

**Тезисы 36-й ежегодной конференции молодых ученых
 «Холод в биологии и медицине – 2012. Актуальные проблемы криобиологии,
 трансплантологии и биотехнологии», 22–24 мая 2012, г. Харьков**

<i>Кирилюк А.Л., Гурина Т.М.</i> Температурные интервалы фазовых превращений в криозащитных средах и их роль в криоконсервировании клеточных суспензий на этапе нагрева.....	189
<i>Пахомов А.В., Гурина Т.М., Божок Г.А.</i> Эффективность применения протоколов криоконсервирования с контролируруемыми скоростями нагрева в температурных интервалах фазовых превращений для клеток интерстиция взрослых крыс.....	190
<i>Зайков В.С., Труфанова Н.А., Петренко Ю.А.</i> Поиск подходов криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных сферических носителей.....	191
<i>Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Останков М.В.</i> Криоконсервирование как фактор управления структурно-функциональным состоянием фетальных нервных клеток.....	192
<i>Венцовская Е.А.</i> Сон в структуре ответа организма на различные виды холодовых воздействий.....	193
<i>Димитров А.Ю., Челомбитько О.В., Борисов П.А., Останков М.В.</i> Анализ экспрессии гена <i>ido</i> в мезенхимальных стволовых клетках фетальной печени мышей после криоконсервирования.....	194
<i>Борисов П.А., Димитров А.Ю., Челомбитько О.В.</i> Влияние криоконсервирования на уровень экспрессии гена <i>nanog</i> в мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клетках фетальной печени мышей ранних сроков гестации.....	195
<i>Буцкий К.И., Марченко В.С.</i> Изменение структурно-функционального состояния неокортекса хомяков при холодной акклимации и зимней спячке.....	196
<i>Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф.</i> Фотометрический метод оценки качества спермы карпа.....	197
<i>Красникова А.О., Зинченко А.В.</i> Физические состояния водных растворов диметилацетамида и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ при соотношении $R = 1:2$ ниже 0°C	198
<i>Челомбитько О.В., Сафранчук О.В., Бондарович Н.А., Останков М.В., Димитров А.Ю.</i> Модификация характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под влиянием факторов криоконсервирования.....	199
<i>Сидоренко О.С., Божок Г.А., Легач Е.И., Бондаренко Т.П.</i> Экспрессия β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят, полученной из криоконсервированных фрагментов ткани.....	200
<i>Тамарина И.В., Божок Г.А.</i> Влияние различных концентраций ДМСО и ЭТС в составе криозащитных сред на морфофункциональные свойства клеток надпочечников новорожденных мышей.....	201
<i>Шевченко М.В.</i> Гипотермическое хранение изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава.....	202
<i>Мединец Е.А., Киришук В.В., Тищенко Ю.О., Бондаренко Т.П.</i> Сохранность неонатальной овариальной ткани при гипотермическом хранении в зависимости от композиционного состава среды инкубации.....	203
<i>Говорова Ю.С., Зинченко А.В.</i> Кинетический анализ плавления гемоглобина в присутствии оксиэтилированного производного глицерина.....	204
<i>Рогульская Е.Ю., Ревенко Е.Б., Петренко Ю.А.</i> Дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях подавления и стимуляции пролиферации.....	205
<i>Борисенко І.Г.</i> Вплив пептидного комплексу шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів у культурі.....	206
<i>Горячая И.П.</i> Исследование реакции делящихся клеток на оксидативный стресс методом хемилюминесценции.....	207
<i>Говор И.В.</i> Исследование реакции гепатоцитов на оксидативный стресс с помощью метода хемилюминесценции.....	208
<i>Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф.</i> Технология получения криоконсервированных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах.....	209
<i>Рогоза Л.А.</i> Склад екстрактів криоконсервованих фрагментів серця свиней та поросят і їх вплив на організм шурів.....	210
<i>Шканд Т.В., Чиж Н.А.</i> Применение альгинатных гидрогелей для замедленной эжекции пептидов сердца поросят в жидкую фазу.....	211
<i>Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С.</i> Механизмы влияния криоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в периоде позднего онтогенеза.....	212
<i>Бабаева А.Г., Чиж Н.А.</i> Влияние экстрактов селезенки и сердца на миокард.....	213
<i>Кравченко М.А., Сафранчук О.В., Челомбитько О.В.</i> Иммунокорректирующая активность криоэкстракта липидов плаценты в отношении пула $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Т-клеток крыс при адьювантном артрите.....	214

<i>Кожина О.Ю., Порожан Е.А.</i> Роль моноцитарно-фагоцитарной системы в формировании противовирусной резистентности после введения компонентов криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови.....	215
<i>Ямпольская Е.Е., Шатнева О. М., Бондарович Н. А.</i> Исследование молекулярных механизмов апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы при развитии адьювантного артрита до и после применения криоконсервированных клеток фетальной печени.....	216

cold in biology and medicine **36**

current problems in cryobiology,
transplantology and biotechnology

Abstracts of the 36th Annual Conference of Young Scientists 'Cold in Biology and Medicine 2012. Current Problems in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology' May, 22–24th, 2012, Kharkov, Ukraine

<i>Kirilyuk A.L., Gurina T.M.</i> Temperature Intervals of Phase Transformations in Cryoprotective Media and Their Role in Cryopreservation of Cell Suspensions at Heating Stage.....	189
<i>Pakhomov A.V., Gurina T.M., Bozhok G.A.</i> Efficiency of Applying Cryopreservation Protocols with Controlled Heating Rates within Temperature Intervals of Phase Transitions for Adult Rat Interstitial Testicular Cells.....	190
<i>Zaykov V.S., Trufanova N.A., Petrenko Yu.A.</i> Searching the Approach to Cryopreserve Mesenchymal Stromal Cells Inside Alginate Spherical Carriers.....	191
<i>Porozhan Ye.A., Babenko N.N., Ostankov M.V.</i> Cryopreservation as Factor Controlling Structural and Functional State of Fetal Neuronal Cells.....	192
<i>Ventskovskaya E.A.</i> Sleep in Structure of Organism Response to Different Cold Effects.....	193
<i>Dimitrov A. Yu., Chelombitko O.V., Borisov P.A., Ostankov M.V.</i> Analysis of <i>ido</i> Gene Expression in Mesenchymal Stem Cells of Mice Fetal Liver after Cryopreservation.....	194
<i>Borisov P.A., Dimitrov A. Yu., Chelombitko O.V.</i> Effect of Cryopreservation on <i>nanog</i> Gene Expression in Mouse Fetal Liver Mesenchymal and Hemopoietic Stem Cells of Early Gestation Terms.....	195
<i>Butsky K.I., Marchenko V.S.</i> Change of Structural-Functional State of Hamster Neocortex During Cold Acclimation and Hibernation.....	196
<i>Pugovkin A. Yu., Kopeyka E.F.</i> Photometric Method for Assessing Quality of Carp Sperm.....	197
<i>Krasnikova A.O., Zinchenko A.V.</i> Physical States of Aqueous Solutions of Dimethylacetamide and Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree $n = 5$ at $R = 1:2$ Ratio below 0°C	198
<i>Chelombitko O.V., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., A. Yu. Dimitrov</i> Modification of Ehrlich Carcinoma Cell Properties under Effect of Cryopreservation Factors.....	199
<i>Sidorenko O.S., Bozhok G.A., Legach E.I., Bondarenko T.P.</i> Expression of β -III-Tubulin in Adrenal Cell Culture of Newborn Piglets Derived from Cryopreserved Tissue Fragments.....	200
<i>Tamarina I.V., Bozhok G.A.</i> Effect of Different DMSO and FBS Concentrations in Cryoprotective Media on Morphofunctional Properties of Adrenal Cells of Newborn Mice.....	201
<i>Shevchenko M.V.</i> Hypothermic Storage of Isolated Nerve Cells of Newborn Rats in Different Composition Media.....	202
<i>Medinets E.A., Kiroshka V.V., Tischenko Yu.O., Bondarenko T.P.</i> Preservation of Neonatal Ovarian Tissue during Hypothermic Storage Depending on Incubation Medium Composition.....	203
<i>Govorova Yu.S., Zinchenko A.V.</i> Kinetic Analysis of Hemoglobin Melting in Presence of Oxyethylated Glycerol.....	204
<i>Govor I.V.</i> Study of Hepatocyte Response to Oxidative Stress by Chemiluminescence Method.....	205
<i>Rogulska O. Yu., Revenko O.B., Petrenko Yu.O.</i> Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells under Suppression and Stimulation of Proliferation.....	206

<i>Borisenko I.G.</i> Effect of Peptide Complex of Piglet Skin on Metabolic Activity of Fibroblasts in Culture.....	207
<i>Goryachaya I.P.</i> Study of Dividing Cells Response to Oxidative Stress by Chemiluminescence Method.....	208
<i>Babinets O.M., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F.</i> Method of Obtaining Cryopreserved Preparations of Probiotics Immobilized on Enterosorbents.....	209
<i>Rogoza L.A.</i> Composition of Extracts of Cryopreserved Pig and Piglet Heart Fragments and Their Effect on Rats.....	210
<i>Shkand T.V., Chizh N.A.</i> Use of Alginate Hydrogels for Slow Ejection of Pig Heart Peptides into Liquid.....	211
<i>Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S.</i> Mechanisms of Cryopreserved Placental Preparation Effect on Reproductive Function in Late Ontogenesis.....	212
<i>Babayeva A.G., Chizh N.A.</i> Effect of Spleen and Heart Extracts on Myocardium.....	213
<i>Kravchenko M.A., Safranchuk O.V., Chelombitko O.V.</i> Immunocorrecting Activity of Placental Lipids Cryoextract in Relation to Pool of CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Cells in Rats with Adjuvant Arthritis.....	214
<i>Kozhyna O.Yu., Porozhan E.A.</i> Role of Monocyte-Phagocytic System in Formation of Antiviral Resistance after Introduction of Cryopreserved Cord Blood Leukoconcentrate Components.....	215
<i>Yampolskaya E.Ye., Shatneva O.M., Bondarovich N.A.</i> Investigation of Molecular Mechanisms of Apoptotic Processes in Cells of Monocyte-Phagocyte System during Development of Adjuvant Arthritis after Application of Fetal Liver Cells.....	216

Температурные интервалы фазовых превращений в криозащитных средах и их роль в криоконсервировании клеточных суспензий на этапе нагрева

А.Л. КИРИЛЮК, Т.М. ГУРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Temperature Intervals of Phase Transformations in Cryoprotective Media and Their Role in Cryopreservation of Cell Suspensions at Heating Stage

A.L. KIRILYUK, T.M. GURINA

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

Криоконсервирование в настоящее время широко используется для долгосрочного хранения биоматериала. Разнообразие биообъектов, отличающихся индивидуальными особенностями строения и различной резистентностью к низким температурам, не позволяет создать универсальную процедуру криоконсервирования. При этом актуальной задачей является унификация отдельных этапов криоконсервирования путем определения оптимальных скоростей охлаждения-нагрева в процессе замораживания-оттаивания. Регулирование этих скоростей в определенных температурных интервалах дает возможность контролировать кинетику фазовых превращений и нивелировать их негативный вклад в повреждение клеток. На этапе нагрева к таким фазовым превращениям относятся расстеклование, плавление смеси эвтектической концентрации, плавление основной массы льда, а также рекристаллизация перед соответствующими процессами плавления.

В последнее время в литературных источниках в протоколах криоконсервирования используют контролируемые скорости охлаждения. В то же время режим оттаивания происходит традиционным способом – на водяной бане. Ранее в наших работах [Гурина Т.М., 2011] было показано преимущество использования контролируемых скоростей охлаждения в температурных интервалах фазовых превращений на этапе замораживания. Цель данной работы – показать возможность использования контролируемых скоростей на этапе нагрева. Температурные интервалы фазовых превращений, протекающих в криозащитных средах, определяли по экспериментальным термопластическим кривым (ТПД-кривые). С целью выявления вклада фазовых превращений, соответствующих каждому компоненту криозащитной среды, исследовали ТПД-кривые для дистиллированной воды, физиологического раствора, культуральных сред и соответствующих растворов криопротекторов. Сформулированы общие принципы выбора внешнего деформирующего напряжения для определения рассматриваемых температурных интервалов и их предельные значения для криозащитных сред.

В целях практической апробации определены исследуемые температурные интервалы для криозащитного раствора (10% раствор ДМСО на среде 199 с 20 мМ Hepes), используемого для криоконсервирования клеток интерстиция тестисов взрослых крыс, а именно: рекристаллизация перед эвтектическим плавлением раствора криопротектора ($-97 \dots -89$)°C и соответствующее плавление ($-89 \dots -67$)°C; рекристаллизация перед плавлением эвтектики среды 199 ($-45 \dots -37$)°C и плавление ($-37 \dots -21$)°C; рекристаллизация перед плавлением основной массы льда ($-21 \dots -15$)°C и плавление ($-15 \dots -6$)°C.

Предложенная методика имеет универсальный характер и может быть использована для любых растворов криопротекторов, приготовленных как на дистиллированной воде, так и на культуральных средах.

Today cryopreservation is widely used for long-term storage of biological material. Variety of bioobjects differing by individual features of structure and various resistance to low temperatures does not allow the development of unified cryopreservation procedure. Herewith an actual task is unification of some cryopreservation stages by means of determining the optimal cooling-warming rates during freeze-thawing. Controlling these rates within certain temperature intervals provides the possibility to regulate the kinetics of phase transformations and neutralize their negative contribution into cell damage. At the stage of warming these phase transformations include devitrification, melting of mixture of eutectic concentration, melting of ice bulk as well as re-crystallization prior to corresponding melting processes are referred.

Currently the cryopreservation protocols involve usually the controlled cooling rates. At the same time the thawing is performed in traditional way, *i.e.* in water bath. Previously we have shown [Gurina T.M., 2011] the advantage of using the controlled cooling rates within the temperature intervals of phase transformations at freezing stage. The aim of this research was to show the possibility of using the controlled rates at the warming stage. Temperature intervals of phase transformations occurring in cryoprotective media were determined from experimental thermoplastic curves. To reveal the contribution of phase transformations corresponding to each component of cryoprotective medium there were examined the thermoplastic curves for distilled water, physiological solution, culture media and corresponding solutions of cryoprotectants. There were formulated the general principles of selection of external deforming tension to determine the considered temperature intervals and their limit values for cryoprotective media.

For practical approbation there were determined the mentioned temperature intervals for cryoprotective solution (10% DMSO solution on the base of medium 199 with 20 mM Hepes) used for cryopreservation of adult rat testicular interstitial cells, namely: re-crystallization prior to eutectic melting of cryoprotectant solution ($-97 \dots -89$)°C and corresponding melting ($-89 \dots -67$)°C; re-crystallization prior to melting of medium 199 eutectics ($-47 \dots -37$)°C and melting ($-37 \dots -21$)°C, re-crystallization prior to melting of ice bulk ($-21 \dots -15$)°C and melting ($-15 \dots -6$)°C.

Proposed methods are universal and may be used for any cryoprotectant solutions prepared both on the base of distilled water or culture media.

Эффективность применения протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями нагрева в температурных интервалах фазовых превращений для клеток интерстиция взрослых крыс

А.В. ПАХОМОВ, Т.М. ГУРИНА, Г.А. БОЖОК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Efficiency of Applying Cryopreservation Protocols with Controlled Heating Rates within Temperature Intervals of Phase Transitions for Adult Rat Interstitial Testicular Cells

A.V. PAKHOMOV, T.M. GURINA, G.A. BOZHOK

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

Изучение влияния отдельных факторов криоконсервирования на жизнеспособность клеточной суспензии и сохранность функциональной способности стероидогенных клеток может способствовать разработке режимов замораживания-оттаивания, позволяющих максимально сохранить гормонопродуцирующую составляющую тестисов – клеток Лейдига. При разработке протоколов замораживания-оттаивания биообъектов, как правило, основное внимание уделяется режиму охлаждения, в то время выживаемость биообъектов может зависеть как от скоростей охлаждения, так и нагрева.

Цель данной работы – исследовать эффективность применения протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева в температурных интервалах фазовых превращений на этапе оттаивания. Образцы замораживали по разработанным ранее [Гурина Т.М., 2007] режимам с контролируемыми скоростями охлаждения. Оттаивание образцов осуществляли в программном замораживателе, комбинируя высокие (20 град/мин) и низкие (1 град/мин) скорости нагрева в указанных температурных интервалах. В качестве контроля использовали оттаивание образцов на водяной бане (40°C). При анализе результатов определяли сохранность клеток как соотношение количества клеток до и после замораживания-отогрева, а также количество клеток с неповрежденной клеточной мембраной в зависимости от вариаций скорости нагрева в температурных интервалах плавления основной массы льда, плавления смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, плавления эвтектики составляющих культуральной среды, а также рекристаллизации перед соответствующими процессами плавления.

Впервые разработан протокол криоконсервирования клеток интерстиция тестисов, в котором благодаря использованию контролируемых скоростей нагрева в температурных интервалах фазовых превращений получены высокие показатели сохранности и функциональной активности клеток в суспензии (56,7%) и сохранности популяции клеток Лейдига (78,7%).

