standard phosphate one.

White breedless female rats were used in the research. After *in situ* perfusion the liver was isolated and placed into the storage solutions, with the composition as follows: 1 – tris-HCl + BSA; 2 – tris-HCl + PEG-8000; 3 – phosphate buffer + BSA; 4 – phosphate buffer + PEG-8000. Content of BSA and/or PEG-8000 was 1%. Tris-HCl and phosphate buffer were equimolar. Studies were performed after 1 or 18 hrs of organ HS, as well as following reperfusion for 60 min at 37°C. Organ damage extent was estimated by a basal level and accumulation rate of TBA-active products and energetic state by ATP content.

It was shown that independently on storage solution composition even 1 hr after HS there was an increase in basal level of TBA-active products in liver with no change in their accumulation rate. At the same time the ATP content remains quite a high. The prolongation of liver HS terms in all types of solutions up to 18 hrs does not practically affect a basal level of TBA-active products, meanwhile the rate of their accumulation increased during heat perfusion, although in the phosphate buffer-based SBS with PEG-8000 this increase was less manifested. The same picture was observed when studying the ATP content: after 18 hrs the HS values were lower than 1 hr later, this situation aggravated during reperfusion, but in the mentioned group this index was statistically and significantly higher than in the rest ones.

Thus, the composition of storage solution may be successfully modified by replacing albumin and tris-HCL for PEG-8000 and phosphate buffer, correspondingly.

Морфофункциональное состояние эритроцитов при длительном гипотермическом хранении в зависимости от pH и ионной силы

Н.В. РЕПИН, В.В. КИРОШКА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphofunctional State of Erythrocytes Under Long-Term Hypothermic Storage Depending on pH and Ion Strength

N.V. REPIN, V.V. KIROSHKA

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Вопросы, связанные с механизмами повреждения биологических объектов в процессе гипотермического хранения (ГХ), до настоящего времени остаются дискуссионными.

В работе исследовали влияние pH и ионной силы среды на морфологическое состояние и устойчивость эритроцитов в условиях гипотермического хранения.

Эквилибрация эритроцитов в средах с различным значением pH выявила достаточно высокую сохранность их исходной формы при варьировании pH среды. Наиболее значительное изменение формы в течение первых 30 мин отмечено в неэлектролитных средах при pH 8,6, в которых наблюдалась интенсивная трансформация дискоцитов в эхиноциты. В процессе ГХ установлены более выраженные изменения формы клеток, обусловленные составом и pH среды экспозиции. При кислых значениях pH эритроциты трансформируются в гетерогенную популяцию дискоцитов и эхиноцитов вне зависимости от состава среды хранения, тогда как нейтральные значения pH вызывали трансформацию эритроцитов в гомогенную, эхиноцитарную популяцию. При щелочных значениях pH среды на 2-е сутки ГХ в неэлектролитных средах клетки интенсивно трансформируются в сфероэхиноциты, тогда как в электролитных средах образуется гетерогенная популяция дискоцитов и эхиноцитов.

На протяжении всего срока хранения (21 сутки) уровень гемолиза при pH 7,2 оставался минимальным по сравнению с кислыми и щелочными значениями pH в средах с высокой и низкой ионной силой. Различия в трансформации формы отражали степень устойчивости клеток. При анализе осмотической резистентности эритроцитов на начальном этапе ГХ (2–7 сутки) неожиданным оказался тот факт, что наиболее осмотически устойчивой является гомогенная популяция клеток, состоящая из эхиноцитарных форм.

Установлено, что вне зависимости от ионной силы среды при кислых значениях pH наблюдается минимальная осмотическая устойчивость. В процессе ГХ степень повреждения клеток в неэлектролитных средах была достоверно ниже по сравнению с электролитными. В средах, где отмечена трансформация эритроцитов в гомогенную состоящую из эхиноцитов популяцию, выявлен минимальный уровень гемолиза. Исследование состояния примембранного слоя эритроцитов в процессе ГХ показало, что между 10 и 14 сутками при некоторых условиях хранения происходит разрыхление, отслоение и потеря гликокаликса. Трансформация формы клеток при хранении сопровождалась изменением ультраструктуры мембран и примембранного слоя.

The questions about the damage mechanisms of biological objects under hypothermic storage (HS) have been remained disputable.

In the research we have studied the pH and medium ion strength effects on morphological state and erythrocyte resistance under hypothermic storage.

