



ХОЛОД в биологии и медицине

Актуальные проблемы криобиологии,
трансплантологии и биотехнологии

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

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

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



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

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

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

Функциональная полноценность криоконсервированных тромбоцитов в зависимости от режимов замораживания

О.А. БОГДАНЧИКОВА, С.Е. ОВСЯННИКОВ, А.М. КОМПАНИЕЦ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Functional Value of Cryopreserved Platelets Depending on Freezing Regimens

O.A. BOGDANCHIKOVA, S.YE. OVSYANNIKOV, A.M. KOMPANIETS
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В исследованиях по разработке новых криоконсервантов для низкотемпературного консервирования тромбоцитов установлен высокий уровень криозащитного действия среды, содержащей комбинацию двух криопротекторов – диметилацетамида (ДМАц) и оксизтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}).

Цель работы – изучить функциональную полноценность тромбоцитов человека после криоконсервирования с разработанным криоконсервантом в зависимости от режимов замораживания.

Тромбоциты получали дифференцированным центрифугированием дозы донорской крови человека из лейкоцитомоноцитарного слоя. Замораживание образцов осуществляли после 30-минутной экспозиции тромбоцитов с криозащитной средой, содержащей 10%-ю суммарную концентрацию ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} в плазме. Охлаждение контейнеров с суспензией тромбоцитов проводили с регулируемой скоростью в парах жидкого азота при температуре $-40...-45^{\circ}\text{C}$ (режим 1) и $-188...-193^{\circ}\text{C}$ (режим 2), а также с регулируемой скоростью в камере программного замораживателя (режим 3). ДМСО в наших исследованиях является веществом сравнения. Функциональную полноценность криоконсервированных тромбоцитов оценивали после удаления криопротекторов по следующим показателям: агрегация, индуцированная АДФ ($200 \times 10^{-6}\text{M}$) и коллагеном ($6,7 \times 10^{-3}\text{M}$), реакция на гипотонический шок; ретракция тромбоцитарного сгустка, содержание продуктов перекисного окисления липидов мембран тромбоцитов (основания Шиффа и гидроперекиси липидов), содержание антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза).

Установлено, что для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} наиболее высокий уровень функциональной полноценности тромбоцитов получен при охлаждении по режиму 2, что, по-видимому, связано с отсутствием переохлаждения (не регистрировалось) и быстрым прохождением плато кристаллизации (≈ 2 мин). Для ДМСО более приемлемы режимы 1 и 3 с медленными скоростями охлаждения.

Использование нового криоконсерванта, содержащего комбинацию двух криопротекторов, и режима замораживания с быстрыми скоростями охлаждения позволило получить высокие и стабильные показатели функциональной полноценности криоконсервированных тромбоцитов. Следует подчеркнуть важное значение для результатов криоконсервирования таких факторов, как отсутствие переохлаждения внеклеточной среды и непродолжительное (до 2 мин) плато кристаллизации.

The investigations on development of novel cryoprotectant for low temperature preservation of platelets showed a high level of cryoprotective effect for medium, containing combination of two cryoprotectants: dimethyl acetamide (DMAc) and oxyethylated glycerol with polymerization degree of $n = 5$ (OEG _{$n=5$}).

The research aim was to study the functional value of human platelets after cryopreservation with developed cryopreservative depending on freezing regimens.

The platelets were obtained by differentiated centrifugation of the sample of human donor blood by leukocyte-platelet layer method. The samples were frozen after 30 minutes of platelets exposure with cryoprotective medium containing 10% total concentration of DMAc/OEG _{$n=5$} in plasma. The containers with suspension of platelets were cooled without rate control in liquid nitrogen vapors under $-40...-45^{\circ}\text{C}$ (regimen 1) and under $-188...-193^{\circ}\text{C}$ (regimen 2), as well as with controlled rate in programmable freezer (regimen 3). In our study DMSO was the reference substance. After removing the cryoprotectants the frozen-thawed platelets were evaluated for functional value by the following parameters: ADP ($200 \times 10^{-6}\text{M}$) and collagen ($6,7 \times 10^{-3}\text{M}$) induced aggregation; hypotonic shock reaction; platelet clot retraction, content of lipid peroxidation products in platelet membranes (Schiff's bases and lipid hydroperoxides); content of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase and glutathione reductase).

It was established that when using cryopreservative DMAc/OEG _{$n=5$} the highest level of platelet functional value was obtained under cooling regimen 2, and this was obviously due to the absence of supercooling (it was not recorded) and rapid passing through the crystallization plateau (≈ 2 min). The regimens 1 and 3 were more admissible for DMSO under slow cooling rate.

The application of novel cryopreservative, containing combination of two cryoprotectants, and the freezing regimen with high cooling rates allowed to obtain a high and stable parameters of functional value of cryopreserved platelets. Major contribution in cryopreservation results of such factors as absence of extracellular medium supercooling and short (up to 2 min) crystallization plateau should be emphasized.

Фетальные биорегуляторы снижают повреждения печени при гипотермическом хранении

И.А. СОСИМЧИК, Д.В. ЧЕРКАШИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Fetal Bioregulators Attenuate Liver Damage During Hypothermic Storage

I.A. SOSIMCHYK, D.V. CHERKASHINA

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

Существующие сегодня консервирующие среды не обеспечивают полной сохранности изолированной печени после долгосрочного гипотермического хранения (ГХ), что может быть связано с отсутствием в них биологически активных соединений, способных регулировать клеточные процессы. Ранее в нашей лаборатории была показана эффективность предварительного введения животным *in vivo* белковых и пептидных биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток в составе цитозоля фетальных тканей (ЦФТ) на модели ГХ и нормотермической реперфузии (НР).

Цель работы – оценить влияние ЦФТ в составе раствора хранения на прооксидантно-антиоксидантное, энергетическое и функциональное состояние печени после ГХ и последующей НР.

Цитозоль мягких тканей мезенхимально-мезодермального происхождения плодов крыс 15–16 дней гестации получали путём высокоскоростного ультрацентрифугирования. Печень крыс хранили в течение 24 ч при 4°C в сахарозо-солевом растворе (ССР) с добавлением ЦФТ (100 мкл/100 мл) или без данной добавки, затем реперфузировали 60 мин при 37°C. В качестве контроля использовали свежеизолированную печень. В гомогенатах печени исследовали: дыхательную активность, содержание АТФ, базальный уровень и скорость накопления малонового диальдегида (МДА), активность антиоксидантных ферментов. Спонтанную продукцию активных форм кислорода (АФК) оценивали по интенсивности флуоресценции дигидрорадамина 123. Функцию печени определяли по скорости потока желчи в процессе НР.

Хранение и последующая НР печени приводили к разобщению окислительного фосфорилирования, увеличению спонтанной продукции АФК, базального уровня и скорости накопления МДА, снижению активности антиоксидантных ферментов, уровня АТФ и скорости продукции желчи. Присутствие в среде хранения ЦФТ препятствовало нарушению энергетического сопряжения, что способствовало практически полному восстановлению уровня АТФ. При этом после ГХ снижалась продукция АФК, после НР – базального уровня МДА, а скорость его накопления была ниже контроля и значений ССР-группы на всех этапах эксперимента. В присутствии ЦФТ также наблюдалось частичное восстановление активности всех антиоксидантных ферментов, кроме Г6ПДГ. Внесение ЦФТ в ССР сохраняло скорость продукции желчи на уровне свежеизолированного органа.

Выраженный защитный эффект фетальных биорегуляторов в отношении печени в условиях околонулевых температур определяет перспективность их использования в качестве компонентов растворов для холодового хранения изолированных органов.

Up-to-date preservation media do not ensure sufficient integrity of isolated liver after long-term hypothermic storage (HS). It can be due to the solution deprivation of biologically active substances, which are able to regulate cell processes. It was shown in our laboratory that animal pretreatment *in vivo* with protein and peptide bioregulators of stem and progenitor cells contained in fetal tissue cytosol (FTC) was effective in the model of liver HS and normothermic reperfusion (NR).