На примере клеток интерстиция показана возможность создания единого протокола замораживания-оттаивания с контролируемыми скоростями в температурных интервалах фазовых превращений с использованием программных замораживателей, который способствует максимальной сохранности клеток. Предложенная методика имеет универсальный характер и может быть использована вне зависимости от вида биообъекта и состава криозащитной среды для криоконсервирования различных видов клеток.

Работа выполнена при поддержке ДФФД (проект № GP/F44/127)

Studying the effect of particular cryopreservation factors on viability of cell suspension and keeping a functional ability of steroidogenic cells could contribute to development of freeze-thawing protocols, allowing maximum preservation of hormone-producing component of testes, Leydig cells. When developing the protocols to freeze-thaw bioobjects as a rule the main attention is paid to cooling regimen, meanwhile the survival of the biological objects could depend on both cooling and heating rates.

The research aim was to study the efficiency of application of cryopreservation protocols with controlled cooling-heating rates within temperature intervals of phase transitions at the stage of thawing. The samples were frozen according to previously developed regimens with controlled cooling rates [Gurina T.M., 2007]. The samples were thawed in a programmable freezer by means of combination of high (20 deg/min) and low (1 deg/min) heating rates within the mentioned temperature intervals. As the control there was used thawing of the samples in water bath (40°C). Analysis of the results included the assessment of the post-thaw cell survival as the ratio between cell number prior to and after freeze-thawing, as well as the quantity of cells with non-damaged plasma membrane in dependence of variation of heating rate within temperature intervals for melting of bulk of ice, melting of mixture of cryoprotectant solution of eutectic concentration, melting of culture medium components eutectics, as well as re-crystallization prior to corresponding melting processes.

For the first we developed the protocol for cryopreservation of testes interstitial cells, which due to the use of controlled rates of heating within the temperature intervals of phase transitions allowed to obtain high indices of survival and functional activity of general cell population (56.7%), and survival of Leydig cells (78.7%) in particular.

The possibility of development of unified protocol for freeze-thawing with controlled rates within temperature intervals of phase transitions using programmable freezers, which contributes to maximum preservation of cells has been shown on example of interstitial cells. The proposed methods are universal and could be used independently of the bioobject type and composition of cryoprotective medium for cryopreservation of different cell types.

The study was supported by Ukrainian Foundation for Fundamental Research (grant Nr. GP/F44/127).

Поиск подходов криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных сферических носителей

В.С. ЗАЙКОВ, Н.А. ТРУФАНОВА, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Searching the Approach to Cryopreserve Mesenchymal Stromal Cells Inside Alginate Spherical Carriers

V.S. ZAYKOV, N.A. TRUFANOVA, YU.A. PETRENKO

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

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в составе трехмерных носителей является актуальной задачей современной криобиологии и тканевой инженерии.

В данной работе изучали влияние криоконсервирования путем медленного замораживания и витрификации на жизнеспособность и метаболическую активность МСК человека, инкапсулированных (иМСК) в альгинатные сферические носители.

Для инкапсуляции МСК смешивали с 1,2% альгината натрия, после чего капельно вносили в раствор CaCl_2 . Размер полученных капсул составлял 1,2–1,5 мм. При криоконсервировании иМСК использовали два подхода:

1. «Общепринятый» подход, включавший медленное (1 град/мин) охлаждение образцов под защитой 10% ДМСО и 20% эмбриональной сыворотки до -80°C и последующее погружение в жидкий азот.

2. Витрификация под защитой растворов криопротекторов ДЭПС (ДМСО, этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (ПД) и сахароза), путем прямого погружения образцов в жидкий азот.

Жизнеспособность и метаболическую активность иМСК до и после криоконсервирования оценивали с помощью редокс-индикаторов МТТ и Alamar Blue (АВ). Жизнеспособность иМСК после криоконсервирования с использованием «общепринятого» подхода составляла около 80%, метаболическая активность клеток, оцененная с помощью АВ-теста, – 70%.

Витрификацию иМСК осуществляли в растворе ДЭПС-1, состоящим из 10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% ПД, 0,5 М сахарозы. В случае двухэтапной экспозиции (2 мин 30 с в 50%-м и 30 с в 100%-м растворе) жизнеспособность и метаболическая активность клеток после девитрификации падали до 25 и 28% соответственно. Отказ от первого этапа экспозиции клеток в 50% ДЭПС-1 и одновременное увеличение времени экспозиции иМСК в 100% растворе до 5 мин позволяли повысить показатели жизнеспособности клеток до 75%. Увеличение концентрации ЭГ в составе раствора ДЭПС до 30–45% повышало жизнеспособность иМСК после девитрификации до 80%.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о перспективности использования витрификации в качестве альтернативного подхода криоконсервирования МСК в составе альгинатных сферических носителей.

Cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSCs) inside of 3D carriers is an actual task of current cryobiology and tissue engineering.

In this work we studied the effect of cryopreservation using slow freezing or vitrification on viability and metabolic activity of human MSCs encapsulated (eMSCs) in alginate spherical carriers.

For encapsulation the MSCs were mixed with 1.2% sodium alginate and afterwards introduced dropwise into CaCl_2 solution. The size of the resulted capsules made 1.2–1.5 mm. During cryopreservation of eMSCs we used two approaches:

1. ‘Traditional’ method comprised slow (1 deg/min) cooling of the samples under 10% DMSO protection and 20% fetal serum down to -80°C and the following plunging into liquid nitrogen.

2. Vitrification performed under protection of the solutions of DEPS cryoprotectant solutions (DMSO, ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (PD) and sucrose) by means of direct plunging of the samples into liquid nitrogen.

Viability and metabolic activity of eMSCs prior to and after cryopreservation were assessed using redox-indicators MTT and Alamar Blue (AB). Viability of eMSCs after cryopreservation using ‘traditional’ approach made about 80% and metabolic activity of cells according to AB test was 70%.

Vitrification of eMSCs was carried-out using DEPS-1 solution, containing 10% DMSO, 20% EG, 20% PD, 0.5 M sucrose. In case of two-stage exposure (2 min 30 s in 50% solution and 30 s in 100% solution) the viability and metabolic activity of cells after devitrification felt down to 25 and 28%, correspondingly. Waiving the first stage of cell exposure in 50% DEPS-1 and simultaneous increase of period of eMSCs exposure in 100% solution up to 5 min allowed to rise the cell viability indices up to 75%. Rise in the concentration of EG as a component of DEPS-1 solution up to 30–45% led to the increase in the viability of eMSCs after devitrification up to 80%.

Thus the research results testify to a perspective of using vitrification as an alternative approach to cryopreserve MSCs inside alginate spherical carriers.

Криоконсервирование как фактор управления структурно-функциональным состоянием фетальных нервных клеток

Е.А. ПОРОЖАН, Н.Н. БАБЕНКО, М.В. ОСТАНКОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation as Factor Controlling Structural and Functional State of Fetal Neuronal Cells

Ye.A. POROZHAN, N.N. BABENKO, M.V. OSTANKOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Реализация механизмов действия фетальных нервных клеток (ФНК) определяется структурно-функциональными особенностями этих клеток [Skardelly M. *et al.*, 2011; Гольцев А.Н. и др., 2011]. Изменение как популяционного состава ФНК, так и их адгезивных свойств после криоконсервирования непосредственно будет определять функциональный потенциал этих клеток.

Цель исследования – определение фенотипических характеристик и адгезивных свойств гетерогенной популяции ФНК, криоконсервированных с использованием разных режимов охлаждения.

Материалом для исследования служили ФНК белых беспородных крыс 11 суток гестации, криоконсервированные по трем режимам: Р1 [Грищенко В.И. и др., 2004], Р2 [Redmond D.E. Jr. *et al.*, 1988], Р3 [Гольцев А.Н. и др., 2011]. Субпопуляционный состав ФНК исследовали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD133, nestin, β -tubulin, GFAP (BD, США). Адгезивный потенциал ФНК до и после криоконсервирования оценивали в системе *in vitro* при культивировании в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в чашках Петри, поверхность которых была покрыта белками внеклеточного матрикса, обеспечивающими преимущественное прикрепление нейрональных элементов (BioCoat Поли-Д-лизин/Ламинин; BD), глиальных клеток (BioCoat Ламинин/Фибронектин; BD). Оценку функционального потенциала стволовых клеток проводили в условиях бессывороточной питательной среды с добавлением митогенов.

Проведенные исследования показали, что Р1 способствовал увеличению содержания всех исследуемых субпопуляций ФНК, Р2 – преимущественно глиальных клеток (GFAP⁺); Р3 – стволовых клеток (CD133⁺ и nestin⁺) на фоне гибели продвинутых в дифференцировке нейрональных предшественников (β -tubulin⁺). Оценка адгезивного потенциала ФНК показала, что используемые режимы замораживания в различной степени модифицируют экспансию молекул адгезии на ФНК: от стимуляции до ингибирования. Установлена временная задержка появления нейросфер на 1–2 суток вне зависимости от используемого режима криоконсервирования, при этом количество сформированных нейросфер определялось условиями замораживания.

Таким образом, низкотемпературное консервирование может рассматриваться как метод модификации структурно-функционального состояния биообъекта, а значит – терапевтического потенциала ФНК.

Realization of mechanism of fetal neuronal cells (FNCs) action is determined by structural and functional peculiarities of these cells [Skardelly M. *et al.*, 2011; Goltsev A.N. *et al.*, 2011]. Changes in both population composition of FNCs and their adhesive properties after cryopreservation will directly determine their functional potential.

The research aim was to examine the phenotype characteristics and adhesive properties of heterogenic population of FNCs cryopreserved according to different cooling regimens.

The research was performed in FNCs of white outbred rat fetuses of the 11th gestation day, cryopreserved according to three regimens: R1 [Grischenko V.I. *et al.*, 2004], R2 [Redmond D.E. Jr. *et al.*, 1988], R3 [Goltsev A.N. *et al.*, 2011]. Subpopulation composition of FNCs was studied by flow cytometry using monoclonal antibodies to CD133, nestin, β -tubulin, GFAP (BD, USA). Adhesive potential of FNCs prior to and after cryopreservation was assessed *in vitro* during culturing in DMEM-12/F12 supplemented with 10% fetal calf serum in Petri dishes, which surface was coated with the proteins of extracellular matrix, providing the predominant adherence of neuronal elements (BD, BioCoat Poly-D-lysine/Laminin), glial cells (BD, BioCoat Laminin/Fibronectin). Functional potential of stem cells was estimated under conditions of serum-free nutritive medium supplemented with mitogens.

The performed studies have shown that R1 contributed to an increased content of all the studied subpopulations of FNCs, R2 did predominantly to glial cells (GFAP⁺); R3 resulted in enrichment with stem cells (CD133⁺ and nestin⁺) on the background of death of the more differentiated neuronal progenitors (β -tubulin⁺). The assessment of adhesive potential of FNCs has shown that the applied freezing regimens modify the expansion of adhesion molecules in FNCs in a different extent: either stimulation or inhibiting. There was found a time delay by 1–2 days in appearance of neurospheres independently on the used cryopreservation regimen, thereat the quantity of the formed neurospheres was determined by freezing conditions.

Thus low temperature preservation may be considered as the method of modifying the structural and functional state of biological object, allowing to control the therapeutic potential of FNCs.

Сон в структуре ответа организма на различные виды холодовых воздействий

Е.А. ВЕНЦКОВСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Sleep in Structure of Organism Response to Different Cold Effects

E.A. VENTSKOVSKAYA

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

Холод, активируя систему терморегуляции, запускает как автономные, так и поведенческие механизмы, направленные на изменение уровня продукции и отдачи тепла. Если метаболические, циркуляторные и гормональные ответы организма на холодовые воздействия хорошо изучены, то многие физиологические проявления этих изменений и в частности изменения сна – изучены недостаточно.

Цель работы – изучить влияние различных видов холодовых воздействий, отличающихся уровнем активации тиреоидной системы на адаптационные способности и цикл сон-бодрствование крыс.

Эксперименты одобрены Комитетом по биоэтике при ИПКиК НАН Украины и проведены на крысах-самцах линии Вистар. Изучены разные виды воздействий, отличающихся длительностью и кратностью влияния холодового фактора, уровнем активации тиреоидной системы: длительное холодовое воздействие (ДХВ) осуществлялось содержанием животных при 4°C в течение 30–40 дней; ритмические (РХВ) – животных подвергали в течение 2-х дней 2-м сериям из 9 охлаждений по 15 мин при –12°C (РХВ1) или 10°C (РХВ2) с интервалами по 45 мин при 23°C. В сыворотке крови измеряли концентрацию тиреоидных гормонов и конечных продуктов обмена оксида азота. Адаптационные способности оценивали в тесте вынужденного плавания в холодной воде. Изменения цикла бодрствование-сон анализировали по общепринятым критериям.

Во всех случаях холодовые воздействия приводили к формированию акклимации, выражающейся или в увеличении времени пребывания животных в холодной воде за счет доминирования пассивных форм поведения или повышении устойчивости температуры тела. При этом уровень активации тиреоидной системы, являющейся ведущей в метаболическом обеспечении процессов холодовой акклимации, уменьшался от ДХВ к РХВ1 и был минимальным при РХВ2. Холодовые воздействия приводили к изменению глубины и длительности сна: ДХВ увеличивали глубину и длительность как медленноволнового сна (МВС), так и парадоксального (ПС); РХВ1 – к увеличению длительности только ПС; РХВ2 – длительности МВС. При РХВ отмечалось изменение концентрации конечных продуктов обмена оксида азота в сыворотке крови, значительное их повышение наблюдалось при РХВ2.

Таким образом, холодовые воздействия, повышая адаптационные способности организма, в разной степени активируют тиреоидную систему. Изменения сна при этом могут отражать глубину вовлечения системы терморегуляции в процесс нормализации температурного гомеостаза, а концентрация конечных продуктов обмена оксида азота в крови определяет ее направленность.

Cold activates the system of thermoregulation and thereby triggers both autonomous and behavioral mechanisms directed to the change in the level of heat production and rejection. Meanwhile metabolic, circulatory and hormonal responses of an organism to cold effects have been well studied, many physiological manifestations of these changes and in particular the one in sleep have been insufficiently investigated.

The research aim was to study the effect of different kinds of cold effects differing by the level of activation of thyroid system on adaptation abilities and sleep-wake cycle in rats.

The experiments approved by the Committee in Bioethics at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine were carried-out in Wistar male rats. There were studied different types of effects altering by the duration and repetition of cold effect, level of thyroid system activation: long-term cold effect (LTCE) was caused by maintaining the animals at 4°C for 30–40 days: rhythmic cold effects (RCE) were performed by subjection of the animals to 2 sessions of nine 15-min-long coolings during 2 days at –12°C (RCE1) or 10°C (RCE2) with 45-min-long pauses at 23°C. In blood serum there was measured the concentration of thyroid hormones and final products of nitrogen oxide exchange. Adaptation abilities were tested using test of forced swimming in cold water. The changes in sleep-wake were analyzed according to standard criteria.

In all the cases the cold effects resulted in the formation of acclimation manifested in either increased time of animals staying in cold water due to dominating passive forms of behavior or in the enhanced resistance of body temperature. Herewith the level of activation of thyroid system, being the leading one in metabolic provision of cold acclimation processes, reduced from LTCE to RCE1 and was minimal at RCE2. Cold effects led to the altered depth and duration of sleep: LTCE increased the depth and duration both of slow wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS); RCE1 raised the duration only of PS, and RCE2 did the duration of SWS. At RCE there was found the change in concentration of final metabolic products of nitrogen oxide in blood serum, their significant rise was observed at RCE2.

Thus the cold effects activate thyroid system in a different extent by increasing the adaptation capabilities of an organism. The change in sleep thereat can reflect the depth of involving the thermoregulation system into normalization of temperature homeostasis, and concentration of final products of nitrogen oxide metabolism in blood determines its orientation.

Анализ экспрессии гена *ido* в мезенхимальных стволовых клетках фетальной печени мышей после криоконсервирования

А.Ю. ДИМИТРОВ, О.В. ЧЕЛОМБИТЬКО, П.А. БОРИСОВ, М.В. ОСТАНКОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Analysis of *ido* Gene Expression in Mesenchymal Stem Cells of Mice Fetal Liver after Cryopreservation

A.YU. DIMITROV, O.V. CHELOMBITKO, P.A. BORISOV, M.V. OSTANKOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Благодаря содержанию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с уникальной иммуномодулирующей активностью фетальная печень (ФП) заняла ключевое место в клеточной терапии аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Один из механизмов влияния МСК на иммунные клетки реципиента реализуется через продукцию индоламин 2,3-диоксигеназы. Существенно, что на разных этапах гестации ФП изменяется как содержание МСК в органе, так и их структурно-функциональный статус, в том числе спектр продуцируемых медиаторов, что не может не влиять на их иммуномодулирующие свойства. Установлено, что иммуномодулирующая активность МСК ФП изменяется после низкотемпературного воздействия и может даже превышать активность нативных клеток. Изучение состава ФП на разных этапах гестации, а также анализ уровня экспрессии гена *ido* в нативном и криоконсервированном материале поможет более эффективно использовать его для лечения АИЗ. Цель исследования – сравнительное изучение функциональной активности гена *ido* в МСК ФП разных сроков гестации после криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки фетальной печени (КФП) мышей 14 и 18 суток гестации. Фракция CD105⁺ КФП была получена методом иммуномагнитной сортировки на BD IMagnet (BD, США) с использованием моноклональных антител (МАТ) к молекулам CD105 (BD, США). Анализ выделенной фракции проводили методом проточной цитометрии на FACS Calibur (BD, США) с использованием МАТ (BD Biosciences, США) к молекулам CD105, CD73 и CD44. Адгезивный потенциал анализировали по стандартным методам [Сергеева Н.С., 2006]. Для индукции остеогенного дифференцирования проводили культивирование выделенных CD105⁺ клеток по Т.М. Гринчуку (2008). Фракции КФП замораживали под защитой 10% ДМСО на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C. Экспрессию гена *ido* в общей суспензии клеток ФП, а также в выделенных на магнитном сортере фракциях CD105⁻ и CD105⁺ (МСК) до и после криоконсервирования определяли методом ПЦР-РВ на амплификаторе АНК-16 (Россия).