Erythrocyte equilibration in media with different pH values revealed quite a high integrity of their initial shape when varying medium pH. The most significant change in shape within first 30 min was noted in non-electrolyte media at pH 8.6, where an intensive discocyte transformation into echinocytes was observed. More manifested changes in cell shape, stipulated by composition and exposure medium pH have been established during HS. Under acid pH values the erythrocytes are transformed into heterogeneous population of discocytes and echinocytes independently on the storage medium composition, meanwhile the neutral pH values caused erythrocyte transformation into a homogenous, echinocyte population. Under alkaline values of medium pH to the 2nd day of HS in non-electrolyte media the cells are intensively transformed into sphere-echinocytes, mean-while in electrolyte ones a heterogeneous population of discocytes and echinocytes is formed.

Within the whole storage term (21 days) the hemolysis level at pH 7.2 has remained minimum, compared to the acid and alkaline pH values in the media with high and low ion strengths. Differences in shape transformation reflected the cell resistance degree. When analyzing the erythrocyte osmotic resistance at the initial HS stage (2–7 days), the fact that the homogenous cell population, consisting of echinocyte forms, is the most osmotically resistant, occurred to be unsuspected.

It was established, that independently on the medium ion strength under acid pH values, there was observed a minimum osmotic resistance. During HS the degree of cell damage in non-electrolyte media was statistically and significantly lower, compared to the electrolyte ones. In the media, where the erythrocyte transformation into homogenous population, consisting of echinocytes, was observed, a minimum hemolysis level was revealed. The research of the state of near membrane erythrocyte layer during HS has demonstrated that between 10 and 14 days under some storage conditions the loosening, exfoliation and loss of glyco-calyx occurs. Cell shape transformation under storage was accompanied by a change in membrane ultrastructure and near membrane layer.

К вопросу о механизме антигемолитического действия хлорпромазина при изменении осмотических и температурных параметров среды

Н.М. ШПАКОВА, Н.В. ОРЛОВА, Л.В. ЦЫМБАЛ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

To the Question About Mechanism of Chlorpromazine Antihemolytic Effect When Changing Osmotic and Temperature Medium Parameters

N.M. SHPAKOVA, N.V. ORLOVA, L.V. TSYMBAL

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Гипертонический стресс и гипертонический криогемолиз эритроцитов млекопитающих позволяют исследовать влияние на клетки основных факторов криоповреждения: концентрирование солей и охлаждение. При изменении осмотических и температурных условий среды наблюдается значительное повреждение эритроцитов разных видов млекопитающих.

Цель работы – исследовать влияние хлорпромазина на гипертонический гемолиз (4,0 М NaCl) и гипертонический криогемолиз (1,2 М NaCl, 37→0°C) эритроцитов человека, а также оценить барьерные свойства и структурно-динамическое состояние эритроцитарных мембран.

Содержание гемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Морфологический анализ эритроцитов осуществляли методом световой микроскопии. Количество ионов калия определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Динамическую структуру мембраны эритроцита изучали методом ЭПР спектроскопии с использованием 16 доксилстеариновой кислоты (16-ДС). Перераспределение фосфатидилсерина оценивали по связыванию аннексина V с эритроцитарной мембраной методом проточной цитофлуориметрии.

Показано, что хлорпромазин (120 мкМ) значительно снижает уровень повреждения эритроцитов в условиях как гипертонического шока, так и гипертонического криогемолиза, его антигемолитическая активность составляет 90 и 70% соответственно. В указанных условиях хлорпромазин, предотвращая выход гемоглобина, не оказывает влияния на утечку ионов калия из клеток. Молекулы хлорпромазина, встраиваясь в эритроцитарную мембрану, вызывают изменение формы клетки по типу дискоцит-стоматоцит, при этом экспонирования фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны не выявлено.

Методом ЭПР спектроскопии с использованием мембранного зонда 16 ДС показаны концентрационно-зависимые изменения структурно-функционального состояния эритроцитарной мембраны в присутствии хлорпромазина. Полученные данные свидетельствуют о существовании транзитных небислойных фаз в момент массового встраивания молекул хлорпромазина в мембрану эритроцита, что, по-видимому, и лежит в основе антигемолитического действия амфифильного соединения в условиях резкого изменения осмотических и температурных параметров среды.

Hypertonic stress and hypertonic cryohemolysis of mammalian erythrocytes enable to investigate the effect of principal cryodamage factors such as salt concentrating and cooling. When changing the osmotic and temperature medium conditions there is observed a significant damage of erythrocytes of different mammalian species.

The research was targeted to investigate the chlorpromazine effect on human erythrocyte hypertonic hemolysis (4.0 M NaCl) and hypertonic cryohemolysis (1.2 M NaCl, 37→0°C), as well as to estimate the barrier properties and structural and dynamic state of erythrocyte membrane.