The research aim was to investigate the influence of FTC added to storage solution on prooxidant-antioxidant, energetic and functional liver state after HS and following NR.

The cytosol was obtained from mesenchymal-mesodermal tissues of rat fetuses of 15–16 gestation days by high-speed centrifugation. Rat livers were stored during 24 h at 4°C in sucrose-saline solution (SSS) with or without adding of FTC (100 µl/100 ml), then were reperfed for 60 min at 37°C. Freshly isolated livers were used as the control. Respiratory activity, ATP level, malone dialdehyde (MDA) basal level and accumulation rate, antioxidant enzyme activities were investigated in liver homogenates. Spontaneous production of reactive oxygen species (ROS) was determined by fluorescence intensity of dihydrorhodamine 123. Liver function was determined by bile flow rate during NR.

Liver storage and following NR led to the uncoupling of oxidative phosphorylation, to the enhancement of ROS spontaneous production, basal level and accumulation rate of MDA and to the decrease of antioxidant enzyme activity, ATP level and bile production rate. The FTC presence in storage solution prevented the impairment of oxidative phosphorylation coupling degree that promoted almost full recovery of ATP level. At this time ROS production decreased after HS and MDA basal level – after NR, but accumulation rate was lower than in the control and in SSS-group at all steps of the experiment. The partial recovery of all antioxidant enzyme activity, excepting G6PDG, was also observed in the presence of FTC. Supplementation of SSS with FTC maintained bile production rate similar to freshly isolated organ values.

Pronounced protective effect of fetal bioregulators on the liver under conditions of near-zero temperatures indicates the prospects of their application as components of solution for isolated organ cold storage.

Влияние режимов охлаждения и консервирующих сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В.Л. ПОНОМАРЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Freezing Regimens and Preserving Media Containing Sodium Alginate on *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cell Viability

V.L. PONOMAREVA

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

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является использование в производственном процессе иммобилизованных клеток микроорганизмов, являющихся продуцентами ферментов, гормонов, витаминов и других активных соединений.

Иммобилизация микроорганизмов путем их включения в структуру гелей позволяет достичь высокой плотности клеток в биореакторе, что увеличивает продуктивность биотехнологических процессов. Кроме того, микробные клетки, иммобилизованные в матриксе гидрогеля, в определенной степени защищены от таких неблагоприятных воздействий окружающей среды, как изменение pH и температуры, воздействие органических растворителей и токсических соединений в высокой концентрации, а также от влияния чужеродной микрофлоры. Это обеспечивает рентабельность любого производственного процесса.

Поэтому среди актуальных научных и практических задач большое значение на современном этапе имеет криоконсервирование культур микроорганизмов в иммобилизованном состоянии, обеспечивающее сохранение максимального количества жизнеспособных клеток с исходными гено- и фенотипическими свойствами.

Целью исследования было изучение влияния защитных сред на жизнеспособность клеток дрожжей при охлаждении с разными скоростями.

Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* (раса получена из РНИИ хлебопекарной промышленности, Санкт-Петербург). Дрожжи культивировали в неохмеленном пивном сусле при 30°C с аэрацией до стационарной фазы роста. В качестве защитных сред использовали: дистиллированную воду; 1% раствор альгината натрия; 5% ДМСО; 1% раствор альгината натрия с добавлением 5% ДМСО. Исследуемые образцы охлаждали со скоростями 1; 5; 10; 15°C/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали образцы на водяной бане при температуре 37°C. Жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* оценивали чашечным методом Коха.

Было установлено, что на сохранность клеток *Saccharomyces cerevisiae* в процессе криоконсервирования влияют режимы охлаждения и состав среды криоконсервирования. Во всех средах консервирования как без защитных компонентов, так и с добавлением криопротектора наиболее высокие результаты получены при охлаждении со скоростью 1°C/мин. При повышении скорости охлаждения количество жизнеспособных клеток достоверно уменьшалось. Впервые показан выраженный криозащитный эффект при замораживании дрожжей в альгинатном геле. При замораживании со скоростью 1°C/мин в 1% геле альгината натрия сохранялись жизнеспособными 90,8% клеток; в ДМСО – 87,1%; в 1% альгинате натрия с добавлением 5% ДМСО – 86,1%.

One of the actual tasks of current biotechnology is application of immobilized cells of microorganisms, being producers of enzymes, hormones, vitamins and other active compounds in the production process.

Immobilization of microorganisms by means of their introduction into gel structure enables to achieve a high cell density in bioreactor, increasing productivity of biotechnological processes. Moreover, microbial cells, immobilized in hydrogel matrix are to some extent protected against adverse environmental effects such as pH and temperature changes, the action of highly concentrated organic solvents and toxic substances as well of xenogenic microflora. This provides efficiency of any production stage.

Therefore among actual scientific and practical tasks the cryopreservation of microorganism cultures in immobilized state, providing preservation of maximum number of viable cells with initial gene- and phenotype properties is nowadays of a great value.

The research aim was to study the effect of protective media on yeast cell viability when cooling under different rates.

The research objects were yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* (strain was obtained from Russian Institute for Scientific Research of Baking Industry, Saint Petersburg). The yeast were cultured in unhopped wort syrup at 30°C with aeration to stationary growth phase. Distilled water, 1% sodium alginate solution, 5% DMSO solution, 1% sodium alginate solution supplemented with 5% DMSO were used as protective media. The studied samples were cooled with the rates of 1; 5; 10; 15°C/min down to -40°C with further plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C. Viability of yeast *S. cerevisiae* was evaluated by Koch's plate method.

It was established that cooling regimens and cryopreservation medium composition affected the integrity of *S. cerevisiae* cells during cryopreservation. In all the cryopreservation media both without protective components and supplemented with cryoprotectant the highest results were obtained when cooling with the rate of 1°C/min. A number of viable cells significantly decreased when increasing the cooling rate. For the first time an expressed cryoprotective effect was shown when yeast were frozen in alginate gel. After freezing with the rate of 1°C/min in 1% sodium alginate gel 90.8% of cells were viable; when using DMSO we observed 87.1% viability; and application of 1% sodium alginate supplemented with 5% DMSO resulted in 86.1% viability.

Особенности распределения криопротекторов между вне- и внутриклеточной средой эритроцитов млекопитающих

В.Н. КУЧКОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Cryoprotectant Distribution between Extra- and Intracellular Medium of Mammalian Erythrocytes

V.N. KUCHKOV

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

Распределение криозащитных веществ между эритроцитом и средой представляет собой один из показателей взаимодействия этих веществ с клеткой. В криобиологии исследование распределения криопротекторов между клеткой и средой является важным звеном при создании криозащитных сред и методов удаления криопротектора из биологической системы после цикла замораживания-отогревания.

Известно, что трансмембранные потоки вещества и распределение его между клеткой и средой не описываются простыми уравнениями диффузии и количественная оценка фракций внутри- и внеклеточного вещества в большинстве случаев может быть получена эмпирическим путем.

Цель работы – определение коэффициентов распределения диметилсульфоксида, 1,2-пропандиола и глицерина между эритроцитами млекопитающих и внеклеточной средой в условиях диффузионного равновесия и оценка влияния на эти коэффициенты фракции криопротектора, связанного с клеткой.

Коэффициенты распределения оценивали методом рефрактометрии на основании анализа показателей преломления внеклеточных растворов, полученных центрифугированием суспензий эритроцитов, содержащих криопротекторы.