Показано, что большая часть выделенных CD105⁺ клеток несет маркеры CD73 и CD44; аттестация функциональной активности в системе *in vitro* позволила отнести их к МСК. По мере увеличения срока гестации в клетках общего пула КФП, а также в выделенных фракциях наблюдается снижение уровня экспрессии гена *ido*. Установлены изменения в степени экспрессии гена *ido* в МСК ФП после криоконсервирования: МСК после криоконсервирования характеризовались более высоким содержанием транскриптов *ido*.

Due to presence of mesenchymal stem cells (MSC) with a unique immunomodulating activity the fetal liver (FL) have taken a key place in cell therapy of autoimmune diseases (AID). One of the mechanisms of MSC effect on recipient's immune cells is implemented through production of indoleamine 2,3-dioxygenase. Of importance is that MSC content in FL of different gestation terms is different as well as their structural-functional state including the spectrum of produced mediators affecting their immunomodulating properties. Immunomodulating activity of FL MSC is shown to be changed after low-temperature exposure and could even exceed activity of native cells. Study of FL composition at different gestation terms and analysis of *ido* gene expression level in native and cryopreserved material will enable its more effective application to treat AID. The research aim was to study comparatively the *ido* gene functional activity in FL MSC of different gestation terms after cryopreservation.

Research objects were mice fetal liver cells (FLC) of the 14th and 18th gestation days. CD105⁺ fraction of FLC was obtained by immunomagnetic sorting with BD IMagnet (USA) and monoclonal antibodies (MAB) to the molecules CD105 (BD, USA). Isolated fraction was analyzed by flow cytometry with FACS Calibur (BD, USA) using MAB (BD Bioscience, USA) to the molecules CD105, CD73 and CD44. An adhesive potential was analyzed by standard methods [Sergeeva N.S., 2006]. For induction of osteogenic differentiation we carried out the culturing of isolated CD105⁺ cells according to [Grinchuk T.M., 2008]. FLC fraction was frozen under 10% DMSO protection using a programmable freezer UOP-6 (Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine) with the cooling rate of 1 deg/min down to –25°C with the following plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 40°C. Expression of *ido* gene in general FL cell suspension as well as the isolated with magnetic sorter CD105⁻ and CD105⁺ fractions (MSC) prior to and after cryopreservation were determined by RT-PCR method with amplifier ANK-16 (Russia).

We have shown that the most part of isolated CD105⁺ cells carried the markers of CD73 and CD44. Attestation of their functional activity *in vitro* allowed to refer them to MSC. With increasing a gestation term in the cells of FLC general pool and in isolated fractions the decrease of *ido* gene expression level was observed. The changes of *ido* gene expression level in FL MSC after cryopreservation have been established: MSC after cryopreservation were characterized by higher content of *ido* transcripts.

Влияние криоконсервирования на уровень экспрессии гена *nanog* в мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клетках фетальной печени мышей ранних сроков гестации

П.А. БОРИСОВ, А.Ю. ДИМИТРОВ, О.В. ЧЕЛОМБИТКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation on *nanog* Gene Expression in Mouse Fetal Liver Mesenchymal and Hemopoietic Stem Cells of Early Gestation Terms

P.A. BORISOV, A.YU. DIMITROV, O.V. CHELOMBITKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Биологический материал фетального происхождения широко используется в клеточной терапии. Мезенхимальные (МСК) и гемопоэтические (ГСК) стволовые клетки фетальной печени (КФП) положительно зарекомендовали себя при лечении аутоиммунных заболеваний. Показано, что наибольшим потенциалом обладают клетки ранних сроков гестации, однако он уменьшается в процессе их дифференцировки, что связано со снижением уровня экспрессии *stemness*-генов, в частности гена *nanog*. Криоконсервирование позволяет не только сохранить биообъект, но и изменить его свойства, в том числе на геномном и постгеномном уровнях.

Цель исследования – изучение влияния криоконсервирования на экспрессию гена *nanog* в субпопуляциях КФП (МСК и ГСК) мышей ранних сроков гестации.

В эксперименте использовали КФП мышей линии C57BL. Клеточная суспензия была получена путем гомогенизации фетальной печени мышей 14-х суток гестации в среде 199. Фракции CD105⁺ (МСК) и CD117⁺ (ГСК) были выделены иммуномагнитным сортированием с использованием соответствующих моноклональных антител. КФП криоконсервировали под защитой 10% ДМСО в программном замораживателе со скоростью охлаждения 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию пропидий йодидом. Экспрессию гена *nanog* в выделенных субпопуляциях нативных и криоконсервированных клеток оценивали методом ПЦР-РВ. Статистический анализ был выполнен в программе Origin 6.0 с использованием t-теста Стьюдента.

Криоконсервирование позволило сохранить 76,2 ± 2,8 и 88,0 ± 3,2% жизнеспособных МСК и ГСК соответственно. Уровень экспрессии *nanog* в субпопуляциях нативных и криоконсервированных стволовых клеток статистически отличался. Замораживание-оттаивание в разной степени снижало уровень экспрессии гена в МСК и ГСК, что может повлиять на терапевтический потенциал КФП. Следовательно, влияние криоконсервирования на морфологическое и функциональное состояние хранящихся объектов требует дополнительных исследований, а особенно экспрессии генов, регулирующих плюрипотентность стволовых клеток. Дальнейшие исследования позволят оптимизировать протоколы криоконсервирования фетального материала и повысить эффективность клеточной терапии.

Biological material of fetal origin is widely used in cell therapy. Mesenchymal (MSC) and hemopoietic (HSC) stem cells of fetal liver (FLC) render a positive effect when treating autoimmune diseases. It was shown, that the biggest potential is presented by cells of early gestation, but it became lower during differentiation, that is associated with decrease of *stemness*-genes expression level, particularly *nanog* gene. Cryopreservation allows not only to preserve the biological object, but to change its properties at genome and postgenome levels.

The research aim was to study the cryopreservation effects on *nanog* gene expression in FLC (MSC and HSC) subpopulations from mouse embryos of early gestation.

FLC from C57BL mice were used in the experiment. Cell suspension was obtained by homogenization in medium 199 of mouse fetal liver of the 14th gestation day. CD105⁺ (MSC) and CD117⁺ (HSC) fractions were isolated by immunomagnetic sorting using corresponding monoclonal antibodies. FLC were cryopreserved under protection of 10% DMSO with a programmable freezer with 1 deg/min cooling rate down to –25°C with the following plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C. Cell viability was assessed by propidium iodide staining. Expression of *nanog* gene in isolated native and cryopreserved cell subpopulations was examined by qRT-PCR. Statistical analysis was performed by Origin 6.0 software using Student's t-test.

Cryopreservation enabled to preserve 76.2 ± 2.8% and 88.0 ± 3.2% of viable MSC and HSC, correspondingly. The level of *nanog* expression in subpopulations of native and cryopreserved stem cells was statistically different. The freeze-thawing decreased the gene expression to different extents in MSCs and HSCs, which may affect a therapeutic potential of FLCs. Consequently, cryopreservation effect on morphological and functional state of the stored objects requires additional research. Special attention should be paid to the cryopreservation effect on expression of genes regulating pluripotency of stem cells. Further studies will allow to optimize the protocols for cryopreservation of fetal material and increase efficiency of cell therapy.

Изменение структурно-функционального состояния неокортекса хомяков при холодной акклимации и зимней спячке

К.И. БУЦКИЙ^{1,2}, В.С. МАРЧЕНКО¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Change of Structural-Functional State of Hamster Neocortex During Cold Acclimation and Hibernation

K.I. BUTSKY^{1,2}, V.S. MARCHENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

Моделирование состояния искусственной гибернации, близкой к естественной, у крупных млекопитающих и человека имеет огромное практическое значение. Однако установлено, что при зимней спячке существенным образом редуцируется дендритное древо нейрональной сети коры головного мозга и многих подкорковых структур, что может привести к потере памяти.

Цель работы – комплексная оценка влияния гипотермии на структуру и функции головного мозга.

В первой серии экспериментов изучали морфометрические характеристики нейронов коры головного мозга контрольных и опытных животных. Для оценки сложности нейрональной сети и отдельных нейронов гибернирующего мозга был применен фрактальный анализ. Обнаружено, что структура дендритного древа существенно редуцируется при гибернации, полностью восстанавливаясь при пробуждении.

Представлялось целесообразным выяснить, влияют ли данные структурные изменения на функциональную активность. Поэтому в следующей серии экспериментов изучали влияние разных холодových воздействий (циклическая и длительная акклимация) на выработку условного рефлекса у хомяков. Было показано, что после холодových воздействий у хомяков повышается скорость реакции избегания на безусловный раздражитель – поток горячего воздуха 50°C (условный раздражитель – свет, лампа накаливания мощностью 60 Вт). Наиболее ярко этот эффект проявляется при длительной акклимации.

Для определения причин и механизмов холодной стимуляции условно-рефлекторной деятельности, ускорения формирования реакции избегания оценивались изменения частотных характеристик биоэлектрической активности мозга. Спектрально-корреляционный анализ электроэнцефалограмм показал, что биоэлектрическая активность мозга после длительной температурной акклимации (с высокой скоростью выработки рефлекса) характеризуется высокоамплитудным секундным ритмом и высоким уровнем пространственной когерентности тета-ритма электроэнцефалограммы. Высокая скорость формирования реакции избегания может быть связана с нейрофизиологическими процессами, обусловленными высоким уровнем пространственной когерентности тета-ритма.

Modeling of state of artificial hibernation close to natural one in large mammals and humans is of great practical value. However, it has been established that during hibernation a dendritic tree is significantly reduced in neural net of cerebral cortex and in many subcortical structures that could lead to the loss of memory.

The research aim was to perform integral assessment of hypothermia effect on the brain structure and functions.

Morphometric characteristics of cortical neurons in the control and experimental animals were studied in the first series of experiments. Fractal analysis was applied to assess the complexity of neural net and separate neurons of hibernating brain. We have noted that the structure of dendritic tree is significantly reduced during hibernation and completely recovered when awakening.

It seemed appropriate to find out whether the structural changes affect the functional activity. Herewith in the next series of experiments we studied the effect of different cold exposures (cyclic and long-term acclimation) on production of conditioned reflex in hamsters. We have shown after cold exposures in hamsters there is increased the rate of avoidance response to unconditioned stimulus, flow of 50°C hot air (conditioned stimulus was the light, lamp of 60W capacity). This effect is most pronounced at long-term acclimation.

To determine the causes and mechanisms in cold stimulation of conditioned reflex activity, accelerations in formation of avoidance response we assessed the changes in frequency characteristics of brain bioelectrical activity. Spectral-correlation analysis of electroencephalograms has shown that bioelectrical activity of hamster brain after long-term temperature acclimation (with a high rate of reflex formation) was characterized by a high-amplitude second rhythm and high level of spatial coherence of theta-rhythm in electroencephalogram. High rate of avoidance response formation can be associated with neurophysiological processes stipulated by a high level of theta-rhythm in spatial coherence.

Фотометрический метод оценки качества спермы карпа

А.Ю. ПУГОВКИН^{1,2}, Е.Ф. КОПЕЙКА¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Photometric Method for Assessing Quality of Carp Sperm

A.YU. PUGOVKIN^{1,2}, E.F. KOPEYKA¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

Предложен экспресс-метод оценки проницаемости мембран сперматозоидов карпа, основанный на анализе динамики светопропускания суспензии клеток, помещенных в гипотоничные среды. Скорость изменения объема клетки определяется структурой клеточной мембраны и будет тем выше, чем выше проницаемость мембраны.

Согласно предложенной модели сперматозоиды карпа – большие шарообразные частицы ($a > 1$) с показателем преломления, близким показателю преломления воды. Для измерения светопропускания клетки помещают в кювету с гипотоничным раствором известной осмолярности. С помощью магнитной мешалки содержимое кюветы постоянно перемешивается. Фотозлектроколориметр измеряет светопропускание, фиксируемое на ленте самописца.

Поскольку светопропускание увеличивается за счет изменения показателя преломления спермы, можно утверждать, что оно изменяется одновременно с увеличением клеточного объема. Именно этим можно объяснить проявление закономерностей, характерных для динамики объема, в динамике светопропускания. В большинстве измерений ($n \sim 200$) зависимости светопропускания от времени корректно аппроксимируются функцией вида $T = 1 - e^{-kt}$, т. е. динамика светопропускания описывается той же функциональной зависимостью, что и изменение клеточного объема со временем согласно модели. В зависимости от осмотической концентрации среды инкубации наблюдаются различные значения относительного светопропускания: чем больше перепад осмотического давления, тем больше изменение светопропускания. С погрешностью приблизительно до 10% выполняется линейная зависимость $k = \gamma L_p \pi^{out}$, позволяющая вычислить значение γL_p – коэффициента проницаемости мембран. Показано, что проницаемость клеточных мембран, оцениваемая предложенным методом, не зависит от концентрации клеток в среде инкубации.

С использованием данного метода изучено влияние времени хранения спермы карпа после её получения, влияние гормональной стимуляции самцов и криоконсервирования на скорость изменения объема клеток, значения которой позволяют судить о проницаемости мембран сперматозоидов и, следовательно, качестве спермы. Начальное качество спермы является одним из важных параметров, влияющих на результат криоконсервирования. Показано, что после криоконсервирования скорость изменения объема существенно возрастает, что свидетельствует о повреждении структуры клеточных мембран, быстрой потере клетками энергетического потенциала, следовательно, возможности использования того или иного метода криоконсервирования.

The express-method of estimation of carp sperm membranes permeability, based on the analysis of light transmission dynamics in the cell suspension, placed into hypotonic medium, is proposed. The rate of cell volume change depends on the structure of cell membrane and would increase, with increasing of membrane permeability.

According to the proposed model, the carp spermatozoa are large spherical particles ($a > 1$) with a refractive index close to refractive index of water. To measure the light transmission the cells were placed into cuvette with hypotonic solution of known osmolarity. The content of cuvette was constantly mixed with a magnetic stirrer. The transmission was measured with photoelectric calorimeter and recorded automatically.

As the light transmission increases due to the changes in the refractive index of the sperm, it can be stated that the transmission is increasing if the cell volume is growing. This can explain the manifestation of regularities that are typical for the dynamics of volume, in the dynamics of light transmission. In the most measurements ($n \sim 200$) the temporal dependencies of light transmission are quite correctly approximated by the function $T = 1 - e^{-kt}$, i. e. the dynamics of light transmission is described by the same functional dependence as the change of cell volume according to the model. Depending on osmotic concentration of incubation medium we observed the different values of relative light transmission: the higher was the difference of osmotic pressure, the higher the change in light transmission was. With error of about 10% the linear dependence $k = \gamma L_p \pi^{out}$ was realized, that allowed to calculate the value of membrane permeability coefficient γL_p . It was shown that the permeability of cell membranes, estimated by the proposed method, was not dependent on the concentration of cells in the incubation medium.

Using this method, we studied how storage duration of carp sperm after its obtaining as well as hormonal stimulation of males and cryopreservation of sperm affected the rate of cell volume change, the values of which allowed estimating the cell membrane permeability and, consequently, the quality of sperm. The initial quality of sperm is one of important parameters that affect the final result of cryopreservation. It was shown, that after cryopreservation the rate of the volume change increased significantly that testified to the damage of cell membrane structure, rapid loss of cell energy potential, and therefore, the applicability of certain cryopreservation method.