Hemoglobin content was spectrophotometrically determined at 543 nm wavelength. Erythrocyte morphology was analyzed with light microscopy. Number of potassium ions was determined with atomic absorption spectrophotometry. Dynamic structure of erythrocyte membrane was studied with EPR spectroscopy with 16-doxylstearic acid (16-DS). Phosphatidyl serine redistribution was cytofluorimetrically assessed by annexin V binding with erythrocyte membrane.

Chlorpromazine (120 μM) was shown as significantly reducing the level of erythrocyte damage under both hypertonic stress and hypertonic cryohemolysis conditions, its anti-hemolytic activity was 90 and 70%, correspondingly. Under the mentioned conditions chlorpromazine by preventing hemoglobin release does not affect the potassium ion leakage out of cells. Chlorpromazine molecules, when building into erythrocyte membrane, change the cell shape by discoocyte-stomatocyte type, herewith no phosphatidyl serine exposing on an outer membrane side has been revealed.

Concentration-dependent changes in structural and functional state of erythrocyte membrane in chlorpromazine presence were demonstrated with EPR-spectroscopy using 16-DS membrane probe. The data obtained testify to the existence of transient non-bilayer phases at the moment of mass building of chlorpromazine molecules into erythrocyte membrane, that is apparently the base for antihemolytic effect of amphiphil compound under conditions of a sharp change in osmotic and temperature medium parameters.

Оборудование для низкотемпературного и сублимационного консервирования, долгосрочного хранения биоматериалов

В.Н. БАТРАКОВ, Ю.П. БЕЛОУСОВ, А.М. ПОЛОНЧУК, В.А. СОКОЛОВ, А.Н. ФЕДОРОВИЧ
*Специальное конструкторско-технологическое бюро с опытным производством
Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Equipment for Low Temperature and Freeze-Drying Preservation, Long-Term Storage of Biological Materials

V.N. BATRAKOV, Yu.P. BELOUSOV, A.M. POLONCHUK, V.A. SOKOLOV, A.N. FEDOROVICH
Special Designing and Constructing Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Анализ оборудования, предлагаемого для технического оснащения криобанков и криолабораторий.

Описание структуры типового криобанка.

Обзор оборудования, разработанного и изготавливаемого в СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины.

Оборудование для низкотемпературного консервирования – программные замораживатели-размораживатели для охлаждения (отогрева) ядродержащих клеток крови, костного мозга, спермы, эмбрионов, бактериальных и клеточных культур в контейнерах по многоэтапным программам. Диапазон температур $-160...40^{\circ}\text{C}$. Диапазон скоростей охлаждения $0,1...20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Сублимационные (лиофильные) установки камерного и коллекторного типов для замораживания-высушивания биологических суспензий. Позволяют отрабатывать режимы и выпускать лиофилизированные препараты. Производительность $0,1...25$ кг льда за цикл. Температура десублиматора $-196...-45^{\circ}\text{C}$. Источники холода: жидкий азот, холодильный агрегат, элементы Пельтье.

Управляющие и контролируемые системы различной сложности.

Оборудование низкотемпературных банков для долгосрочного хранения биоматериала: биохранилища низкотемпературные с системами контроля температуры и уровня хладагента; кассеты с укладками различной конструкции; системы снабжения жидким и газообразным азотом.

Оборудование для переработки плазмы крови.

Research of the devices, proposed for technical equipment of cryobanks and cryolaboratories.

Description of typical structure of cryobank.

Review of the equipment designed and produced at Special Designing and Constructing Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Equipment for low temperature preservation:

Programmable freezers-defrosters for cooling (thawing) of blood nucleated cells, the ones of bone marrow, sperm, embryos, bacterial and cell cultures in containers according to multi-step programs. Temperature range is $-160...40^{\circ}\text{C}$. The range of cooling rates is $0.1...20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

The device for freeze-drying:

The ones of chamber and collector types for freezing-drying of biological suspensions. They enable to master the regimens and produced frozen-dried preparations. The productivity is $0.1...25$ kg of ice per cycle. Desublimator temperature is $-196...-45^{\circ}\text{C}$. Cold source is liquid nitrogen, cooling aggregate, Peltier elements.

Equipment of low temperature banks for long-term storage of biological material: low temperature biological store houses with the systems of temperature control as well as of cooling agent level; cassettes with installations of different designs; liquid and gaseous nitrogen supply systems.

Equipment for blood plasma processing.