Установлено, что для эритроцитов быка и лошади в области низких концентраций криопротектора (до 5% масс.) существует зависимость коэффициентов распределения от концентрации криозащитного вещества. Причиной возникновения нелинейности в данном концентрационном диапазоне является существование фракции криопротектора, адсорбированной содержимым эритроцита. По количеству фракции связанного с клеткой криопротектора исследуемые вещества можно расположить в ряд: ДМСО, глицерин и 1,2-пропандиол, в котором концентрация адсорбированного криопротектора увеличивается.

Экспериментально показано, что многократным (до 7 раз) отмыванием клеток отмывочными растворами невозможно удалить фракцию связанного с клетками криопротектора. Данный факт следует учитывать при оценке токсичности криозащитных веществ и дальнейшем использовании криоконсервированных эритроцитов в медицинской практике.

The distribution of cryoprotective substances between erythrocyte and medium is one of the indices of interaction of these substances with a cell. In cryobiology the investigation of cryoprotectant distribution between cell and medium is an essential link when developing the cryoprotective media and methods of cryoprotectant removal out of biological system after freeze-thawing cycle.

It is known that the transmembrane flows of the substance and its distribution between cell and medium are not described with simple diffusion equations and quantitative assessment of intra- and extracellular substance fractions may be obtained empirically in most cases.

The aim of work was the determination of distribution coefficients of dimethyl sulfoxide, 1,2-propane diol and glycerol between mammalian erythrocytes and extracellular medium in the conditions of diffusion balance as well as estimation of influence on these coefficients of cell-bound cryoprotectant fraction.

The distribution coefficients were assessed by refractometry method on the base of analysis of extracellular solution refraction indices obtained by centrifugation of erythrocyte suspension containing cryoprotectants.

It was established that the dependence of distribution coefficients on cryoprotective substance concentration occurs for bovine and equine erythrocytes in the range of low cryoprotectant concentrations (up to 5% w/w). Non-linearity appeared in given concentration range is caused by the occurrence of cryoprotectant fraction adsorbed by erythrocyte contents. According to the amount of cell-bound cryoprotectant fraction the investigated substances form the following row: DMSO, glycerol and 1,2-propanediol wherein a concentration of adsorbed cryoprotectant increases.

It was experimentally shown that it was impossible to remove the fraction of cell-bound cryoprotectant by multiple (up to 7 times) cell washing with washing solutions. This fact should be taken into account during evaluation of cryoprotective substance toxicity and further application of cryopreserved erythrocytes in clinics.

Влияние быстрого и медленного замораживания на антиоксидантные свойства экстрактов плаценты

С.Л. РОЗАНОВА, О.А. НАРДИД

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Rapid and Slow Freezing on Antioxidant Properties of Human Placenta Extract

S.L. ROZANOVA, O.A. NARDID

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

Известно, что экстракты плаценты человека (ЭПЧ) благодаря наличию в них биологически активных веществ обладают различной терапевтической активностью. Считается, что данная активность связана с их антиоксидантными свойствами.

Для увеличения срока хранения препаратов в клинической практике используют низкие температуры. Однако влияние криоконсервирования на гетерогенные макромолекулярные соединения, обладающие антиоксидантной активностью, в частности ЭПЧ, изучено недостаточно.

Таким образом, целью данной работы было изучить влияние замораживания-оттаивания на антиоксидантные свойства экстрактов плаценты человека.

Водно-солевые экстракты плаценты получали из гомогената ткани, освобожденной от соединительной ткани. Экстракты замораживали до -20 и -196°C со скоростями 1–2 и 300 град./мин соответственно. Отогрев осуществляли на водяной бане при 20°C . Свежевыделенные и подвергнутые замораживанию-оттаиванию экстракты разделяли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Антиоксидантную активность (АОА) ЭПЧ оценивали по способности восстанавливать $\text{ABTS}^{\cdot-}$ -радикал, а также хелатировать ионы железа.

Кинетика восстановления $\text{ABTS}^{\cdot+}$ имеет две фазы: быструю (за 10 с) и медленную (за следующие 390 с). Первая обусловлена низкомолекулярными антиоксидантами, вторая – молекулами различных молекулярных масс. Медленное замораживание до -20°C приводит к снижению АОА ЭПЧ, что обусловлено снижением активности антиоксидантов, ответственных за быструю фазу, в то время как увеличение активности после быстрого замораживания до -196°C – увеличением активности медленно восстанавливающих антиоксидантов. Исследование отдельных фракций ЭПЧ показало, что практически все фракции обладают АОА и имеют как быстро, так и медленно восстанавливающие центры. Показано, что замораживание-оттаивание ЭПЧ приводит к увеличению АОА полученных из них фракций с различными молекулярными массами, начиная с 700 кДа. Снижение активности ЭПЧ главным образом происходит из-за ее уменьшения в низкомолекулярных фракциях (менее 5 кДа).

Показано, что хелатирующая активность ЭПЧ снижается после медленного замораживания и увеличивается после быстрого. Полученные результаты позволяют предположить, что быстрое замораживание ЭПЧ приводит к увеличению их АОА за счет конформационных изменений белковых молекул с различными молекулярными массами.

Human placenta extract (HPE) appears to possess different therapeutical activity due to high concentration of bioactive substances. Such an activity of HPE is believed to be related to its antioxidant properties.

Low temperatures are widely used in clinical practice in order to increase preparation shelf life. However, influence of cryopreservation on heterogeneous macromolecule composition which is known to possess antioxidant activity, in particular, on human placenta extract, has been investigated insufficiently.

Thus the aim of the present study was to investigate the influence of freeze-thawing on human placenta extract antioxidant properties.

Aqueous-saline HPEs were obtained from homogenate of placenta tissues separated from conjunctive tissue. The extracts were frozen down to -20 and to -196°C with 1–2 and 300 deg/min rates, correspondingly. Extracts were thawed on the water bath at 20°C . Fresh and frozen-thawed extracts were separated by the gel-chromatography method using the column with Sephadex G-200. Antioxidant activity of HPEs was estimated by ability to reduce $\text{ABTS}^{\cdot+}$ cation radical and by ferrous ions (Fe^{2+}) chelating ability.

$\text{ABTS}^{\cdot+}$ radical reduction kinetics has two phases: fast (up to 10 sec) and slow (up to 390 sec). First phase is provided by low molecular weight antioxidants, the second one is due to molecules of different molecular weight. Slow freezing down to -20°C leads to lowering of extract anti-radical activity and it is due to decreasing of antioxidants activity responsible for the rapid phase, whereas increasing of this activity due to antioxidants responsible for slow phase has been revealed after rapid freezing down to -196°C . Decolorization assay of separate HPE fractions has shown that almost all the fractions possess antioxidant activity and contain both rapid and slow-reducing centers. Freeze-thawing of HPEs has been shown to lead to increasing the antiradical activity in several fractions with different molecular weights starting with 700 kDa. Lowering of HPE antiradical activity occurs mainly due to its decreasing in low-molecular fractions (less than 5 kDa).

It has been demonstrated that chelating ability of HPE reduces after freezing down to -20°C while it increases after rapid freezing down to -196°C . Obtained results allow to assume that rapid freezing of HPE leads to the increasing of antioxidant activity due to conformational changes of protein molecules with different molecular weights.

Снижение цитотоксичности мембранотропных криопротекторов до замораживания спермы индюка в присутствии белковых добавок

М.А. ПЕТРИК¹, И.Н. МАРТЫНЮК²

¹Харьковский государственный университет им. В.Н. Каразина

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

Cytotoxicity Reduction of Membrane-Tropic Cryoprotectants Prior to Freezing of Turkey Sperm in Presence of Protein Additives

M.A. PETRIK¹, I.N. MARTYNYUK²

¹V.N. Karazin Kharkiv National University

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

Инкубация спермиев птиц с криопротекторами (КП) до замораживания в течение короткого времени увеличивает количество морфологически аномальных клеток, снижает подвижность и через 3–4 ч контакта, даже при гипотермии (4°C), наблюдается их полная гибель. Обнаружено, что одним из способов снижения цитотоксичности КП с выраженной мембранотропностью является введение в криозащитную среду белковых добавок, в частности альбуминов.