Физические состояния водных растворов диметилацетамида и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ при соотношении $R = 1:2$ ниже 0°C

А.О. КРАСНИКОВА¹, А.В. ЗИНЧЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Physical States of Aqueous Solutions of Dimethylacetamide and Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree $n = 5$ at $R = 1:2$ Ratio below 0°C

A.O. KRASNIKOVA¹, A.V. ZINCHENKO²

¹Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

При разработке методов криоконсервирования биологических объектов важно исследовать фазовые переходы и физические состояния криопротекторных сред при охлаждении и нагреве. Оксигилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}) и диметилацетамид (ДМАц) рассматриваются как перспективные криопротекторы. Их комбинация значительно повышает сохранность криоконсервированных тромбоцитов по сравнению с результатами замораживания в средах на основе одного криопротектора [Богданчикова О.А., 2009]. В связи с этим целью настоящей работы являлось исследование фазовых и физических состояний водных растворов ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} в соотношении $R = 1:2$ ниже 0°C методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Водные растворы ДМАц и ОЭГ _{$n=5$} (1:2) готовили на бидистиллированной воде методом взвешивания. Образцы массой 1 г помещали в тонкостенный стакан, после чего погружали в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения составляла 3,3 град/с. Охлажденные образцы помещали в калориметрический блок ДСК, разработанный и изготовленный в ИПКиК НАН Украины. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью сканирования $8,3 \times 10^{-3}$ град/с. На термограммах, снятых при нагреве, зарегистрированы экзо- и эндотермические пики и скачок теплопоглощения. Формирование стеклообразных включений на этапе охлаждения в растворах ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} (1:2) указывает на то, что часть системы находится в метастабильном состоянии. Скачок теплопоглощения регистрируется во всем концентрационном диапазоне. Слабоинтенсивный экзотермический пик (при концентрации криопротектора до 40%) интерпретируется как завершение кристаллизации льда на этапе нагрева. В растворах ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} с концентрацией от 40 до 65% наличие интенсивного экзотермического пика соответствует кристаллизации льда из переохлажденной жидкости на этапе нагрева. На термограммах растворов ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} с концентрацией выше 65% регистрируется только скачок теплопоглощения, указывающий на процесс расстеклования системы.

Таким образом, установлены закономерности развития кристаллических и аморфных фаз в исследуемой системе. В зависимости от концентрации ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} растворы затвердевают, при этом они представляют гомогенную стеклообразную или гетерогенную систему, которая включает как кристаллическую, так и метастабильную стеклообразную фазы. Благодаря высокой скорости охлаждения образца, начиная с некоторого значения концентрации растворенного вещества, кристаллизация на этапе охлаждения не происходит. Для скорости охлаждения 3,3 град/с граничная концентрация ДМАц + ОЭГ _{$n=5$} (1:2) составляет 40%.

It is important to combine the development of methods for cryopreservation of biological objects and investigation of phase transitions and physical states of cryoprotective media during cooling and heating. Oxyethylated glycerol with a polymerization degree of $n = 5$ (OEG _{$n=5$}) and dimethylacetamide (DMAc) are considered as promising cryoprotectants. Their combination significantly increases survival of frozen-thawed platelets if compared to results of freezethawing in media based on one cryoprotectant [Bogdanchikova O.A., 2009]. Therefore, the research aim was to study phase and physical states of aqueous solutions DMAc + OEG _{$n=5$} in the ratio $R = 1:2$ below 0°C by differential scanning calorimetry.

Aqueous solutions of DMAc and OEG _{$n=5$} (1:2) were prepared in bidistilled water by weight method. The samples of 1 g were placed in a thin-walled jar, and then plunged into liquid nitrogen. The average cooling rate was 3.3 deg/s. The cooled samples were placed into DSC calorimetric unit, designed and manufactured at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. Thermograms were recorded during heating with a scanning rate 8.3×10^{-3} deg/s. In the thermograms obtained during heating we revealed exo- and endothermic peaks and the jump in heat absorption. Formation of glass inclusions during cooling of DMAc + OEG _{$n=5$} (1:2) solution indicates that a part of system was in a metastable state. The jump in heat absorption was observed in the whole concentration range. Low-intensity exothermic peak (at cryoprotectant concentration up to 40%) was interpreted as completion of ice crystallization during heating. In solutions of DMAc + OEG _{$n=5$} in concentrations from 40 to 65% the presence of intensive exothermic peak corresponded to ice crystallization in supercooled liquid during heating. In the thermograms of DMAc + OEG _{$n=5$} solutions with concentration above 65% there was recorded only a heat absorption jump, indicating devitrification of the system.

Thus, we established the regularities of crystal and amorphous phase development in the studied system. Depending on the concentration of DMAc + OEG _{$n=5$} solutions were getting solid, thereat they represented a homogeneous or heterogeneous glass system, including both crystal and metastable glass phase. Due to a high rate of sample cooling no crystallization during cooling occurred starting from a certain concentration of solved substance. For cooling rate of 3.3 deg/s this limit concentration of DMAc + OEG _{$n=5$} (1:2) was 40%.

Модификация характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под влиянием факторов криоконсервирования

О.В. ЧЕЛОМБИТЬКО, О.В. САФРАНЧУК,
Н.А. БОНДАРОВИЧ, М.В. ОСТАНКОВ, А.Ю. ДИМИТРОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of Ehrlich Carcinoma Cell Properties under Effect of Cryopreservation Factors

O.V. CHELOMBITKO, O.V. SAFRANCHUK, N.A. BONDAROVICH, M.V. OSTANKOV, A.YU. DIMITROV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Стволовые раковые клетки в общей популяции трансформированных клеток могут быть информативным маркером, который является показателем эффективности проведенной терапии. В современной практической медицине для лечения опухолей используется метод криодеструкции, однако его внедрение не исключает возникновение рецидивов. Поэтому изучение молекулярно-генетических механизмов ответа опухолевых клеток на действие холода остается актуальным. Одной из удобных экспериментальных моделей онкопатологий является асцитическая форма аденокарциномы Эрлиха (АКЭ), которая представляет собой штамм перевиваемых клеток спонтанного рака молочной железы мыши. Цель исследования - оценить молекулярно-генетические показатели клеток АКЭ 7- и 14-и суток культивирования, а также характер их изменений после криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки АКЭ 7- и 14-и суток культивирования, которые вводили внутривентриально 7-месячным самкам мышей линии BALB/c и снова получали на 7- и 14-е сутки (АКЭ-7, АКЭ-14). Материал замораживали-отогревали в асцитической жидкости без использования криопротекторов по двухэтапной программе. Процентный состав субпопуляций с маркерами CD44^{high} в общей популяции клеток АКЭ определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью пропидий йодида (PI). Аттестацию материала после культивирования *in vivo* осуществляли на 7- и 14-е сутки. Уровень экспрессии генов *sox2*, *nanog*, *bmi-1* в общей популяции клеток АКЭ-7 и АКЭ-14 определяли методом ОТ-ПЦР, продукты амплификации – на биоанализаторе Agilent 2100 (США).

Анализ структурно-функциональных характеристик общей популяции АКЭ до и после замораживания-отогрева показал, что клетки, которые экспрессировали на своей поверхности маркеры CD44 в культурах изучаемых сроков, по-разному отвечали на действие холода. При анализе генетических характеристик установлено, что уровень экспрессии всех определяемых генов в нативных клетках снижался по мере развития АКЭ, а после замораживания-отогрева в АКЭ-7 действие холода вызывало угнетение уровня экспрессии, а в АКЭ-14 наблюдались обратные эффекты. На основании полученных данных возникает необходимость проведения дальнейших исследований по аттестации ответа клеток, индуцирующих опухоль, на действие факторов замораживания-отогрева.

Cancer stem cells as a part of total population of transformed cells may be an informative marker or the efficient indicator for the carried-out therapy. In modern practical medicine the cryodestruction method is applied to treat the tumors but its implementation does not exclude the backset of disease. So the study of molecular-genetic mechanisms of tumor cell response to cold effect has remained an actual one. One of the suitable experimental oncopathology models is an ascitic form of Ehrlich carcinoma (EC) representing the strain of passaged cells of spontaneous cancer in murine mammary gland. The research aim was to evaluate the molecular-genetic indices of EC cells of 7 and 14 culturing days as well as the character of their changes after cryopreservation.

Research objects were EC cells of 7 and 14 culturing days that were injected intraperitoneally into 7-month-old BALB/c female mice and were again isolated to the 7th and 14th days (EC-7, EC-14). The material was frozen-thawed in ascitic liquid without cryoprotectants using two-step cooling program. Percentage of subpopulations with markers CD44^{high} in total EC cell population was determined with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Cell viability was assessed with propidium iodide. Attestation of material after *in vivo* culture was performed in the 7th and 14th days. Level of *sox2*, *nanog*, *bmi-1* genes expression in total population of EC-7 and EC-14 cells was determined by PCR-RT method, amplification products were assessed with Agilent 2100 Bioanalyzer (USA).

Analysis of structural-functional characteristics of total EC population prior to and after freeze-thawing has shown that cells expressing CD44 markers on their surface in the cultures of the studied terms provided different response to the cold effect. Analyzing the genetic characteristics we have established that expression level of all the determined genes in native cells decreased as EC developed, and after freeze-thawing the cold effect caused suppression of expression level in EC-7 and reverse effects were noted in EC-14. Basing on the obtained data it is necessary to perform further investigations to attest the response of tumor inducing cells to the effect of freeze-thawing factors.

Экспрессия β -III-тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят, полученной из криоконсервированных фрагментов ткани

О.С. СИДОРЕНКО, Г.А. БОЖОК, Е.И. ЛЕГАЧ, Т.П. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Expression of β -III-Tubulin in Adrenal Cell Culture of Newborn Piglets Derived from Cryopreserved Tissue Fragments

O.S. SIDORENKO, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH, T.P. BONDARENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Известно, что хромоаффинные клетки надпочечников и симпатические нейроны являются производными клеток нервного гребня и развиваются из общей клетки-предшественника. В культуре под действием фактора роста нервов NGF недифференцированные клетки мозгового вещества надпочечников приобретают морфологические и функциональные особенности нейрональных клеток, а зрелые хромоаффинные клетки способны к трансдифференцировке в нейрональном направлении. Благодаря способности хромоаффинных клеток трансформироваться в нейроны, они рассматриваются как источник аутогенного клеточного материала для трансплантации пациентам с болезнью Паркинсона.

Источником клеток нейрональной морфологии в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят являются сферические клеточные структуры (сфероиды), формирующиеся к 5–7-м суткам культивирования. Поскольку криоконсервирование является наиболее удобным способом долгосрочного хранения фрагментов ткани, необходимо изучить его влияние на сохранность недифференцированных клеток надпочечников.

Целью работы было получить первичную культуру клеток надпочечников новорожденных поросят из криоконсервированных фрагментов ткани и исследовать возможность получения сфероидов и клеток нейрональной морфологии.

Фрагменты надпочечников криоконсервировали под защитой 10% ДМСО, охлаждая со скоростью 0,5 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Клетки получали ферментативным методом после предварительного отогрева фрагментов и культивировали в среде DMEM/F12 с 10% фетальной телячьей сыворотки. Для пересева клетки снимали с помощью растворов трипсина и Версена. Для идентификации нейрональных клеток проводили иммуноцитохимическое окрашивание на β -III-тубулин.

Жизнеспособность клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов ткани, составляла $93,3 \pm 5\%$. Через сутки культивирования наблюдалось прикрепление и распластывание большей части посаженных клеток, а к 5-м суткам – формирование монослоя и сфероидов. После пересева сфероиды прикреплялись к поверхности культивирования, а затем наблюдалось выселение из них нейроноподобных клеток с отростками. Иммуноцитохимическое окрашивание показало наличие β -III-тубулина в соме и отростках клеток, выселяющихся из сфероидов.

Таким образом, криоконсервирование фрагментов ткани надпочечников новорожденных поросят со скоростью охлаждения 0,5 град/мин позволяет сохранить популяцию клеток, формирующих сфероиды и их способность к дифференцировке в нейрональном направлении.

It has been known that adrenal chromaffin cells and sympathetic neurons are derivatives of neural crest cells and are developed from common precursor cell. Non-differentiated cells of adrenal medulla gain morphological and functional peculiarities of neuronal cells in culture under effect of neural growth factor, and mature chromaffin cells are capable of transdifferentiation towards neurons. Due to capability of chromaffin cells to transform into neurons they may be considered as a source of autologous cell material for transplantation to the patients with Parkinson's disease.

The source of cells with neuronal morphology in culture of newborn piglet adrenal cells are spherical cell structures (spheroids) formed to the 5–7th day of culture. Whereas cryopreservation is the most convenient method of tissue fragments long-term storage, it is necessary to study its effect on survival of non-differentiated adrenal cells.

The research aim was to obtain primary culture of newborn piglet adrenal cells using cryopreserved tissue fragments and to check the possibility to obtain spheroids and cells of neuronal morphology.

Adrenal fragments were cryopreserved under protection of 10% DMSO and cooling rate of 0.5 deg/min down to -40°C with further plunging into liquid nitrogen. The cells were obtained by enzymatic method after thawing the fragments and then cultured in DMEM/F12 with 10% fetal calf serum (FCS). Before passaging the cells were detached with trypsin and Versene solutions. Neuronal cells were identified by immunocytochemical staining for β -III tubulin.

Viability of cells derived from cryopreserved tissue fragments was $93.3 \pm 5\%$. After one day culture we observed adhesion and flattening of bulk of the seeded cells, and to the 5th day there was formation of monolayer and spheroids. After passaging the spheroids adhered to culture surface, and then we observed the migration of neuron-like cells with processes. Immunocytochemical staining showed the presence of β -III tubulin in soma and processes of cells, migrated from spheroids.

Thus, cryopreservation of fragments of adrenal tissue of newborn piglets using the cooling rate of 0.5 deg/min enabled to preserve the cell population, which formed spheroids, as well as the ability to differentiate towards neurons.

Влияние различных концентраций ДМСО и ЭТС в составе криозащитных сред на морфо-функциональные свойства клеток надпочечников новорожденных мышей

И.В. ТАМАРИНА, Г.А. БОЖОК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Different DMSO and FBS Concentrations in Cryoprotective Media on Morphofunctional Properties of Adrenal Cells of Newborn Mice

I.V. TAMARINA, G.A. BOZHOK

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

Данное исследование посвящено разработке состава криозащитной среды для суспензии клеток надпочечников (СКН) новорожденных мышей, которая позволила бы достичь максимальной сохранности морфофункциональных характеристик клеток после замораживания-оттаивания. Клетки надпочечников новорожденных мышей являются объектом для исследования процессов синтеза и секреции гормонов, дифференцировки и трансдифференцировки клеток, происходящих из нервного гребня, а также для тестирования фармакологических препаратов, поэтому их криоконсервирование является актуальной задачей.

Целью нашей работы было исследовать влияние различных концентраций ДМСО (5; 7,5; 10; 15; 20 и 30%) и ЭТС (0; 10 и 25%) в составе криозащитных сред на морфофункциональные свойства клеток надпочечников новорожденных мышей.

Образцы СКН охлаждали со скоростью 1 град/мин до -40°C на программном замораживателе «Cryoson» (Германия) с последующим погружением в жидкий азот. Клетки подвергались ступенчатой отмывке от криопротектора, определялись их жизнеспособность по методу исключения трипанового синего и сохранность количества. Функциональное состояние суспензии оценивали по способности клеток к адгезии и распластыванию в условиях культивирования, а также секреции альдостерона в культуральную среду. Культивирование проводили на среде, содержащей амфотерицин, гентамицин, 10% ЭТС, в атмосфере с 5% CO_2 при постоянной влажности и температуре 37°C .

В результате проведенных исследований было установлено, что в присутствии 15 и 20% ДМСО, с ЭТС и без нее для клеток были характерны высокие показатели жизнеспособности (63–76%) и сохранности количества (78–99%). В культурах клеток, замороженных-отогретых в бессывороточных средах, количество прикрепленных клеток составляло 10–36% от контроля, уровень секреции альдостерона – 0,1% от контроля. В культурах клеток, замороженных с ЭТС, количество прикрепленных клеток составляло 30–95% от контроля, секреция альдостерона – 1,5–20% от контроля. Наивысшие показатели секреции альдостерона (20%), количества распластанных и прикрепленных клеток были в образцах, замороженных-отогретых с 20% ДМСО и 25% ЭТС. По-видимому, это связано с тем, что криопротекторные свойства ДМСО в концентрации 20% для данного типа клеток оптимальны, тогда как цитотоксические эффекты криопротектора могут нивелироваться присутствием ЭТС.

This research was devoted to formulation of cryoprotective medium composition for newborn mice adrenal cell suspension (ACS), which would enable to preserve maximally the morphofunctional characteristics of cells after freezing-thawing. Adrenal cells of newborn mice are the objects to study hormone synthesis and secretion, differentiation and transdifferentiation of cells, derived from neural crest, as well as to test the pharmacological preparations, therefore their cryopreservation is an actual task.

The research aim was to study the effect of different DMSO (5; 7.5; 10; 15; 20 and 30%) and FBS (0; 10 and 25%) concentrations in cryoprotective media on morphofunctional properties of adrenal cells of newborn mice.

The samples of ACS were cooled with rate of 1 deg/min down to -40°C with a programmable freezer Cryoson (Germany) with the following plunging into liquid nitrogen. After thawing the cells were stepwise washed free of cryoprotectant, then we assessed their viability using trypan blue exclusion as well as the number of survived cells. Functional state of suspension was assessed by ability of cells to adhere and to flatten during culture, as well as aldosterone secretion into cultural medium. Culturing was performed in the medium, containing amphotericin, gentamicin, 10% FBS in 5% CO_2 atmosphere with constant humidity and temperature of 37°C .

As a result of performed research we established high indices of post thaw cell viability (63–76%) and survival (78–99%) in cases of 15 and 20% DMSO solutions supplemented with FBS or FBS free. In cell cultures frozen-thawed in serum-free media a number of adhered cells was 10–36% from the control, aldosterone secretion level made 0.1% from the control. In cell cultures frozen-thawed in FBS enriched media the number of adhered cells made 30–95% from the control, and aldosterone secretion was 1.5–20% from the control. The highest indices of aldosterone secretion (20%), number of flattened and adhered cells were in samples frozen-thawed in solution of 20% DMSO and 25% FBS. Obviously it was associated with fact that the 20% concentration of DMSO possessed optimal cryoprotective properties for this type of cells, whereas the cytotoxic effects of cryoprotectant may be neutralized by FBS.

Гипотермическое хранение изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава

М.В. ШЕВЧЕНКО

Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

Hypothermic Storage of Isolated Nerve Cells of Newborn Rats in Different Composition Media

M.V. SHEVCHENKO

G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

Исследование влияния гипотермических условий на постнатальные изолированные нервные клетки (НК) является актуальным для криобиологии, трансплантологии и медицины. Целью работы явилось изучение влияния гипотермического хранения (ГХ) на поведение в культуре *in vitro* изолированных НК новорожденных крыс в средах различного состава.

НК получали из мозга новорожденных крыс, отмывали и культивировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10% сыворотки крыс. Клетки хранили в течение 1, 2, 3 и 4-х суток при температуре 8°C в солевой (DMEM/F12) и сахарозо-солевой средах (ССС) в присутствии или при отсутствии сыворотки крови крыс. После ГХ клетки культивировали аналогично свежeweыделенным.

В течение одних суток ГХ в СССР с или без сыворотки наблюдалось резкое увеличение жизнеспособности клеток, которая при дальнейшем хранении практически не изменялась. При этом 1 сутки хранения в СССР приводили к резкому снижению количества НК, которое не изменялось в процессе дальнейшего хранения. При ГХ НК в среде DMEM/F12 достаточно интенсивно уменьшалось количество клеток и незначительно повышалась жизнеспособность. Присутствие сыворотки достоверного влияния на жизнеспособность и количество клеток не оказывало.

Гипотермическое хранение в течение суток в средах DMEM/F12 в присутствии или при отсутствии сыворотки и в СССР без добавления сыворотки не оказывало влияния на поведение клеток в культуре по сравнению с контролем. Двухсуточное ГХ в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки практически не влияло на поведение клеток в культуре. При отсутствии сыворотки НК формировали лишь небольшие островки монослоя глии. Нейробласты и колонии при этом не образовывались. Клетки, хранившиеся в СССР без сыворотки, в процессе культивирования формировали небольшое количество нейробластов и колоний, однако они появлялись в более поздние сроки по сравнению с контролем. При культивировании НК, хранившихся в СССР с сывороткой, формировались мелкие рыхлые агрегаты, которые не прикреплялись к подложке; в процессе культивирования клетки погибали. Культивирование НК после 3-х суток ГХ во всех исследованных средах характеризовалось формированием мелких рыхлых агрегатов, которые не прикреплялись к подложке; в дальнейшем клетки агрегатов погибали.

Таким образом, НК можно хранить в гипотермических условиях на протяжении 2-х суток. При этом желательно присутствие сыворотки в среде DMEM/F12 и обязательно ее отсутствие в СССР.

The investigation of hypothermic conditions effect on postnatal isolated nerve cells (NCs) is actual for cryobiology, transplantology and medicine. The research aim was to study the effect of hypothermic storage (HS) on the behavior in culture *in vitro* of isolated newborn rat NCs in different composition media.

NCs were isolated from the brain of newborn rats, washed and cultured in the concentration of 2×10^6 cells/ml in DMEM/F12 enriched with 10% rat serum. The cells were stored during 1, 2, 3 and 4 days at 8°C in saline (DMEM/F12) and sucrose-saline media (SSM) supplemented with or without rat blood serum. After HS the cells were cultured in the same way as fresh cells.

During 1 day of HS in SSM both with or without serum we observed a sharp increase of cell viability index which almost did not change during further storage. Thereat one day storage in SSM led to a sharp decrease of NC number which did not change during the following storage. During HS of NCs in DMEM/F12 the number of cells decreased rather intensively, and their viability increased insignificantly. Presence of serum did not significantly affect the viability and number of cells.

Twenty-four-hour HS in DMEM/F12 with or without serum and in SSM without serum did not affect the cell behavior in culture if compared to the control. Two-day HS in DMEM/F12 in the presence of serum almost did not influence the cell behavior in culture. In the absence of serum the NCs formed only small glial monolayer areas. In this case no neuroblasts and colonies were formed. The cells stored in SSM without serum formed few neuroblasts and colonies during culturing but they appeared later than in the control. When culturing the NCs stored in SSM with serum there were formed the small loose aggregates not attached to the surface. The cells died during culturing. Culturing of NCs after 3 days of HS in all the investigated media was characterized by the formation of small loose aggregates that did not attached to the surface. Afterwards the cells of aggregates died.

Thus the NCs can be stored in hypothermic conditions for 2 days. Thereat the presence of serum is desirable in the case of DMEM/F12 and its absence is necessary in the case of SSM.

Сохранность неонатальной овариальной ткани при гипотермическом хранении в зависимости от композиционного состава среды инкубации

Е.А. МЕДИНЕЦ, В.В. КИРОШКА, Ю.О. ТИШЕНКО, Т.П. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Preservation of Neonatal Ovarian Tissue during Hypothermic Storage Depending on Incubation Medium Composition

E.A. MEDINETS, V.V. KIROSHKA, YU.O. TISCHENKO, T.P. BONDARENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В настоящее время одной из основных проблем в репродуктивной медицине при консервировании овариальной ткани остается сохранение достаточного пула фолликулов, необходимого для восстановления детородной функции у женщин. Для решения этой задачи разрабатываются новые протоколы консервирования и методы трансплантации как половозрелой, так и фетальной овариальной ткани.

Цель данной работы – провести сравнительный анализ морфологической трансформации неонатальной овариальной ткани крыс при гипотермическом хранении (ГХ) в электролитных (фосфатно-солевой буфер – ФСБ) и неэлектролитных средах (маннитолосодержащий раствор – МСР) в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и без нее, а также оценить ее функцию в условиях гетеротопической трансплантации. Для достижения поставленной цели неонатальные яичники для ГХ (4°C) были разделены на группы в зависимости от состава среды инкубации: группа 1 – ФСБ (130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,4); группа 2 – ФСБ + 10% ЭТС; группа 3 – МСР (250 мМ маннита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,4); группа 4 – МСР + 10% ЭТС. Динамику морфологической трансформации фолликулов на 1-е, 2-е, 3-и, 5-е сутки ГХ анализировали микроскопически на полутонких срезах. Функцию неонатальной овариальной ткани после 1-х суток ГХ в исследуемых средах изучали методом гетеротопической трансплантации под капсулу левой почки. Показано, что после 1-х суток ГХ количество морфологически нормальных фолликулов оставалось достаточно высоким (80–90%) во 2, 3 и 4-й группах, тогда как в 1-й группе этот показатель был достоверно ниже (66%). На 2-е сутки ГХ максимум сохранности морфологической структуры неонатальной овариальной ткани наблюдался в инкубационных средах, содержащих 10% ЭТС (группы 2 и 4). Увеличение сроков ГХ приводило к снижению количества нормальных фолликулов до 10–15% во всех исследуемых группах. При этом на 3-и сутки ГХ минимум дегенеративных форм фолликулов с необратимыми изменениями выявлен в группе 2. Анализ роста и развития трансплантатов неонатальной овариальной ткани после ГХ на 30-е сутки наблюдения показал наличие фолликулов различной степени зрелости и желтых тел в группах 1–3, тогда как в группе 4 отсутствовали преантральные и антральные фолликулы, а также желтые тела. При этом фолликулярная плотность (количество фолликулов на 1 мм³) в группе 3 составляла 20,4 ± 2,6, что было сравнимо с контрольной (24,6 ± 3,3).

Таким образом, сохранность морфологической структуры неонатальной овариальной ткани при ГХ наиболее выражена в средах инкубации в присутствии 10% ЭТС, тогда как полноценное развитие трансплантатов после 1-х суток ГХ отмечено после инкубации в среде МСР.

One of the main problems in reproductive medicine during cryopreservation of ovarian tissue is the preservation of sufficient pool of follicles, needed for recovery of fertility in women. To solve this task the new protocols of preservation and transplantation for either mature or fetal ovarian tissues have been developed.

The research aim was to analyze comparatively the morphological transformation of neonatal ovarian tissue of rats during hypothermic storage (HS) in electrolyte (phosphate-based saline (PBS)) and non-electrolyte media (mannitol-containing solution (MCS)) in the presence of fetal bovine serum (FBS) and in serum free ones, as well as to estimate its function during heterotopic transplantation. To do this the neonatal ovaries supposed for HS (4°C) were divided into the groups depending on the incubation medium composition: group 1 – PBS (130 mM NaCl, 20mM KCl, 20 mM phosphate buffer, pH 7.4); group 2 – PBS + 10% FBS; group 3 – MCS (250 mM mannitol, 10 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM phosphate buffer, pH 7.4); group 4 – MCS + 10% FBS. The dynamics of morphological transformation of follicles to the 1st, 2nd, 3rd and 5th days of HS was microscopically analyzed in semi-thin sections. The function of neonatal ovarian tissue after 24 hrs of HS in the studied media was examined by heterotopic transplantation under left kidney capsule. It has been shown that after 24-hour-long HS the number of morphologically normal follicles has remained quite high (80–90%) in the groups 2–4, meanwhile in the group 1 this index was statistically and significantly lower (66%). To the 2nd day of HS the maximal preservation of morphological structure of neonatal ovarian tissue was observed in incubation media containing 10% FBS (groups 2 and 4). The increased HS duration led to a reduced number of normal follicles down to 10–15% in all the studied groups. Herewith to the 3rd day of HS the minimal content of degenerative forms of follicles with irreversible changes was found in group 2. The analysis of growth and development of the neonatal ovarian tissue grafts after HS to the 30th day of observation has demonstrated the presence of follicles of different maturity and yellow bodies in groups 1–3, whilst in group 4 there was no pre-antral and antral follicles, as well as no yellow bodies. Herewith the follicular density (number of follicles per 1mm³) in group 3 made 20.4 ± 2.6 which was comparable with the control one (24.6 ± 3.3).

Thus the preservation of morphological structure of neonatal ovarian tissue during HS was the most manifested in incubation media supplemented with 10% FBS, while a proper development of the grafts after 24 hrs HS was noted after incubation in MCS medium.

Кинетический анализ плавления гемоглобина в присутствии оксиэтилированного производного глицерина

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Kinetic Analysis of Hemoglobin Melting in Presence of Oxyethylated Glycerol

YU.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

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

Состав среды и температура играют существенную роль в поддержании нативной конформации белков. Эти факторы очень важны в криобиологии при разработке технологий криоконсервирования биологических систем в присутствии криозащитных сред. В настоящей работе методом дифференциальной сканирующей калориметрии проведено исследование влияния оксиэтилированного производного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ_{n=5}) на термодинамические и кинетические параметры плавления гемоглобина человека на основе анализа пика плавления.

Гемоглобин получали по известной методике [Fairbanks, 1971] с некоторыми модификациями, оксиэтилированный глицерин (Ивано-Франковск, «Барва») был очищен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ БП Пушино, Московская область, Россия). Область сканирования – от 25 до 90°C при избыточном давлении 2,5 атм. Скорость нагрева 1 град/мин.

Как показано ранее [B. Sengupta, 2005], процесс плавления гемоглобина (HbA) необратим и описывается двухстадийной моделью $N \xrightleftharpoons{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$, включающей частичное обратимое разворачивание белка (1-я стадия) и необратимую денатурацию (2-я стадия). В случае необратимого плавления белков более предпочтительным является кинетический анализ [Любарев, Курганов, 2000].

В настоящей работе для определения энергии активации мы воспользовались одним из четырех подходов, описанных Sanchez-Ruiz (1992), в котором отношение E_a/R может быть определено как тангенс угла наклона зависимости $\ln[vC_{\text{pex}}/(\Delta H - Q)]$ от $1/T$, где E_a – энергия активации; R – универсальная газовая постоянная; T – текущая температура; ΔH – энтальпия плавления (определяется как площадь под кривой зависимости избыточной теплоемкости от температуры); Q – текущее количество теплоты, поглощаемое в процессе денатурации.

Нами рассчитаны значения калориметрической энтальпии плавления, энергии активации и температуры плавления для растворов гемоглобина с добавлением различных концентраций ОЭГ_{n=5}. Увеличение содержания криопротектора в растворе гемоглобина приводит к росту значений энергии активации и уменьшению калориметрической энтальпии и температуры плавления гемоглобина. Таким образом, можно предположить, что увеличение концентрации криопротектора вызывает разрыхление молекул гемоглобина, позволяя тем самым снизить термостабильность белка.

The composition of medium and its temperature play an important role in maintaining the native conformation of proteins. These factors are very important in cryobiology for the development of technologies for low temperature preservation of biological systems in the presence of cryoprotective media. Using differential scanning calorimetry we studied the effect of oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 5$ (OEG_{n=5}) on thermodynamic and kinetic parameters of human hemoglobin melting, basing of the melting peak analysis.

Hemoglobin was derived according to the standard methods [Fairbanks, 1971] with some modifications, oxyethylated glycerol (Barva, Ukraine) was purified at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Thermograms were recorded with differential adiabatic scanning microcalorimeter DASM-4 (Special Design Bureau for Biological Instrumentation, Pushchino, Moscow Region, Russia). Scan area was from 25 to 90°C and surplus pressure of 2.5 atm. Heating rate was 1 deg/min.

B. Sengupta (2005) showed that the process of hemoglobin (HbA) melting was irreversible and could be described by two-stage model $N \xrightleftharpoons{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$, included the partial reversible unfolding of the protein (Stage 1) and irreversible denaturation (Stage 2). Kinetic analysis is more preferable in the case of irreversible protein melting [Lyubarev, Kurganov, 2000].

To determine the activation energy we have used in this research one of the four described by Sanchez-Ruiz (1992) approaches, where the ratio of E_a/R can be defined as slope of the dependence $\ln[vC_{\text{pex}}/(\Delta H - Q)]$ vs. $1/T$, where E_a is activation energy, R is universal gas constant, T is current temperature, ΔH – enthalpy of melting (defined as the area under the curve of dependence of excessive heat capacity vs. temperature), Q is current amount of heat absorbed during denaturation.

We calculated the values of the calorimetric enthalpy of melting, activation energy and melting temperatures for hemoglobin solutions supplemented with of various concentrations of OEG_{n=5}. Rising content of cryoprotectant in the hemoglobin solution led to the increase in the values of activation energy and decrease in the calorimetric enthalpy and temperature of hemoglobin melting. Thus, we can assume that increasing of the cryoprotectant concentration resulted in the loosening of hemoglobin molecules, enabling a reduction of protein thermal stability.

Дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в условиях подавления и стимуляции пролиферации

Е.Ю. РОГУЛЬСКАЯ, Е.Б. РЕВЕНКО, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells under Suppression and Stimulation of Proliferation

O.YU. ROGULSKA, O.B. REVENKO, YU.O. PETRENKO

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

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению биологических свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК), вопросы о взаимосвязи пролиферативной активности клеток и их способности к направленной дифференцировке *in vitro* остаются открытыми. Целью настоящего исследования являлась оценка способности МСК жировой ткани (ЖТ) человека к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях в условиях подавления и стимуляции пролиферации.

В работе использовали МСК ЖТ человека 3–4 пассажей. Для ингибирования пролиферации суспензию МСК ЖТ обрабатывали митомycinом-С (МТМ-С, 10 мкг/мл). В качестве стимулятора пролиферации клеток применяли тромбоцитарный лизат (в концентрациях 5 и 10%), полученный из цельной крови взрослых доноров. В качестве контроля использовали среду культивирования, содержащую 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота. Для оценки метаболической активности МСК ЖТ использовали индикатор Alamar Blue, пролиферативную активность определяли по приросту количества клеток путем прямого подсчета ядер. Адипогенную и остеогенную дифференцировку проводили в средах, содержащих специфические индукторы, а их эффективность оценивали по экспрессии клетками щелочной фосфатазы или накоплению липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O.

Обработка клеток МТМ-С приводила к полной остановке пролиферации, при этом их метаболическая активность сохранялась. При культивировании МСК ЖТ в контрольной среде (в присутствии ЭС) количество клеток на 7-е сутки увеличивалось в 2,7–3,4 раза. В среде, содержащей ТЛ, пролиферативная активность клеток была значительно выше, а их количество в культуре увеличивалось в 8–14 раз. При индукции дифференцировки культур клеток в адипогенном и остеогенном направлениях было выявлено, что в среде, содержащей ЭС, количество дифференцированных клеток составляло около 35 и 60% соответственно. В культурах МСК ЖТ, обработанных МТМ-С, клетки сохраняли способность к адипогенной и остеогенной дифференцировке, однако ее эффективность была ниже (около 20 и 35% соответственно). Наиболее выраженной способностью к дифференцировке в указанных направлениях обладали клетки, культивированные в присутствии ТЛ. При этом дифференцировалось более 95% клеток.