Цель данной работы – исследовать механизм снижения цитотоксичности мембранотропных КП на этапе подготовки к замораживанию спермы индюка в присутствии белковых добавок.

Использовали сперму индюка породы “Белая широкогрудая” возрастом 10–12 месяцев, получая ее асканийским способом. Для оценки сохранности спермиев определяли подвижность, переживаемость (подвижность во времени), количество клеток с поврежденной мембраной и морфологическими аномалиями. Изучены КП: этиленгликоль (ЭГ), 1,2-пропандиол (1,2-ПД), 2,3-бутандиол (2,3-БД), формамид (ФА), диметилформамид (ДМФА), диметилацетамид (ДМАц). Изучено взаимодействие КП с яичным альбумином (ЯА) в присутствии бромтимолового синего. Проведен анализ литературных данных по указанной проблеме.

Обсуждается механизм снижения цитотоксичности КП в присутствии ЯА, основанный на образовании прочного комплекса “ЯА + КП”, который влияет на распределение КП между клеткой и внеклеточной средой и тем самым не позволяет достичь критических значений их концентраций, при которых начинает проявляться повреждающее действие. Гидрофильные ФА, ЭГ, 1,2-ПД образуют комплекс “ЯА + КП” преимущественно специфическим взаимодействием с поверхностью белка Н-связями. В образовании комплекса белка с ДМФА, ДМАц и 2,3-БД, обладающими выраженными мембранотропными свойствами, играют роль как специфические (Н-связь), так и неспецифические гидрофобные взаимодействия с преимущественным вкладом последних. Соотношение в пользу того или другого механизма взаимодействия альбумина с КП зависит от гидрофильно-гидрофобного баланса их молекул.

Incubation of avian sperm with cryoprotectants (CPs) prior to freezing for a short period induces the increasing of morphologically abnormal cell number, reduces motility and after 3–4 hrs later the contact even under hypothermia conditions (4°C) their complete death is observed. It was found that one of the methods of cytotoxicity reduction for CP with an expressed membrane-tropicity was introduction into cryoprotective medium of protein additives, particularly, albumins.

The research aim was to study the cytotoxicity reduction mechanism of membrane-tropic CPs at the stage of preparation to freezing of turkey sperm in presence of protein additives.

There was used turkey sperm of “White deep-chested” breed of 10–12-month-old individuals, deriving it by the Askaniya method. To estimate sperm survival the motility (motility vs. time), a number of cells with damaged membrane and morphological abnormalities were determined. There were studied CPs such as: ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD), 2,3-butane diol (BD), formamide (FA), dimethyl formamide (DMFA), dimethyl acetamide (DMAc). The interaction of CPs with egg albumin (EA) in presence of bromthymol blue was investigated. Literature data on the mentioned problem were analyzed.

There is discussed the mechanism of CP cytotoxicity reduction in presence of EA based on the formation of solid complex “EA + CPs”, affecting the distribution of CPs between cell and intercellular medium, therefore not enabling to achieve their critical concentrations, within which their damaging effect starts to be manifested. Hydrophilic FA, EG, 1,2-PD form the complex “EA + CPs” mainly by specific interaction of H-bonds with protein surface. In formation of protein complex with DMFA, DMAc and 2,3-BD, possessing the expressed membrane-tropic properties both specific (H-bond) and non-specific hydrophobic interactions with predominant contribution of the latter play a role. A balance in favor of one or another mechanism of albumin interaction with CPs depends on hydrophilic-hydrophobic balance of their molecules.

Кластерная кристаллизация водных растворов глицерина

Е.В. ДАВЫДОВА, А.И. ОСЕЦКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cluster Crystallization of Aqueous Glycerol Solutions

E.V. DAVYDOVA, A.I. OSETSKIY

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

Ранее были рассмотрены термодинамические аспекты кластерной кристаллизации охлаждаемых криопротекторных растворов и возможные модели образующихся кластеров, а также сформулированы принципы учета этого явления при построении соответствующих диаграмм состояния [Осецкий А.И., 2009; Осецкий А.И., 2011]. Принципиальное отличие этих диаграмм от традиционно используемых в криобиологии диаграмм эвтектического типа обусловлено введением новой кластерной фазы β_c , что впервые позволит объяснить эффект понижения линии солидуса охлаждаемых криопротекторных растворов до температуры стеклования и открывать новые возможности для трактовки механизмов повреждения криоконсервируемых биообъектов в зонах витрификации. Однако вопрос о закономерностях кластерной кристаллизации водных растворов различных криопротекторных веществ по-прежнему остается открытым и требует тщательного изучения различными экспериментальными методами.

Цель работы – исследовать возможность кластерной кристаллизации в водных растворах глицерина методом дифференциальной объемной сканирующей тензодилатометрии.

В результате проведенных исследований обнаружена ярко выраженная особенность кинетики кристаллизации растворов в интервалах исходных весовых концентраций глицерина C_g 58...62%. В растворах этих концентраций не образуются кристаллы льда на этапе охлаждения вплоть до температуры стеклования, но происходит интенсивная кристаллизация воды в процессе последующего отогрева в диапазоне температур $-100...-60^\circ\text{C}$. При этом масса образующихся при отогреве кристаллов льда определяется только конечной температурой предварительного охлаждения и концентрацией C_g , резко уменьшаясь при ее отклонении в обе стороны от указанного интервала. В отличие от высказанных ранее предположений [Зинченко А.В. и др., 1982] кинетика кристаллизации при отогреве практически не зависит от соотношения скоростей охлаждения и нагрева в области используемых в криобиологии значений. С точки зрения классических представлений полученные результаты противоречат принципу Ле-Шателье и не находят объяснения в рамках закономерностей эвтектической кристаллизации. В связи с этим проведен анализ данного эффекта с позиций кластерной кристаллизации, так как исследованные интервалы температур и концентраций характерны для жидких микрофаз в криоконсервируемых биообъектах к моменту реализации в них кластерного образования нанокристаллов льда. Показано хорошее совпадение полученных результатов с кластерной моделью кристаллизации, рассмотрены механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов за счет данного явления и сделаны выводы о возможности их ингибирования.

Recently there have been considered thermodynamic aspects of cluster crystallization of cooling cryoprotectant solutions and possible models of forming clusters as well as there were specified the principles of consideration this phenomenon during building-in of corresponding state diagrams [Osetskiy A.I., 2009; Osetskiy A.I., 2011]. Fundamental difference of these diagrams from the traditionally used in cryobiology eutectic diagrams is conditioned by the introduction of a new cluster phase β_c , which for the first time will allow the explanation of the effect of solidus line lowering in cooling cryoprotectant solutions down to vitrification temperature and open new possibilities for interpreting of cryopreserved bioobject damage mechanisms in vitrification zones. However, the task about the regularities of cluster crystallization of aqueous solutions of different cryoprotectant substances has still remained open and demands careful studying with various experimental methods.

The research aim was to investigate the possibility of cluster crystallization in aqueous glycerol solutions by the method of differential volumetric scanning tenzodilatometry.

In the result of carried-out investigations there was detected a strongly marked peculiarity of solution crystallization kinetics within the intervals of initial glycerol weight concentrations C_w 58...62%. In the solutions of these concentrations the ice crystals are not formed at the cooling stage down to the vitrification temperature but intensive water crystallization in the process of following thawing within the temperature range $-100^\circ\text{C}...-60^\circ\text{C}$ occurs. Moreover, the mass of crystals formed during warming is determined only by final temperature of preliminary cooling and by concentration C_w , sharply decreasing during its deviation towards both sides from the mentioned interval. In contrast to the previous suggestions [Zinchenko A.V. *et al.*, 1982] kinetics of crystallization during thawing almost does not depend on ratio of the cooling and thawing rates in the range of values used in cryobiology. According to the classical notions the obtained results contradict Le Chatelier principle and do not find the explanation in the regulations of eutectic crystallization. Therefore there was carried-out the analysis of this effect as for the cluster crystallization since the investigated temperature and concentration intervals are characteristic for liquid microphases in cryopreserved bioobjects in the moment of occurrence of the ice nanocrystal cluster formation. It was shown a good matching of the obtained results with cluster model of crystallization, there were considered the mechanism of damaging of bioobjects to be cryopreserved due to this phenomenon and the possibility of their inhibition was concluded.