Таким образом, остановка пролиферации МСК ЖТ приводит к снижению, однако не к полной потере способности клеток к направленной дифференцировке. ТЛ является перспективным природным заменителем ксеногенной ЭС при разработке технологии культивирования МСК для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Despite a large number of studies on biological properties of mesenchymal stromal cells (MSCs), the tasks regarding the correlation between cells proliferative activity and their ability to differentiate *in vitro* have remained open. The aim of this study was to evaluate the ability of human adipose tissue-derived (ATD) MSCs to differentiate in adipogenic and osteogenic directions under suppression and stimulation of cell proliferation.

Human ATD MSCs of the 3rd–4th passages were used in this study. For the inhibition of cell proliferation the cell suspensions were treated with mitomycin-C (MTM-C, 10 µg/ml). Platelet lysate (PL) (in concentrations of 5 and 10%) obtained from whole blood of adult donors was used as a stimulator of cell proliferation. Culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) was used as the control. To assess metabolic activity of ATD MSCs we used Alamar Blue; proliferation was estimated by cell number increase using direct counting of nuclei. Adipogenic and osteogenic differentiation was induced in media supplemented with specific differentiation factors, and their efficiency was assessed by expression of alkaline phosphatase and accumulation of the lipids, positively stained with Oil Red O.

MTM-C treatment led to a complete arrest of cell proliferation, while their metabolic activity was preserved. When ATD MSCs were cultured in the control medium (in the presence of FBS), the number of cells to the 7th day increased in 2.7–3.4 times. In the medium containing PL, cell proliferative activity was significantly higher, and the number of cells increased in 8–14 times. It was established that after adipogenic and osteogenic induction of cell cultures in the medium containing FBS, the number of differentiated cells was about 35% and 60%, respectively. In MTM-C-treated ATD MSC cultures, the cells preserved the ability to adipogenic and osteogenic differentiation, but the efficiency of differentiation was lower (about 20% and 35%, respectively). ATD MSCs cultured in the presence of PL had the most pronounced ability to differentiation towards the mentioned directions. In this case more than 95% of the cells were differentiated.

Thus, proliferation arrest of ATD MSCs led to a reduction but not complete loss of cell ability to an induced differentiation. PL is a promising natural substitute to xenogeneic FBS for the development of MSC culturing technology in regenerative medicine and tissue engineering.

Вплив пептидного комплексу шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів у культурі

І.Г. БОРИСЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Peptide Complex of Piglet Skin on Metabolic Activity of Fibroblasts in Culture

I.G. BORISENKO

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

Відомо, що пептидний комплекс кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ПКШП) нормалізує процес репараційної регенерації при опікових і холодових травмах. Культура фібробластів може бути зручною моделлю для вивчення тканинноспецифічної біологічної активності пептидних комплексів даного виду клітин.

Мета роботи – вивчити склад і вплив ПКШП на метаболічну активність фібробластів шкіри шурів в культурі. Одержували ПКШП шляхом інкубації нативних або кріоконсервованих фрагментів шкіри шляхом їх інкубації в фізіологічному розчині протягом 60 хв та видалення термолабільних білків. Для визначення молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах використовували вискоєфективну гельпроникаючу хроматографію. Фібробласти шкіри новонароджених шурів культивували в живильному середовищі DMEM/F12 з додаванням сироватки плодів великої рогатої худоби та антибіотиків. Дослідні зразки доповнювали ПКШП у кінцевій концентрації пептидів 0,1 або 1 мкг/мл, контрольні – еквівалентним об'ємом фізіологічного розчину. Окремі культури витримували протягом 30 хв при температурі 5°C. Метаболічну активність клітин оцінювали по відновленню редокс-індикатора Alamar Blue.

При дослідженні розподілу речовин пептидної природи в ПКШП за молекулярними масами встановлено, що у виділених з нативних фрагментів шкіри поросят реєструються 4 піки, а з кріоконсервованих – 5, і вони містять відносно більшу кількість низькомолекулярних пептидів.

При дослідженні дозозалежного впливу ПКШП, одержаного з кріоконсервованих фрагментів, на метаболічну активність фібробластів шкіри встановлено, що їх додавання в середовище культивування в концентраціях 0,1 та 1,0 мкг/мл збільшує цей показник на 23,2 та 20,5% відповідно на 3-ю добу культивування.

Через добу після витримки культури фібробластів при температурі 4°C інтенсивність флуоресценції відновленого Alamar Blue статистично достовірно ($p < 0,05$) менша, ніж в контролі. При культивуванні фібробластів з додаванням пептидів у кінцевій концентрації 0,1 мкг/мл метаболічна активність фібробластів після впливу гіпотермії статистично достовірно ($p < 0,05$) більша, ніж у культурі без додавання пептидів, і не відрізняється від значення цього показника в контролі та в культурі з додаванням пептидів без впливу гіпотермії.

На 7-у добу культивування інтенсивність флуоресценції в культурі з додаванням пептидів була більшою, ніж в контролі та після гіпотермії в присутності пептидів. Відмінностей в метаболічній активності клітин, що культивувалися в присутності пептидів, не спостерігалося.

Peptide complex of cryopreserved piglet skin fragments (PCPS) is known to normalize the regeneration of wounds and cold traumas. The culture of fibroblasts may be the useful model for studying the tissue specific biological activity of peptide complexes of this cell type.

The research aim was to investigate the composition and effect of PCPS on metabolic activity of rat skin fibroblasts in culture. The PCPS were obtained by their incubation in physiological solution during 60 min and removing of thermolabile proteins. To examine the molecular-mass distribution of the substances of peptide origin in the extracts we used high effective gel penetrating chromatography. The fibroblasts of newborn rat skin were cultured in nutritive media DMEM/F12 supplemented with fetal calf serum and antibiotics. Tested specimens were mixed with PCPS to get final peptide concentration of 0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the control ones were mixed with the equivalent volume of physiological solution. Separate cultures were maintained for 30 min at 5°C. Metabolic activity of cells was assessed on the reduction of redox indicator Alamar Blue.

Investigation of substances of peptide origin in PCPS by molecular mass distribution showed that extracts from native fragments of piglet skin had 4 peaks and the extracts of cryopreserved samples had 5 peaks and additionally they comprised higher content of low molecular peptides.

Study of the dose-dependent effect of PCPS derived from cryopreserved fragments on metabolic activity of skin fibroblasts revealed that their introduction into culture medium in the concentration of 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ increased this index by 23.2 and 20.5% to the 3rd culturing day.

In 24 hrs after keeping the culture of fibroblasts at 4°C the fluorescence intensity of the reduced Alamar Blue was statistically and significantly less if compared to the control ($p < 0.05$). After culturing the fibroblasts with introduced peptides in a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ the metabolic activity of fibroblasts after hypothermic exposure was statistically and significantly higher ($p < 0.05$) if compared with the culture without introduced peptides and did not differ from the index in the control and in culture enriched with peptides without hypothermic exposure.

To the 7th culturing day the fluorescence intensity in culture with introduced peptides was higher than in the control and after hypothermic exposure in the presence of peptides. No differences were found in metabolic activity of cells cultured in the presence of peptides.

Исследование реакции делящихся клеток на оксидативный стресс методом хемилюминесценции

И.П. ГОРЯЧАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Dividing Cells Response to Oxidative Stress by Chemiluminescence Method

I.P. GORYACHAYA

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

Данная работа представляет собой продолжение начатых исследований по использованию перекрестной адаптации живых систем к стрессу, для поиска путей использования этого свойства с целью повышения устойчивости биологических объектов к факторам криоконсервирования [Зинченко В.Д. и соавт., 2007].

Целью данной работы была разработка способа определения характера адаптивного ответа клеток на оксидативный стресс в зависимости от дозы избыточного оксиданта в системе. Известно, что при разных дозах оксиданта характер ответа живых клеток может быть следующим: стимуляция деления и роста – при низких дозах, обратимая остановка деления и роста – при средних дозах, апоптоз и некроз – при высоких дозах. Устойчивость к факторам криоконсервирования достигается только во втором из указанных диапазонов доз оксиданта [Зинченко В.Д. и соавт., 2005].

Для наблюдения адаптивного ответа клеток на стресс использовали метод хемилюминесценции. С помощью разработанного нами люминометра с фотоэлектронным множителем ФЭУ-106 хемилюминесценцию регистрировали на компьютере электронным осциллографом Hantek DSO 2150 USB. Исследование проводили на дрожжах *S. cerevisia* и *S. boulardii*, оксидативный стресс вызывали при помощи озона. В качестве усилителя люминесценции использовали люминол в концентрации 10^{-6} моль/л.

Было обнаружено, что при введении в суспензию клеток озонированной дистиллированной воды с концентрацией озона 5 мг/л наблюдаются вспышки хемилюминесценции на интактных клетках и отсутствуют после нагрева клеток до 100°C .

Интенсивность вспышек хемилюминесценции снижается при последовательном введении порций озонированной воды вплоть до полного их исчезновения. Снижение интенсивности хемилюминесценции объясняется исчерпанием внутренних ресурсов клетки в состоянии адаптивного ответа на избыток оксиданта. Люминесцентный ответ клеток на озон восстанавливается после некоторой выдержки обработанных озоном клеток.

Дозовая зависимость люминесцентного ответа клеток на оксидант, как индуктор оксидативного стресса, позволяет установить для каждого конкретного вида клеток диапазон доз оксиданта, при которых происходит временная остановка деления и роста клеток. В данном состоянии у клеток наблюдаются эффекты перекрестной адаптации, повышающие их устойчивость к последующим холодовым воздействиям.

This work represents the continued investigations on the use of cross adaptation of living systems to stress, to find the ways of using this property to rise the resistance of biological objects to cryopreservation factors [Zinchenko V.D. *et al.*, 2007].

The research aim was to develop the method for determination of the character of cell adaptive response to oxidative stress depending on the dose of excessive oxidant in the system. It is known that depending on different doses of oxidant the character of living cells' response may be as follows: stimulation of division and growth occurred at low doses, reciprocal inhibition of division and growth were at average doses, apoptosis and necrosis were observed at high doses. Resistance to the cryopreservation factors is achieved only in the second one from the noted ranges of oxidant doses [Zinchenko V.D. *et al.*, 2005].

To monitor the cell adaptive response to the stress we used chemiluminescence method. Using developed by us luminometer equipped with the photomultiplier tube FEU-106 the chemiluminescence data were recorded with Hantek DSO 2150 USB oscilloscope connected to computer. The investigation was performed in *S. cerevisia* and *S. boulardii* yeasts, oxidative stress was caused by ozone introduction. Luminol in the concentration of 10^{-6} mol/l was used as intensifier of luminescence.

We have noted that introduction of ozonated distilled water with ozone concentration of 5 mg/l into cell suspension led to the chemiluminescence flash appearance in intact cells and no flashes after heating of cells up to 100°C .

The intensity of chemiluminescence flash was reduced after step-by-step introduction of ozonated water till total disappearance. The reduction of chemiluminescence intensity could be explained by the depletion of internal cell resources in the state of adaptive response to the surplus oxidant presence. Luminescence response of cells to ozone is again recovered in ozone-treated cells after some period.

The dose dependence of cell luminescence response to an oxidant introduction, as a inducer of oxidative stress, allows to establish for each type of cells the range of oxidant doses in which temporary inhibition of cell division and growth occurs. In this state the cells are observed to have the effects of cross adaptation increasing their resistance to the following cold exposures.

Исследование реакции гепатоцитов на оксидативный стресс с помощью метода хемилюминесценции

И.В. ГОВОР

НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, г. Харьков

Study of Hepatocyte Response to Oxidative Stress by Chemiluminescence Method

I.V. GOVOR

Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В работе представлены предварительные результаты по исследованию реакции гепатоцитов на избыточное введение оксиданта.

Целью данной работы было определение характера адаптивного ответа клеток на введение озона на разных этапах гипотермического хранения с помощью метода хемилюминесценции.

Нами обнаружено, что при порционном введении озонированной дистиллированной воды в изученные биологические объекты возникают короткие вспышки люминесценции. Результатом перехода молекул из возбужденного в основное состояние является свечение. Эффекты озона связаны, прежде всего, с воздействием на мембраны. Озон может соединяться с липидами мембран, вызывая перекисное окисление, что приводит к повышению активности антиоксидантной системы. Количество пиков люминесценции в ответ на введение озона прямо пропорционально активности антиоксидантной системы биологического объекта.

Исследование проводили на изолированных гепатоцитах крыс в процессе гипотермического хранения в сахарозосодержащей среде с 1% альбумина. Озон вводили порционно в концентрации 5 мг/л. В качестве усилителя люминесценции использовали люминол в концентрации 10^{-5} моль/л.

Порционное введение озона вызывает люминесценцию суспензии изолированных гепатоцитов. С увеличением времени гипотермического хранения уменьшается количество пиков люминесценции в ответ на введение озона. Это связано с тем, что в процессе хранения снижаются активность антиоксидантных систем клеток и, как следствие, ответ клеток на избыточное введение озона.

Таким образом, с помощью данного подхода можно определять функциональную активность клеток.

The presentation covers the preliminary results on studying the response of hepatocytes to excessive introduction of an oxidant.

The research aim was to examine the character of adaptive response of cells to administration of ozone at different stages of hypothermic storage using chemiluminescence method.

We have found that during stepwise addition of ozonated distilled water to the studied biological objects the short luminescence flashes appear. Transition of molecules from the excited state to a main one results in luminescence. Ozone effects are primarily related to its influence onto membranes. Ozone can be bound with membrane lipids, causing lipid peroxidation, leading to a rise in activity of antioxidant system. The number of luminescence acts in response to ozone introduction is directly associated with the activity of antioxidant system in biological object.

The studies were performed in isolated rat hepatocytes during hypothermic storage in sucrose-containing medium with 1% albumin. Ozone was stepwise introduced in the concentration of 5 mg/l. As the luminescence enhancer there was used luminol in the concentration of 10^{-5} mol/l.

The introduction of ozone by portions caused the luminescence in suspension of isolated hepatocytes. The longer was the duration of hypothermic storage the less was the number of luminescence flashes in response to ozone addition. We associate this with the fact that during storage the activity of antioxidant systems in the cells are reduced and this results in lower cell response to excessive ozone introduction.

Thus using this method it is possible to estimate the functional activity of cells.

Технология получения криоконсервированных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах

О.М. БАБИНЕЦ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, В.Ф. МАРШЕНЮК
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Method of Obtaining Cryopreserved Preparations of Probiotics Immobilized on Enterosorbents

О.М. BABINETS, I.P. VYSEKANTSEV, V.F. MARTSENYUK
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Для восстановления микробиоты при дисбиозах различного генеза все больше внимания уделяется разработке синбиотиков – препаратов, содержащих микроорганизмы-пробиотики и пребиотики. В связи с этим приобрела актуальность проблема создания препаратов пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах, для их хранения применяют низкие температуры и лиофилизацию.

Целью исследования являлась разработка препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, и метода оценки сохранности комплексов «носитель-клетки», а также изучение их сохранности после криоконсервирования. Объектом исследования являлись дрожжи *Saccharomyces boulardii* и бактерии *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus bulgaricus*.

Была изучена активность сорбции клеток микроорганизмов на ряде энтеросорбентов с различными физико-химическими свойствами и с разной адсорбционной способностью. Наиболее высокие показатели сорбции микробных клеток были установлены для сорбентов «Сорбекс» и «СУМС-1» при температуре сорбции 0...2°C.

За основу метода оценки сохранности комплексов «носитель-клетки» был взят метод серийных разведений Коха. Препараты иммобилизованных клеток, содержащих примесь свободных клеток, переносили в центрифужные пробирки, оборудованные специальными ситами с размером ячеек меньше диаметра сорбентов. Свободные клетки осаждали центрифугированием. Комплексы «носитель-клетки» переносили из сит в 0,2%-й раствор агара. После серийных разведений в данном растворе образцы вносили в чашки Петри и заливали агаризированной средой. После культивирования подсчитывали макроколонии. Каждая макроколония была образована комплексом «носитель-клетки».

При сравнительном изучении влияния условий криоконсервирования на свободные и иммобилизованные клетки *S. boulardii* было установлено, что количество жизнеспособных свободных клеток во всех средах консервирования (физиологический раствор, пивное сусло, 5 и 10%-е растворы сахарозы, 5%-й раствор ДМСО) после охлаждения со скоростью 1 град/мин и отогрева достоверно не отличалось от исходного. С повышением скорости охлаждения сохранность клеток снижалась, достигая минимума при погружении образцов в жидкий азот. Количество КОЕ комплексов «носитель-клетки» после замораживания-отогрева было значительно ниже. Максимальные значения сохранности комплексов также наблюдали после охлаждения со скоростью 1 град/мин и отогрева.

To recover microbiota at dysbioses of different genesis the more and more attention is paid to the creation of synbiotics, the preparations containing microorganisms, probiotics and prebiotics. In this connection the task of developing the preparations of probiotics immobilized on sorbents gained an actuality, and its storage requires low temperatures or freeze-drying.

The research aim was to develop the preparations of probiotics immobilized on enterosorbents and the method for assessing the integrity of the complexes carrier-cells as well as to investigate their post-thaw survival. Research objects were *Saccharomyces boulardii* yeasts and *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus bulgaricus* bacteria.

There has been studied the activity of microorganism cells sorption on some enterosorbents with different physical and chemical properties as well as with different adsorption ability. The highest indices of sorption for microbial cells were found for the sorbents Sorbex and SUMS-1 under sorption temperature of 0...2°C.

The Koch's method of serial dilutions was assumed as the basis of assessment method. Preparations of immobilized cells containing several free cells were transferred into centrifuge tubes equipped with special sieves with the meshwork dimensions less than the diameter of sorbent particles. Free cells were sedimented by centrifugation. The carrier-cells complexes were transferred from the sieves into 0.2% agar solution. After serial dilutions in this solution the samples were introduced into Petri dishes and embedded into agarized medium. Counting of macrocolonies was performed after culturing. Each macrocolony was formed by the carrier-cells complex.

During comparative study of the effect of cryopreservation conditions on free and immobilized *S. boulardii* cells we established that the number of viable free cells in all the cryopreservation media (physiological solution, beer wort, 5 and 10% sucrose solutions, 5% DMSO solution) after cooling with the rate of 1deg/min and thawing did not statistically and significantly differ from an initial one. With an increase in cooling rate the cell survival rate reduced and reached its minimum after freezing by plunging the samples into liquid nitrogen. The number of colony forming units of the carrier-cells complexes after freeze-thawing was significantly lower. The maximum values of complexes integrity were also observed after cooling with the rate of 1 deg/min and following thawing.

Склад екстрактів кріоконсервованих фрагментів серця свиней та поросят і їх вплив на організм щурів

Л.А. РОГОЗА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Composition of Extracts of Cryopreserved Pig and Piglet Heart Fragments and Their Effect on Rats

L.A. ROGOZA

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

Відомо, що кардіоміоцити є продуцентами значної кількості біологічно активних пептидів. Високу біологічну активність також проявляють пептиди, які входять до складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят. Показано, що вони нормалізують процеси репаративної регенерації і їх вплив є тканинно-специфічним.

Мета дослідження – визначити особливості пептидного складу екстрактів серця новонароджених поросят (ЕСцП) і статевозрілих свиней (ЕСцС) та дослідити їх вплив на організм щурів різного віку.

Екстракти серця одержували з кріоконсервованих (зі швидкістю охолодження 1 град/хв в присутності 10% ПЕО-1500) фрагментів сердець новонароджених поросят і статевозрілих свиней. Молекулярну масу пептидів визначали за методом матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації за допомогою приладу «MALDI MS Autoflex II» («Bruker Daltoniks GmbH», Німеччина). Використовували матрицю на основі синапової кислоти (Sinapic Acid – SA, «Fluka», Німеччина).

Експерименти були проведені на безпородних білих щурах. Екстракти вводили в черевну порожнину 1-місячним та 4-місячним тваринам із розрахунку 50 мкг на 100 г маси протягом усього експерименту та порівнювали з контролем на 14 та 28 день. Гістологічні дослідження серцевого м'язу щурів проводили на зрізах завтовшки 6–8 мкм, забарвлених гематоксилином і еозином за стандартною методикою. Для морфологічного аналізу шлуночків серця обирали однорідні ділянки і проводили по 9 підрахунків ядер серцевого м'язу для кожного препарату. Для обробки зображень використовували програму «AxioVision Rel.4.8» («Carl Zeiss», Німеччина). Кількісні результати дослідження обробляли статистично за методом Фішера-Стьюдента.

У результаті мас-спектрометричного дослідження виявлено ряд спільних для обох екстрактів пептидів з м.м. 3218 ± 5 , 5734 ± 5 , 8454 ± 5 і 8568 ± 5 . Інші виявлені пептиди специфічні для кожного з екстрактів. Отже, пептидний склад досліджених екстрактів залежить від віку тварин і може бути пов'язаний із віковими особливостями розвитку серцевого м'язу. Введення ЕСцС або ЕСцП молодим та статевозрілим щурам протягом 28 днів не впливало на масу тварин і масу їх сердець. При підрахунку кількості ядерних структур в міокарді щурів на 1 мм² зрізу тканини серцевого м'язу статистично достовірні відмінності ($p < 0,05$) спостерігались на 28-у добу в групі молодих щурів, яким вводили ЕСцС або ЕСцП, у порівнянні з контролем.

Пептидні комплекси ЕСцС і ЕСцП специфічні для кожного з екстрактів, але при цьому містять і однакові пептиди. Введення екстрактів молодим та статевозрілим щурам протягом 28 днів не впливало на масу тварин і масу їх сердець. При введенні молодим щурам ЕСцС або ЕСцП, на відміну від статевозрілих, спостерігається збільшення щільності ядер клітин в м'язі серця.

It is known that cardiomyocytes are producers of a large number of biologically active peptides. Peptides contained in extracts of cryopreserved pig and piglet heart fragments also have a high biological activity. They normalize the processes of regeneration and their impact is tissue specific.

The research aim was to identify the features of peptide composition of newborn piglet (PIHEs) and mature pig (PHEs) heart extracts and determine their effect on the rats of different age.

Extracts were obtained from cryopreserved (with the cooling rate of 1 deg/min with 10% PEO-1500) heart fragments of newborn piglets and mature pigs. Molecular mass of peptides was determined by matrix-activated laser desorption/ionization with MALDI MS Autoflex II (Bruker Daltoniks GmbH, Germany). We used a matrix based on sinapic acid (SA, Fluka, Germany).

Experiments were performed in breedless white rats. The extracts were introduced into the peritoneal cavity of 1-month and 4-month-old animals with the concentration of 50 µg per 100 g of weight during the experiment and they were compared with the control in the 14th and 28th days. Histological analysis of rat heart muscle was performed in 6–8 µm sections stained with hematoxylin and eosin by standard methods. For morphological analysis of heart ventricles we chose homogeneous areas and did up to 9 counts of cardiac muscle nuclei for each preparation. To process the images we used software AxioVision Rel.4.8 (Carl Zeiss, Germany). Quantitative results of the study were statistically processed by Student-Fischer method.

After mass spectrometric study we have established the range of common for both extracts peptides with molecular mass of 3218 ± 5 ; 5734 ± 5 ; 8454 ± 5 and 8568 ± 5 . Other noted peptides were specific for each of the extracts. Thus, the peptide composition of the studied extracts depends on the age of animals and it may be associated with age-related peculiarities of heart muscle. Introduction of PHEs and PIHEs into young and mature rats during 28 days did not affect the weight of animals and weight of their hearts. Calculating the number of nuclear structures in myocardium of rats per 1 mm² of heart muscle tissue section the statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed to the 28th day in the group of young rats introduced with PHEs or PIHEs if compared to the control.

Peptide complexes of PHEs and PIHEs are specific for each extract, but they contain the same peptides as well. Introduction of extracts into young and mature rats during 28 days did not influence the weight of animals and weight of their hearts. After the introduction of PHEs and PIHEs into young rats, unlike mature ones, we observed an increase of cell nuclei density in the heart muscle.

Применение альгинатных гидрогелей для замедленной эжекции пептидов сердца поросят в жидкую фазу

Т.В. ШКАНД, Н.А. ЧИЖ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Alginate Hydrogels for Slow Ejection of Pig Heart Peptides into Liquid

T.V. SHKAND, N.A. CHIZH

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

В настоящее время большое внимание уделяется поиску факторов, которые активизируют процессы репаративной регенерации миокарда, уменьшают зону некроза и восстанавливают паранекротическую область, что предотвращает развитие сердечной недостаточности. В качестве основы для подведения действующего вещества в зону локального повреждения сердца используют коллаген, фибрин, а также соли альгиновой кислоты, получаемые из морских водорослей.

Цель работы заключалась в изучении динамики эжекции пептидов экстрактов сердца новорожденных поросят из гелей альгинатов в жидкую фазу. Для исследования готовили плотные и жидкие формы альгината натрия на основе экстрактов сердца новорожденных поросят (100 мкг пептидов/1 мл). Образцы стерилизовали методом автоклавирования с помощью парового стерилизатора при температуре 112°C в течение 20 мин. Скорость эжекции определяли с помощью спектрофотометрии на длинах волн 220–450 нм.

Жидкий гидрогель, который может играть роль «заплаты» при инъекционном использовании, формируется при 2%-й концентрации альгината. Плотный гидрогель для аппликации на поврежденную поверхность сердца образуется при 10%-й концентрации альгината натрия. Он может иметь также форму таблеток при помещении в блистер. На 1-е, 3-и и 7-е сутки после посева на питательные среды роста бактерий и грибов не выявлено. При сравнении оптических плотностей водных экстрактов после стерилизации в исследуемых растворах продуктов карамелизации гидрогеля не выявлено. На начальном этапе (от 3 до 6 мин) скорость выхода пептидов одинакова из плотного и жидкого гидрогеля. Это свидетельствует о равнозначной динамике процессов регистрируемой диффузии пептидов экстракта в геле. При таблетировочной форме плотного геля пептидные компоненты экстракта полностью эжектируются за 4–5 мин.

Вариация концентрации альгината натрия дает возможность получать как жидкую, так и плотную фазы гидрогеля в зависимости от поставленной задачи. Гидрогели поддаются стерилизации методом автоклавирования, при этом не разрушаются полимерные цепи альгинатов. Эжекция компонентов экстракта сердца поросят происходит одинаково эффективно как из жидкого, так и плотного геля. Наибольшую эффективность эжекции наблюдали в первые 3–6 мин контакта геля с жидкой фазой.

Nowadays much attention is devoted to find the factors that activate reparative regeneration of myocardium, reduce the area of necrosis and reactivate the paranecrotic zone, which prevents the progression of heart failure. As a basis for delivery of active substance to local zone of heart damage collagen, fibrin, and also salts of alginic acid, which were obtained from seaweeds, were used.

The aim of this work is the investigation of the dynamics of cardiac ejection of peptide extracts of newborn piglet hearts from alginate gels to liquid phase. Dense and liquid forms of sodium alginate based on the extracts of newborn piglet heart (100 µg peptides per 1 ml) were investigated. The samples were sterilized by autoclaving in the steam sterilizer at 112 °C during 20 min. The ejection rate was determined spectrophotometrically at 220–450 nm.

Liquid hydrogel which can serve as a 'patch' if injected, is formed under 2% concentration of alginate. Dense hydrogel suitable for application to the damaged area of heart is formed under 10% concentration of sodium alginate. It could have also the tablet shape if placed into blister. To the 1st, 3rd and 7th day after seeding in nutrient medium no growth of bacteria and fungi was found. When comparing the optical density of aqueous extracts after sterilization in the solutions of hydrogel no caramelization products were found. In the initial phase (from 3 to 6 min) the speed of peptides' release from dense and liquid hydrogel was equal. This testified to the similar dynamics in the processes of extract peptides' diffusion inside the gel. In the case of tableted dense gel the peptide components of the extract are completely ejected after 4–5 min.

The variation in concentration of sodium alginate allows to receive both liquid and dense phase of hydrogel depending on the task. Hydrogels could be sterilized by the autoclaving with no destruction of alginate polymer chains. Ejection of pig heart extract components occurred effectively either from liquid or from a dense gel. The most effective ejection was observed during the first 3–6 minutes of the contact of gel with liquid phase.

Механизмы влияния криоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в периоде позднего онтогенеза

В.Ю. ПРОКОПЮК, О.С. ПРОКОПЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Mechanisms of Cryopreserved Placental Preparation Effect on Reproductive Function in Late Ontogenesis

V.YU. PROKOPYUK, O.S. PROKOPYUK

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

Увеличение количества поздних браков в Украине, связанных с необходимостью самореализации в обществе, порождает проблему продления репродуктивного возраста. Поздний возраст супругов, является причиной бесплодия, генетических нарушений, патологии беременности. Эти проблемы чаще возникают у мужчин, которые вступают в брак позже, чем женщины. Актуальным остаётся поиск препаратов, которые одновременно имели бы свойства геропротекторов и восстанавливали репродуктивную функцию, что являлось бы патогенетически обоснованным для данной группы пациентов. Для препаратов плаценты описаны как геропротективные свойства (В.Н. Анисимов, 2003), так и способность влиять на репродуктивную функцию (В.И. Грищенко и соавт, 2004).

Цель работы – определение механизмов влияния криоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в позднем репродуктивном возрасте.

В работе использованы 20 самцов крыс линии Wistar в возрасте 18 месяцев, 10 из них произведена подкожная имплантация криоконсервированной ткани плаценты. Контролем были 5-месячные самцы (10). Животные спаривались с самками в возрасте 5 месяцев в соотношении 1:2. Проводили гистологическое исследование миокарда, печени, семенников с иммуногистохимическим окрашиванием на CD95, эндотелин 1, коллаген IV типа, ДНП, РНП. Исследовали репродуктивные показатели, уровень тестостерона в динамике, показатели перекисного окисления в сыворотке крови, тканях печени, сердца и семенников.

Показано, что использование препаратов плаценты у самца повышает вероятность беременности самки на 40%, при этом количество плодов несколько больше, однако резорбции плодов изредка сохраняются. При морфологическом исследовании семенников отмечались гиперплазия семенных канальцев с восстановлением полноценного клона различных стадий развития сперматогенного эпителия, сперматогенез, наличие большого количества сперматозоидов. Гистохимические реакции на ДНП, РНП и ШИК приближались к показателям молодых животных. Иммуногистохимически определяли снижение экспрессии CD 95, коллагена IV в семенниках, повышение экспрессии к эндотелину-1. Уровень тестостерона после имплантации плаценты возрастал более чем в 2 раза на срок более 2 месяцев, однако не достигал уровня молодых самцов. В семенниках наблюдались снижение содержания шиффовых оснований, повышение глутатион-S-трансферазы, подобные изменения отмечены в печени и сыворотке крови.

Восстановление репродуктивной функции в геронтологии при использовании препаратов плаценты объясняется ингибированием апоптоза, активацией белоксинтезирующей функции, антиоксидантных систем.

Increased number of late marriages in Ukraine, due to necessity for personal fulfillment in society, creates a problem of reproductive age extension. Late age of spouses is the cause of infertility, genetic disorders, pregnancy pathologies. These problems are more common in men who marry later than women. Search for preparations that would simultaneously had geroprotective properties and recover reproductive function, which was pathogenetically proved for this group of patients has remained actual. For placental preparations there were described as geroprotective properties (V.N. Anisimov, 2003), and the ability to affect the reproductive function (V.I. Grischenko *et al.*, 2004).

The research aim was to establish the mechanisms of cryopreserved placental preparation effect on reproductive function in late reproductive age.

In the research there were used 20 Wistar male rats of 18 months, 10 of them were subcutaneously implanted with cryopreserved placental tissue. Male 5-month-old rats served as the control (10). The animals paired with females of 5 months in the 1:2 ratio. There were histologically examined myocardium, liver, testes using immunohistochemical staining for CD95, endothelin 1, collagen of type IV, DNP, RNP. Reproductive indices, testosterone level in dynamics, peroxidation indices in blood serum, tissues of liver, heart and testes were investigated.

It was shown that the application of placental preparations in male increases the chance of female pregnancy by 40%, herewith the number of fetuses was insignificantly higher, but resorption of fetuses was observed in some cases. Morphological analysis of testes revealed hyperplasia of seminiferous tubules with restoration of a full value clone of spermatogenic epithelium at various stages of development, spermatogenesis, a large number of spermatozoa. Histochemical DNP, RNP and PAS reactions approximated to the indices of young animals. Immunohistochemical analysis found the reduced expression of CD95, collagen IV in testes, increased endothelin-1 expression. Testosterone level after implantation of placenta increased more than twice during a period of two months and more, but did not reach the level of young males. There were observed in testes the reduced content of Schiff bases, increase of glutathione-S-transferase activity, similar changes were observed in liver and blood serum.

Recovery of reproductive function in gerontology using placental preparations could be explained by apoptosis inhibition, activation of protein-synthesizing function and antioxidant systems.

Влияние экстрактов селезенки и сердца на миокард

А.Г. БАБАЕВА, Н.А. ЧИЖ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Spleen and Heart Extracts on Myocardium

A.G. BABAYEVA, N.A. CHIZH

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

Исследование биологического действия препаратов пептидной природы является одним из перспективных направлений в биологии и регенеративной медицине.

Цель работы – изучить влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов селезенки свиней и сердца новорожденных поросят (ЭСцП) на течение некроза миокарда (НМ) после локальной криодеструкции сердца.

Крионекроз миокарда моделировали воздействием на стенку левого желудочка крыс инструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности -196°C в течение 15 с. Электрокардиограммы (ЭКГ) регистрировали и анализировали на аппаратно-программном комплексе «Полиспектр-8/В». Для оценки выраженности воспалительного и резорбционно-некротического синдрома при НМ использовали данные клинических и биохимических анализов.