Связь между изменениями формы эритроцитов при действии модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса и хлорпромазина и чувствительностью эритроцитов к холодовому шоку

К.В. МАРКОВА¹, В.А. БОНДАРЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Relationship between Changes of Erythrocyte Shape under Effect of Cytoskeleton-Membrane Complex Modifiers and Chlorpromazine and Erythrocyte Sensitivity to Cold Shock

K.V. MARKOVA¹, V.A. BONDARENKO²

¹ Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

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

Изменение физико-химических и физиологических параметров клеток под влиянием различных веществ и условий окружающей среды всегда сопровождается изменением их морфологических характеристик. Одновременно часто происходит повышение либо снижение чувствительности клеток к действию различных стрессовых факторов.

В работе клетки, обработанные модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса (парахлормеркурийбензоат (ПХМБ), иодацетамид (ИАА), ПХМБ/ИАА, N-этилмалеимид (N-ЭМ)), подвергали действию хлорпромазина (ХПР) и холодового шока. Параллельно проводили морфологические исследования методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией формы клеток (увеличение $\times 200$).

Хлорпромазин снижал чувствительность эритроцитов к холодовому шоку даже при модификации цитоскелет-мембранного комплекса (обработка ПХМБ, ПХМБ/ИАА, ИАА, N-ЭМ). Однако антигемолитическая активность (АГА) ХПР зависима от вида обработки. При морфологических исследованиях обнаружено, что в присутствии ХПР эритроциты представлены стоматоцитарными формами. При обработке ПХМБ клетки приобретают форму сфероэхиноцитов. В образцах также заметны акантоциты. Иодацетамид вызывает выраженный эхиноцитоз. При предварительной обработке N-ЭМ большинство эритроцитов имели форму стоматоцитов.

При действии ХПР на клетки, модифицированные ПХМБ, форма эритроцитов не изменяется. Возможно, это обусловлено высокой степенью влияния этого модификатора на АГА ХПР. Наибольшее угнетающее действие на АГА ХПР оказывает комбинированная обработка ПХМБ/ИАА. При такой модификации эритроциты приобретают форму кодоцитов. При влиянии ХПР на клетки, обработанные таким образом, происходят изменение формы эритроцитов и образование тороцитов. При совместном действии на клетки ИАА и ХПР в образцах наблюдаются акантоциты и сфероциты. N-этилмалеимид, в отличие от всех модификаторов цитоскелет-мембранного комплекса, приводит к стоматоцитозу. Возможно, это связано с его наименьшим влиянием на АГА ХПР в условиях холодового шока. В образцах клеток, модифицированных N-ЭМ, наблюдаются также кодоциты, а при действии ХПР на такие клетки признаки кодоцитоза исчезают. В образце обнаружены только стоматоцитарные формы эритроцитов. Вероятно, ХПР конкурентно препятствует встраиванию N-ЭМ и тем самым его действию.

Использованные в работе вещества оказывают различное влияние на морфологические характеристики клеток, а также повышают чувствительность эритроцитов к стрессу и оказывают угнетающее влияние на АГА ХПР.

Changes of physical-chemical and physiological parameters of cells under the effect of different substances and environmental conditions are always followed by the alterations in their morphology. At the same time increase or decrease of cell sensitivity to the effect of different stress factors often occurs.

In this work the cells treated with cytoskeleton-membrane complex modifiers (parachloromercuribenzoate (PCMB), iodacetamide (IAA), PCMB/IAA, N-ethyl maleimide (N-EM)) were exposed to the effect of chlorpromazine and cold shock. At the same time there were made morphological investigations using optical microscopy (microscope "MBI-15U") with photo recording of cell shape ($\times 200$).

Chlorpromazine decreased erythrocyte sensitivity to cold shock even if cytoskeleton-membrane complex modifiers were used (PCMB, PCMB/IAA, IAA, N-EM exposure). But chlorpromazine anti-hemolytic activity depended on the treatment type. Morphological studies showed that the erythrocytes were represented by stomatocytes in chlorpromazine presence. After PCMB treatment cells gain a sphere-echinocyte shape. Also some acanthocytes were observed in the samples. Iodacetamide caused a significant echinocytosis. In case of preliminary treatment by N-EM most erythrocytes were stomatocytes.

In case of chlorpromazine effect on PCMB-modified cells there were no shape changes in erythrocytes. It can be caused by a high level of effect of this modifier on chlorpromazine anti-hemolytic activity. The most inhibiting influence on chlorpromazine anti-hemolytic activity was observed in case of combined PCMB/IAA treatment. In such modification erythrocytes gain the form of codocytes. Chlorpromazine effect on these cells is followed by erythrocyte shape changes and torocyte formation. In case of IAA and chlorpromazine combined effect the acanthocytes and spherocytes were observed in the samples. In contrast to other cytoskeleton-membrane complex modifiers N-ethyl maleimide led to stomatocyte formation. It can be caused by its low influence on chlorpromazine antihemolytic activity under cold shock conditions. In N-EM-modified samples the codocytes were also present, but after chlorpromazine treatment the signs of codocytosis disappeared. In the sample we observed only stomatocyte shaped erythrocytes. Probably, chlorpromazine competitively prevents N-EM integration and thereby prevents its action.

The substances used in this work differently affected cell morphology, increased erythrocyte stress sensitivity and inhibited chlorpromazine anti-hemolytic activity.

Сон и тиреоидные гормоны у крыс при холодной акклимации

Е.А. ВЕНЦКОВСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Sleep and Thyroid Hormones in Rats during Cold Acclimation

O.A. VENTSKOVSKA

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

Повышение устойчивости организма к холоду достигается за счет значительного напряжения функции тиреоидной системы и связанного с этим увеличением общих расходов энергии. Общепринятым также считается, что в процессе эволюции у млекопитающих выработались специфические механизмы эффективного поддержания энергетического баланса и экономии энергозатрат, одним из которых является цикл бодрствование-сон. Изменения временных характеристик цикла бодрствование-сон и роль сна в снижении уровня энергетических затрат организма при холодной акклимации изучены недостаточно.

Цель работы – изучить взаимосвязь между уровнем активации тиреоидной системы в процессе различных видов холодной акклимации и сопутствующими изменениями цикла бодрствование-сон у крыс.

Эксперименты одобрены комитетом по биоэтике при ИПКиК НАН Украины и проведены на 7–8-месячных крысах-самцах линии Вистар (220–250 г). Для формирования долговременной акклимации (ДА) животных содержали в течение 30 дней в условиях с пониженной температурой окружающей среды (4°C). Для кратковременной акклимации (КА) животных подвергали в течение 2-х дней в светлое время суток 2-м сериям из 9 охлаждений по 15 мин при температуре 10 или –12°C с интервалами по 45 мин при комнатной температуре 23°C. Концентрации тиреоидных гормонов (общего 3,5,3'-трийодтиронина (T₃) и общего тироксина (T₄)) в сыворотке крови определяли с помощью радиоиммунологического анализа. Длительную регистрацию биоэлектрической активности мозга и последующее определение начала и окончания стадий сна осуществляли по общепринятым критериям.