Животных I группы (контроль) подвергали только криовоздействию. Во II группе на фоне экспериментального НМ крысам вводили кардиопротекторный препарат сравнения «Неотон» в дозе 20 мг/100 г животного. В III и IV группы вошли животные после крионекроза миокарда с введением в брюшную полость экстракта селезенки свиней или ЭСцП. Доза пептидов составляла 50 мкг/100 г массы животного.

По данным ЭКГ выявлено развитие у всех животных субэпикардального НМ. Электрокардиографические изменения в контрольной группе, отмеченные через сутки после операций, сохранялись во все сроки наблюдения. На 14-е сутки на ЭКГ в экспериментальных группах снижалась амплитуда зубца *q*. У животных I и II групп наблюдался глубокий отрицательный зубец *T*.

Увеличение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови было незначительным. Повышенная активность аспаратаминотрансферазы у животных экспериментальных групп к 7-м суткам эксперимента возвращалась к уровню нормы в отличие от контрольных крыс. После формирования крионекроза миокарда у животных всех групп отмечали увеличение индекса де Ритиса до 3 (норма 1,8). К 7-м суткам он наиболее снижался во II и IV группах.

В контрольной группе на протяжении всего эксперимента наблюдался сдвиг лейкоцитарной формулы влево. К 30-м суткам в группе с введением экстракта селезенки свиней индекс сдвига лейкоцитов возвращался к уровню нормы. Аналогичная динамика отмечалась и при исследовании индекса интоксикации: к 30-м суткам этот показатель в контрольной группе и у животных, которым вводили «Неотон», оставался на высоком уровне.

Study of biological effect of peptide preparations is one of the promising fields in biology and regenerative medicine.

The research aim was to study the effect of extracts of cryopreserved fragments of porcine spleen and heart of newborn piglets (EPH) on course of myocardial necrosis (NM) after local cryodestruction of heart.

Myocardium cryonecrosis was simulated by treatment of left ventricle myocardial wall of rats with 3 mm applicator cooled down to -196°C during 15 s. Electrocardiograms (ECG) were recorded and analyzed with hardware-software complex Polispektr-8/B. Data of clinical and biochemical analyses were used to estimate inflammatory and resorption-necrotic syndrome intensity under NM.

The animals of group I (control) were only cryotreated. Group II rats with experimental NM were treated with reference drug with cardioprotective action Neoton in a dose of 20 mg per 100g of animal. Group III and IV were the animals with myocardium cryonecrosis and treated by injection of porcine spleen extract or EPH into abdominal cavity. Peptide dose was 50 μg per 100 g of animal weight.

According to ECG values we revealed the development of subepicardial NM in all the animals. Electrocardiographic changes in the control group, revealed in a day after the cryotreatment, were observed through all the periods of observation. To the 14th day amplitude of *q* wave in ECG in the experimental groups decreased. In the animals of groups I and II the deep negative *T* wave was observed.

The increase in alanine aminotransferase activity in blood serum was insignificant. Increased activity of aspartate aminotransferase in animals of experimental groups to the 7th day of the experiment turned to the norm if compared with the control rats. After formation of myocardium cryonecrosis in animals of all groups we revealed an increase of de Ritis index up to 3 (1.8 is a norm). By the 7th day it was decreased maximally in the groups II and IV.

In the control group during the whole observation period we observed a shift of leukogram leftward. By the 30th day in the group with injection of pig spleen extract the leukogram turned to the norm. Similar dynamics was observed in the study of intoxication index: to the 30th day this index in the control group and the animals treated with Neoton remained high.

Иммуноткорригирующая активность криоэкстракта липидов плаценты в отношении пула CD4⁺CD25⁺ Т-клеток крыс при адьювантном артрите

М.А. КРАВЧЕНКО, О.В. САФРАНЧУК, О.В. ЧЕЛОМБИТКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Immunocorrecting Activity of Placental Lipids Cryoextract in Relation to Pool of CD4⁺CD25⁺ T-Cells in Rats with Adjuvant Arthritis

M.A. KRAVCHENKO, O.V. SAFRANCHUK, O.V. CHELOMBITKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Известный факт иммуномодулирующей активности субстанций липидной природы делает актуальным разработку технологий их получения и применения как лечебных препаратов. В последнее время обращается внимание на возможность их получения из биологически активного тканевого сырья, в частности тканей плаценты, чей липидный состав обуславливает один из механизмов ее иммуносупрессивной активности [Yaqoob, 2004]. Использование для этих целей метода криоэкстракции позволяет минимизировать влияние ряда повреждающих факторов на биологический материал, а также позволяет дифференцированно выделять липидную фракцию плаценты (ЛФП) [Осецкий, 2009]. Известно, что липидные биомолекулы являются эндогенными лигандами ядерных рецепторов Т-клеток и, таким образом, могут влиять на процессы их периферической дифференцировки с образованием индуцированных регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺ [Wohlfert, 2007]. Целью данной работы было изучить пул CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в региональных лимфоузлах (л/у) крыс с адьювантным артритом (АА) до и после введения ЛФП.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Wistar. АА индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда по методу Pearson (1963). ЛФП получали методом криоэкстракции [Осецкий, 2009] из тканей плаценты свиный, вводили ее с 14-х по 28-е сутки развития АА через день в/м в дозе 100 мг/кг. Содержание в л/у CD4⁺CD25⁺-клеток определяли методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре FACSCalibur[®] с использованием моноклональных антител к мембранным структурам CD4 (PE) и CD25 (FITC). Регистрировали процент CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high}-клеток, а также среднюю интенсивность их флуоресценции.

Показано волнообразное изменение изученных показателей в динамике развития АА, при этом введение ЛФП животным с патологией максимально приближало значения данных показателей к показателям интактных животных, что клинически сопровождалось снижением выраженности отека лап.

Липидная фракция плаценты, полученная методом криоэкстракции, обладает иммуноткорригирующей активностью в отношении как содержания, так и функциональной активности регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺, что приводит к снижению выраженности клинических признаков заболевания. Полученные результаты указывают на перспективности дальнейшего изучения иммуномодулирующих свойств ЛФП, получаемой методом криоэкстракции, с целью оценки возможности ее клинического применения для лечения заболеваний аутоиммунного генеза.

The known fact of immunomodulating activity of lipid substances makes it topical to develop the technologies for their obtaining and using as medicines. Recently a great attention has been paid to the possibility of their obtaining from biologically active tissue raw materials, particularly from placental tissues, which lipid composition determines one of the mechanisms of its immunosuppressive activity [Yaqoob, 2004]. Cryoextraction method allows to minimize the influence of some damaging factors on biological material during processing as well as to specifically extract the placental lipid fraction (PLF) [Osetsky, 2009]. It is known that lipid biomolecules are endogenous ligands of T-cell nuclear receptors and thereby they can affect the processes of their peripheral differentiation with formation of induced regulatory T-cells with CD4⁺CD25⁺ phenotype [Wohlfert, 2007]. The research aim was to study the pool of CD4⁺CD25⁺ T-cells in regional lymph nodes (LN) of the rats with adjuvant arthritis (AA) prior to and after injection of PLF.

The experiments were performed in male Wistar rats. Adjuvant arthritis was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant according to the method by Pearson, (1963). PLF was obtained by cryoextraction method [Osetsky, 2009] from pig placental tissues. PLF was injected from 14th till 28th days of AA development, every day intramuscularly in the dose of 100 mg/kg. Content of CD4⁺CD25⁺ cells in LN was determined by direct immunofluorescence with flow cytometer FACSCalibur[®] using monoclonal antibodies to CD4 (PE) and CD25 (FITC) membrane structures. Percentages of CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high} cells as well as mean intensity of their fluorescence were recorded.

A wave like change of the studied parameters during AA development was demonstrated, and the injection of PLF into the animals with the pathology maximally approximated the values of these parameters to those of intact animals. This was clinically accompanied by a decrease in paw edema intensity.

Placental lipid fraction obtained by cryoextraction method possessed an immunocorrecting activity as to both the content and functional activity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cells that led to a decrease in intensity of clinical signs of the disease. The results indicated the prospects of further studies of immunomodulating properties of PLF obtained by cryoextraction to estimate the possibility for its clinical application in treating the autoimmune diseases.

Роль моноцитарно-фагоцитарной системы в формировании противовирусной резистентности после введения компонентов криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови

О.Ю. КОЖИНА, Е.А. ПОРОЖАН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Role of Monocyte-Phagocytic System in Formation of Antiviral Resistance after Introduction of Cryopreserved Cord Blood Leukoconcentrate Components

O.YU. KOZHINA, E.A. POROZHAN

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

В первой фазе иммунного ответа на внедрение вирусного агента происходит активация клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС). В эксперименте на мышках было отмечено формирование резистентности к вирусу гриппа после предварительного введения криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (кЛККЧ), что явилось основанием для дальнейшего изучения механизмов формирования подобного рода невосприимчивости. Цель данной работы: изучение функциональной активности клеток МФС на экспериментальной модели вирусной (гриппозной) инфекции у мышей после превентивного введения цельного кЛККЧ и его компонентов (ядросодержащие клетки (ЯСК), плазма).

В эксперименте были использованы мыши линии Balb/C массой 18–20 г. Животным (20 в каждой группе) за 6 месяцев до заражения вирусом гриппа вводили: группам 1, 2 и 3 – кЛККЧ, плазму и ЯСК соответственно; 4 – физиологический раствор; 5 – вирус гриппа интраназально (иммунизированные мыши). Контролем служили интактные мыши и незаражённые животные опытных групп. Штамм вируса гриппа А/Виктория имел гемагглютинирующий титр 1:256. Интраназально по 0,05 мл/мышь вводили кЛККЧ и его компоненты. У мышей всех групп оценивали состояние клеток МФС перитонеальной полости (ПП) на 7 и 14-е сутки. Уровень экспрессии молекулы адгезии CD11b (Mac-1) на клетках ПП определяли с помощью моноклональных антител (FITC) anti-mouse CD11b с изотипом Rat IgG2b (BD, США) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, США).

Все показатели активности МФС достоверно уменьшались при развитии вирусной инфекции в организме мышей после предварительного введения физиологического раствора. К 10-м суткам была установлена 100%-я гибель животных. Превентивное введение кЛККЧ и его компонентов оказывало стимулирующее действие на клетки МФС. Однако наиболее сбалансированный эффект вызывало введение цельного кЛККЧ, в большей степени за счёт регуляции функциональной активности макрофагов и повышения экспрессии CD11b на клетках ПП. Таким образом, стимуляция неспецифического звена иммунного ответа, возможно, и приводила к 85%-й выживаемости мышей после заражения летальной дозой вируса гриппа через 6 месяцев от введения кЛККЧ.

The cells of monocyte phagocytic system (MPS) are activated in the first phase of immune response to the penetration of viral agent. The experiment in mice allowed observing the formation of resistance to influenza virus after preliminary introduction of cryopreserved human cord blood leukoconcentrate (cHCBL), that served as the basis for further investigating the mechanisms of formation of such a kind of immunity. The research aim was to study the functional activity of MPS cells in experimental model of viral (influenza) infection in mice after preventive introduction of the whole cHCBL and its components (nucleated cells (NCs), plasma).

In the experiment we used Balb/C mice of 18–20 g weight. The animals (20 in each group) 6 months prior to infection with influenza virus were introduced with cHCBL, plasma and NCs (groups 1, 2 and 3, respectively), physiological solution (group 4), influenza virus intranasally into immunized mice (group 5). Intact mice and non-infected animals of the experimental groups served as the control. Strain of A/Victoria influenza virus had hemagglutinating titer 1:256. Cells of cHCBL were introduced intranasally by 0.05 ml per mouse. To the 7th and 14th day we assessed the state of peritoneal cavity (PC) MPS cells in mice of all the groups. The expression level of adhesion molecule CD11b (Mac-1) in the PC cells was determined with monoclonal antibodies (FITC) anti-mouse CD11b with isotype Rat IgG2b (BD, USA) using flow cytometer FACS Calibur (BD, USA).

All the indices of MPS activity were significantly reduced during viral infection development in mice after preliminary introduction of physiological solution. To the 10th day we have observed 100% death of animals. Preventive introduction of cHCBL and its components had a stimulating effect on MPS cells. However the most balanced effect was caused by the introduction of the whole cHCBL, mainly due to the regulation of macrophages functional activity and increased expression of CD11b in PC cells. It could be concluded that probably the stimulation of non-specific link of immune response resulted in 85% survival of mice after infection with a lethal dose of influenza virus after 6 months post introduction of cHCBL.

Исследование молекулярных механизмов апоптотических процессов в клетках моноцитарно-фагоцитарной системы при развитии адьювантного артрита до и после после применения криоконсервированных клеток фетальной печени

Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, О.М. ШАТНЕВА, Н.А. БОНДАРОВИЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Molecular Mechanisms of Apoptotic Processes in Cells of Monocyte-Phagocyte System during Development of Adjuvant Arthritis before and after Application of Cryopreserved Fetal Liver Cells

E.YE. YAMPOLSKAYA, O.M. SHATNEVA, N.A. BONDAROVICH

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

Сегодня окончательно сформировалось представление о том, что неспособность иммунокомпетентных клеток к апоптозу может приводить к развитию аутоиммунных процессов, в том числе и ревматоидному артриту (РА). В патогенезе РА значительная роль отводится клеткам моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС), которые проявляют резистентность к различным триггерным стимулам апоптоза. Поскольку индукцию апоптоза в иммунокомпетентных клетках рассматривают как один из механизмов, успешно применяемых для купирования нарушений в иммунной системе, одной из новых стратегий при лечении РА может быть коррекция апоптотических процессов в клетках МФС с помощью клеток фетальной печени (КФП).

Целью работы было проведение сравнительного анализа влияния криоконсервированных КФП (кКФП) и нативных (нКФП) на клетки МФС, в частности возможность потенциальной регуляции в этих клетках апоптотических процессов. Исследования проводили на экспериментальной модели ревматоидного артрита (РА) человека – адьювантном артрите (АА). На 7-е или 14-е сутки развития АА внутривенно вводили КФП в дозе 5×10^6 клеток на мышь. В качестве позитивного контроля использовали лечение дексаметазоном, который является основным препаратом базисной терапии РА. Криоконсервирование КФП осуществляли под защитой 5% ДМСО по следующей программе: охлаждение со скоростью 1 град/мин до -40°C , 10-минутная остановка, охлаждение со скоростью 10 град/мин до -80°C и затем погружение в жидкий азот. Анализ экспрессии белков каскада CD95 в лизатах клеток МФС проводили с помощью Вестерн-блоттинга. Каталитическую активность каспаз 3 и 8 в клетках МФС определяли по результатам измерения протеолитического расщепления флуорогенных субстратов ZIETD-AFC или AC-DEVD-AMC.

Полученные результаты свидетельствуют о способности как нКФП, так и кКФП проявлять апоптоз-индукционную активность в отношении клеток МФС. Более выраженный проапоптотический эффект зафиксирован после воздействия кКФП на клетки МФС, что может быть объяснено влиянием факторов криоконсервирования на активацию экспрессии различных лигандов для рецепторов смерти. Установлено, что положительный эффект вводимых кКФП на 7-е сутки АА сохранялся на протяжении двух недель после лечения. Различная степень модификации исследуемых показателей ориентирует на необходимость применения КФП в определенные сроки развития патологии.

Presently there is an idea about the incapability of immune competent cells to undergo apoptosis could lead to the development of autoimmune processes, including rheumatoid arthritis (RA). In pathogenesis of RA a significant role is played by the cells of monocyte-phagocyte system (MPS) manifesting the resistance to different trigger stimuli of apoptosis. Since the induction of apoptosis in immune competent cells is considered as one of the mechanisms successfully applied for arresting the disorders in immune system, one of novel strategies in treating RA could be the correction of apoptotic processes in the cells of MPS using the introduction of fetal liver cells (FLCs).

The research aim was to comparatively analyze the effect of cryopreserved FLCs (cFLCs) and native FLC (nFLCs) on cells of MPS and in particular the possibility of potential regulation of apoptotic processes in these cells. The studies have been carried-out in experimental model of human rheumatoid arthritis, adjuvant arthritis (AA). To the 7th or 14th days of AA development the FLCs were intravenously injected in the dose of 5×10^6 cells/mouse. As positive control we used the treatment with dexamethasone, the main drug in basic therapy of RA. FLCs were cryopreserved under 5% DMSO protection according to the following program: cooling with the rate of 1 deg/min down to -40°C , 10 min stop, cooling with the rate of 10 deg/min down to -80°C and then plunging into liquid nitrogen. The expression of CD95 cascade proteins in lysates of MPS cells was analyzed by means of Western blotting. Catalytic activity of caspases 3 and 8 in MPS cells was examined by the results of measuring the proteolytic cleavage of fluorogenic substrates ZIETD-AFC or AC-DEVD-AMC.

The findings testify to the ability of both nFLC and cFLCs to manifest apoptosis induction activity in respect of MPS cells. More manifested pro-apoptotic effect was found after the effect of cFLCs on MPS cells that may be explained by the effect of cryopreservation factors on activation of the expression of different ligands for death receptors. It has been established that positive effect of the introduced cFLCs to the 7th day of AA was kept during 2 weeks after treatment. Different extent of modification of the studied indices orientates to the need of applying FLCs in the certain terms of pathology development.