Долговременная акклимация приводила к увеличению длительности сна как медленноволнового (МВС) (с 54,8 ± 2,7 до 72,5 ± 4,6%), так и парадоксального (ПС) сна (с 7 ± 1,1 до 10,6 ± 0,6%) за счет уменьшения количества бодрствования (с 38,2 ± 3 до 16,9 ± 6%), происходящего на фоне значительного увеличения уровня T₄ в сыворотке крови (с 84,3 ± 7,3 до 157,1 ± 23,7 нмоль/л). При КА (–12°C) тиреоидная система активировалась менее выражено: концентрация T₄ возрастала с 84,3 ± 7,3 до 125,8 ± 9,8 нмоль/л, при этом достоверно увеличивалась длительность только ПС (с 6,4 ± 2,6 до 10,8 ± 5,6%) за счет уменьшения количества бодрствования с 42,9 ± 8,9 до 28,4 ± 7,7%. После КА (10°C) увеличивалась длительность МВС (с 56,5 ± 4,9 до 84,5 ± 6,1%) в светлое время суток на фоне тенденции к увеличению активности тиреоидной системы. Содержание T₃ в ходе формирования КА и ДА достоверно не изменялось.

Следовательно, по мере повышения нагрузки на тиреоидную систему в процессе холодной акклимации увеличивается длительность сна, что подтверждает предположение о его роли в процессе поддержания энергетического баланса и экономии энергозатрат при холодной акклимации.

The increasing of cold resistance of an organism is achieved through the significant increase in thyroid system activity and is associated with overall energy expenditure increase. Moreover, it is commonly believed that during mammal evolution the specific mechanisms for effective maintenance of energy balance and energy expenditure savings were formed, and one of these mechanisms is sleep-wake cycle. Changes of sleep-wake cycle temporal characteristics and the role of sleep in the reducing of energy consumption during cold acclimation have been studied insufficiently.

Thus, the aim of the work was the study of interrelation between level of thyroid system activation during different types of cold acclimation and related sleep-wake cycle changes in rats.

The experiments were performed in 7–8-month-old Wistar rats (220–250 g body weight) and were approved by the Committee of Bioethics at IPC&C of the NAS of Ukraine. Long-term acclimation (LTA) was achieved by keeping rats at 4°C for 30 days with food and water *ad libitum*. For short-term acclimation (STA) the animals were exposed to the temperature of –12 or 10°C for 15 min every hour during the day, for a total nine exposures. This procedure was repeated next day. Concentrations of thyroid hormones (total serum 3,5,3'- triiodothyronine (T₃) and total thyroxine (T₄)) were determined by radioimmunoassay. Long-term records of brain bioelectrical activity were manually stage scored as REM sleep, slow-wave sleep (SWS) or wakefulness in 4-s epochs.

Long-term acclimation led to the sleep duration increase, both slow wave sleep (SWS) (from 54.8 ± 2.7 to 72.5 ± 4.6%) and REM sleep (from 7 ± 1.1 to 10.6 ± 0.6%) on account of reducing of the wakefulness amount (from 38.2 ± 3 to 16.9 ± 6%). These changes were observed on the background of significant increase of serum T₄ (from 84.3 ± 7.3 to 157.1 ± 23.7 nmol/l). The lower level of thyroid system activation was observed during STA (–12°C): T₄ concentration increased from 84.3 ± 7.3 to 125.8 ± 9.8 nmol/l, and only REM sleep amount was significantly increased (from 6.4 ± 2.6 to 10.8 ± 5.6%) on the background of wakefulness amount decrease from 42.9 ± 8.9 to 28.4 ± 7.7%. After STA (10°C) the SWS amount increased in the light period of the day (from 56.5 ± 4.9 to 84.5 ± 6.1%) on the background of tendency in thyroid system activity increase. No changes were observed in serum T₃ concentration during forming of STA either LTA.

Thus the results show that the higher thyroid system loading is accompanied by higher sleep duration, that confirms the hypothesis about its role in the maintenance of energy balance and energy expenditure saving during cold acclimation.

Проницающая способность и криозащитная эффективность ряда криопротекторов

Н.А. ЧЕРНОБАЙ, Т.М. ГУРИНА, А.В. ПАХОМОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Permeability and Cryoprotective Efficiency of Several Cryoprotectants

N.A. CHERNOBAI, T.M. GURINA, A.V. PAKHOMOV

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

С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского [Гордиенко Е.А., 1994] определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток интерстиция тестисов (КИТ) и надпочечников для молекул глицерина, ДМСО, ЭГ и ДМФА при температурах 35, 20 и 5°C. Рассчитаны значения энергий активации (E_A) процессов переноса веществ через мембраны КИТ и клеток надпочечников для молекул изученных криопротекторов.

Показано, что при 5°C проницаемость плазматических мембран клеток надпочечников для глицерина, ДМСО и ЭГ достоверно не отличается (K_1 изменяется от $0,45 \times 10^{-7}$ до $0,49 \times 10^{-7}$ м/с). При 35°C наибольшей проницаемостью в ряду этих криопротекторов через мембраны клеток надпочечников характеризуется ЭГ ($K_1 = 24,37 \times 10^{-7}$ м/с), наименьшей – глицерин ($K_1 = 2,52 \times 10^{-7}$ м/с). Значение коэффициента проницаемости мембран клеток надпочечников для молекул ДМФА при 5°C составляет $233,0 \times 10^{-7}$ м/с, при более высокой температуре его проницаемость сравнима с проницаемостью молекул воды.

Значения коэффициентов проницаемости мембран клеток интерстиция тестисов для глицерина, ДМСО и ЭГ в интервале температур от 35 до 5°C отличаются незначительно и лежат в диапазонах $0,38 \pm 1,05 \times 10^{-7}$, $1,99 \pm 2,67 \times 10^{-7}$ и $6,75 \pm 9,32 \times 10^{-7}$ м/с при 5, 20 и 35°C соответственно. Исключение составляет ДМФА, значение коэффициента проницаемости которого при 20°C составляет $24,45 \times 10^{-7}$ м/с, при 5°C – $4,41 \times 10^{-7}$ м/с.

Установлено, что наименьшим значением энергии активации процессов переноса веществ через мембраны клеток надпочечников характеризуется глицерин ($E_A = 40,80$ кДж/моль), наибольшим – ЭГ ($E_A = 93,74$ кДж/моль); через мембраны клеток интерстиция тестисов наименьшим значением энергии активации обладает глицерин ($E_A = 46,92$ кДж/моль), наибольшим – ДМФА ($E_A = 62,99$ кДж/моль).

Оценена сохранность КИТ после криоконсервирования с растворами глицерина (7%), ДМСО (10%), ЭГ (7%) и ДМФА (5%) с использованием скоростей охлаждения 1, 5 и 10 град./мин до -40°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Применение глицерина в качестве криопротектора обеспечило 75%-ю сохранность клеток при всех указанных режимах замораживания. При использовании других криопротекторов сохранность клеток повышалась (с 56 до 83%) при увеличении скорости охлаждения от 1 до 10 град./мин. Более низкую сохранность КИТ в присутствии ДМФА при низких скоростях можно объяснить поступлением криопротектора в клетки в процессе замораживания, обусловленным его высокой проницающей способностью.

Using the method of volumetry and the modified physical-mathematical model of Kedem-Katchalsky [Gordiyenko E.A., 1994] the permeability coefficients for testes interstitium and adrenal cortex cell plasmatic membranes for glycerol, Me₂SO, EG, and Me₂FA at 35, 20 and 5°C were determined. The values of activation energy (E_A) of the processes of substance transfer through testes and adrenal cortex cell membranes for molecules of the investigated cryoprotectants were calculated.

It was noted that at 5°C the permeability of adrenal cortex cell membranes for glycerol, Me₂SO and EG did not significantly differ (K_1 varied from 0.45×10^{-7} to 0.49×10^{-7} m/s). The highest permeability at 35°C for these cryoprotectants through adrenal cortex cell membranes was characteristic for EG ($K_1 = 24.37 \times 10^{-7}$ m/s), the lowest one was for glycerol ($K_1 = 2.52 \times 10^{-7}$ m/s). The permeability coefficient of adrenal cortex cell membranes for Me₂FA molecules at 5°C was 233.0×10^{-7} m/s, at higher temperature its permeability was comparable with the one for water molecules.

The permeability coefficients of testes interstitium cell membranes for molecules of glycerol, Me₂SO and EG within the temperature range from 35 down to 5°C differed slightly and were within $0.38 \pm 1.05 \times 10^{-7}$, $1.99 \pm 2.67 \times 10^{-7}$ and $6.75 \pm 9.32 \times 10^{-7}$ m/s at 5, 20 and 35°C, respectively. Me₂FA was an exception, its permeability coefficient at 20°C was 24.45×10^{-7} m/s, and at 5°C was 4.41×10^{-7} m/s.

The obtained results showed that the lowest value of activation energy of the processes of substance transfer through the adrenal cortex cell membranes was characteristic for glycerol ($E_A = 40.80$ kJ/mol), the highest for EG ($E_A = 93.74$ kJ/mol); through the testes interstitium cell membranes the lowest value of activation energy was characteristic for glycerol ($E_A = 46.92$ kJ/mol), the highest for Me₂FA ($E_A = 62.99$ kJ/mol).

The survival of testes interstitium cells after cryopreservation with glycerol (7%), Me₂SO (10%), EG (7%) and Me₂FA (5%) solutions using the cooling rates of 1, 5 and 10 deg/min down to -40°C with the following plunging into a liquid nitrogen has been estimated. Application of glycerol as a cryoprotectant provided 75% cell survival in all studied freezing conditions. Cell survival increased (from 56 up to 83%) with a rise in cooling rate from 1 up to 10 deg/min when using other cryoprotectants. Lower testes cell survival in the case of Me₂FA and low cooling rates could be caused by an extra flux of cryoprotectant into cells during freezing due to extremely higher permeability of Me₂FA.

Влияние криопротекторов ДМСО, 1,2-пропандиола и криовоздействия на чувствительность митохондриального потенциала одиночных гепатоцитов к регуляции фенилэфрином при оценке флуоресцентным методом

М.Ю. МАЛЮКИНА, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Influence of DMSO, 1,2-Propanediol Cryoprotectants and Cryoexposure on Sensitivity of Single Hepatocyte Mitochondrial Potential to Regulation with Phenylephrine Assessed by Fluorescent Method

M.YU. MALYUKINA, N.S. KAVOK, I.A. BOROVY

Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Методом микрофлуориметрии одиночных клеток по интенсивности флуоресценции агрегатов зонда JC-1 оценивали агонист-индуцированные изменения трансмембранного потенциала митохондрий гепатоцитов крыс до и после криовоздействия. Криоконсервацию клеток осуществляли методом ступенчатого замораживания в жидком азоте в присутствии 10% ДМСО или 10% 1,2-пропандиола. Было показано, что низкомолекулярные криопротекторы в данных концентрациях не оказывают влияния на митохондриальный потенциал при кратковременной инкубации с клетками (1 ч) с последующей их отмывкой. Однако после криовоздействия отмечалось снижение потенциала митохондрий гепатоцитов ($80 \pm 6\%$ от контроля) при использовании ДМСО в качестве криопротектора, в клетках, криоконсервированных с 1,2-пропандиолом, агрегаты красителя не обнаруживались.

Согласно данным литературы и результатам собственных исследований воздействие криозащитных веществ в более низких концентрациях (менее 10%) может приводить к изменениям в механизмах регуляции трансмембранных потенциалов клетки. В настоящем исследовании было установлено, что кратковременная инкубация изолированных гепатоцитов в присутствии 2 и 8% ДМСО с последующим отмыванием криопротектора не влияет на митохондриальный потенциал. Однако, в отличие от контроля, быстрый (к 15 мин эксперимента) стимулирующий эффект фенилэфрина (10^{-5} М) на образование j-агрегатов (гормон-индуцируемое повышение интенсивности флуоресценции агрегатов на 30%) в митохондриях гепатоцитов на фоне воздействия криопротектора не обнаруживался. Тест на чувствительность потенциала к регуляции фенилэфрином был также использован для оценки восстановления митохондриальной функции в гепатоцитах после криовоздействия. Ответ на краткосрочное гормональное воздействие также не регистрировался. Полученные данные указывают, что, по-видимому, после воздействия криопротектора и криоконсервации для полного восстановления клеточных функций и чувствительности к регуляторным воздействиям необходим определенный лаг-период.

Agonist-induced changes of rat hepatocyte transmembrane mitochondrial potential prior to and after the cryoexposure were evaluated by fluorescence intensiveness of JC-1 probe aggregates obtained with single cell microfluorimetry method. The cells were cryopreserved by stepwise freezing in liquid nitrogen with either 10% DMSO or 10% 1,2-propane diol. It was shown that low-molecular cryoprotectants in these concentrations did not affect the mitochondrial potential after short-term incubation with cells (1 hour) and their following washing. However, after cryoexposure we observed the decrease of hepatocyte mitochondrial potential ($80 \pm 6\%$ of the control) if using DMSO as cryoprotectant, and in the cells cryopreserved with 1,2-propane diol no dye aggregates were found.

According to the literature data and the results of our own investigations the effect of cryoprotective substances in lower concentrations (below 10%) may lead to the changes in regulation mechanisms of transmembrane cell potentials. This investigation allowed to establish that a short-term incubation of isolated hepatocytes with 2 and 8% DMSO with the following removing of cryoprotectant did not affect the mitochondrial potential. However, in contrast to the control, a rapid (to the 15th minute of experiment) stimulating effect of phenylephrine (10^{-5} M) on the formation of j-aggregates (hormone-induced increase of aggregate fluorescence intensiveness by 30%) in hepatocyte mitochondria on the background of cryoprotectant exposure was not found. Test for sensitivity of potential to the regulation by phenylephrine was also used for assessment of mitochondrial function restoration in hepatocytes after cryoexposure. The response to a short-term hormonal effect was not observed too. The obtained data point that the occurrence of certain lag period after influence of cryoprotectant and cryopreservation is obviously necessary for a complete restoration of cell functions and their sensitivity to the regulatory effects.

Корреляционный анализ показателей сохранности эритроцитов до и после замораживания в криозащитных средах различного состава на основе оксиэтилированного метилцеллозолява

О.В. ВЯЗОВСКАЯ, А.В. НИКОЛЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Correlation Analysis of Erythrocyte Survival Parameters Prior to and After Freezing in Cryoprotective Media of Different Composition Based on Oxyethylated Methyl Cellosolve

O.V. VYAZOVSKA, A.V. NIKOLENKO

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

Для изучения сохранности эритроцитов при использовании криозащитных сред разного состава важна комплексная оценка функционального состояния эритроцитов, характеризующая их устойчивость к замораживанию.

Исследовали содержание ионов K^+ и Na^+ в эритроцитах, их корреляционную связь с показателями гематокрита и осмотической хрупкости в зависимости от состава криозащитных сред на основе оксиэтилированного метилцеллозолява (ОЭМЦ).

Использовали среды: 20 и 30% ОЭМЦ, приготовленные на 50 мМ и 150 мМ растворах NaCl, 20% ОЭМЦ – на 100 мМ NaCl с добавлением 3% сахарозы, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% глюкозой, 20% ОЭМЦ – на 50 мМ NaCl с 5% маннитом. Эритроциты с криозащитными средами замораживали путем погружения в жидкий азот. Исследуемые образцы отогревали на водяной бане при температуре 40–42°C. Содержание внутриклеточного калия и натрия измеряли в эритроцитах до и после замораживания на пламенном фотометре ПАЖ-1. Гематокрит определяли в капиллярах с использованием микроцентрифуги МГЦ-8. Осмотическую хрупкость измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм и рассчитывали относительно 100%-го гемолиза.

Криозащитные среды на основе непроникающего криопротектора ОЭМЦ на этапе экспозиции вызывали разную степень дегидратации клеток, что отражалось на показателях гематокрита и сохранности криоконсервированных эритроцитов. Установлена положительная корреляция гематокрита с сохранностью внутриклеточного калия ($k = 0,82, p < 0,03$) и отрицательная – со значениями осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания ($k = -0,88, p < 0,01$), т. е. чем ниже показатели гематокрита после экспозиции эритроцитов с криозащитными средами, тем выше их осмотическая хрупкость и, как следствие повреждения клеточных мембран, – большая потеря клетками калия. Осмотическая хрупкость после замораживания отрицательно коррелировала с содержанием внутриклеточного калия ($k = -0,94, p = 0,001$) и положительно – с содержанием внутриклеточного натрия ($k = 0,9, p < 0,006$).

Анализ полученных результатов показал, что сохранность эритроцитов определялась составом криозащитных сред: содержанием электролита (NaCl) и неэлектролитов (криопротектора и углеводов). Снижение в криозащитных средах на основе ОЭМЦ концентрации криопротектора с 30 до 20%, содержания соли (NaCl) с 150 до 50 мМ и добавление углеводов (сахарозы, маннита, глюкозы) способствовали повышению сохранности эритроцитов после замораживания-отогрева по всем исследуемым показателям.

To study the erythrocyte survival after application of cryoprotective media with different composition the integrated assessment of functional state, characterising erythrocyte resistance to freezing is important.

The content of K^+ and Na^+ in erythrocytes was studied as well as their correlation with hematocrit and osmotic fragility depending on the cryoprotective medium compositions based on oxyethylated methyl cellosolve (OEMC).

The following media were used: 20% and 30% OEMC prepared with 50 mM and 150 mM NaCl solutions, 20% OEMC in 100 mM NaCl solution supplemented with 3% sucrose, 20% OEMC in 50 mM NaCl with 5% glucose, 20% OEMC in 50 mM NaCl with 5% mannitol. Erythrocytes were frozen in the cryoprotective media by plunging into liquid nitrogen. The experimental samples were thawed in water bath at 40–42°C. The intracellular potassium and sodium content was measured in erythrocytes prior to and after freezing using a flame photometer PAG-1. Hematocrit was examined in capillaries using a microcentrifuge GCM-8. Osmotic fragility was determined by a spectrophotometric method at 540 nm and calculated vs. 100% hemolysis.

The cryoprotective media based on the non-penetrating cryoprotectant OEMC during exposure caused different rate of cell dehydration, which affected hematocrit and indices of erythrocyte survival. There were found the positive correlation of hematocrit with the intracellular potassium content ($k = 0.82, p < 0.03$) and negative correlation with the post-thaw erythrocyte osmotic fragility values ($k = -0.88, p < 0.01$); i. e. the lower was hematocrit of erythrocytes after exposure with cryoprotective media, the higher was their osmotic fragility, and, as a consequence of cell membranes damage, the higher loss of cell potassium. Osmotic fragility after freezing negatively correlated with intracellular potassium content ($k = -0.94; p = 0.001$) and positively correlated with intracellular sodium content ($k = 0.9, p < 0.006$).

Analysis of the obtained results showed that erythrocyte survival was determined by the cryoprotective media composition: content of electrolyte (NaCl) and non-electrolytes (cryoprotectant and carbohydrates). Decrease of the cryoprotectant concentration from 30% to 20% in the cryoprotective media composition based on OEMC, reduction of NaCl content from 150 mM to 50 mM and addition of carbohydrates (sucrose, mannitol, glucose) improved erythrocyte survival after freeze-thawing by all the studied parameters.

Определение удельной электрической проводимости ооцитов мыши в растворах сахарозы и проникающих криопротекторов методом импульсной кондуктометрии

О.А. СТРИХА, Е.И. СМОЛЬЯНИНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Determination of Mouse Oocyte Specific Electric Conductivity in Solutions of Sucrose and Permeative Cryoprotectants Using Electroporation Method

O.A. STRIKHA, E.I. SMOLYANINOVA

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

Оптимизация программ криоконсервирования ооцитов млекопитающих тесно связана с поиском эффективных криопротекторов и уменьшения их токсичного влияния на клетки. Эффективность криопротекторов, как правило, определяется после цикла низкотемпературного криоконсервирования по оценке сохранности морфологии гамет и их способности к дальнейшему развитию. Широкое применение в криобиологической практике получили исследование осмотического поведения клеток и определение биофизических параметров их плазматических мембран в условиях, моделирующих различные криобиологические ситуации. Однако такие исследования не отвечают на вопрос: почему вещества, обладающие сходной проникающей способностью, оказывают различное по эффективности криозащитное действие? Наряду с осмотическим фактором свой вклад в токсичность вносит непосредственное химическое воздействие криопротектора на клеточные и, прежде всего, мембранные структуры. Попытка разделить эти два фактора требует использования дополнительных методических подходов и расширения спектра изучаемых клеточных параметров.

Цель работы – изучение влияния криопротекторов, принадлежащих к различным классам химических веществ, на электрическую проводимость ооцитов мыши.

Ооциты мыши на стадии МII мейоза получали стандартным методом. Методом импульсной кондуктометрии (электропорации) определяли зависимость электрической проводимости отдельных ооцитов в процессе их экспозиции в изотоническом растворе сахарозы (0,3 М) и 1,0 М растворах этиленгликоля (ЭГ), ацетамида (АЦ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) от напряженности приложенного электрического поля. Растворы криопротекторов готовили на растворе сахарозы с конечной концентрацией 0,3 М.

Показано, что исследуемые растворы криопротекторов оказывают различное влияние на устойчивость ооцитов мыши к действию электрического импульса. В растворах АЦ и сахарозы электрическая проводимость ооцитов мыши характеризуется относительно небольшими значениями и незначительной скоростью роста ее зависимости от напряженности поля вплоть до необратимого электрического пробоя, который наблюдали при напряженности поля около 3 кВ/см. В растворах ЭГ, ДМСО и 1,2-ПД необратимого электрического пробоя ооцитов не наблюдали, что свидетельствует о стабилизирующем действии этих криопротекторов на плазматические мембраны ооцитов. Таким образом, импульсная кондуктометрия является перспективным экспериментальным методом изучения влияния физико-химических факторов криоповреждения на сохранность клеток.

Optimization of mammalian oocyte cryopreservation protocols is tightly connected with searching of effective cryoprotectants and decreasing their toxic influence on cells. As a rule, the cryoprotectant efficiency is assessed after the low-temperature preservation cycle by estimation of gametes' morphology and their ability to further development. The investigations of cell osmotic behavior and the determination of their plasma membrane biophysical parameters under the conditions that simulate several cryobiological situations are widely used in cryobiological practice. However, such investigations do not answer the question: why substances of similar permeability possess different efficiency of cryoprotective action? The direct chemical influence on cell membranes and cytoplasmic structures as well as osmotic factor contributes to cryoprotectant toxicity. The attempt of separating these two factors demands additional methodical approaches and widening the spectrum of the studied cell parameters.

The aim of this investigation was to study the effect of permeative cryoprotectants which belong to different classes of chemical substances on specific electric conductivity of mouse oocytes.

Mouse MII oocytes were derived by a standard method. Using the techniques of electroporation the dependences of specific electric conductivities of mouse oocytes during their exposure in isotonic sucrose solution (0.3 M) and 1.0 M ethylene glycol (EG), acetamide (AA), 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions vs. the applied electric field intensity have been studied. The cryoprotectant solutions were prepared on the base of sucrose solution with final concentration of 0.3 M.

It was shown that the investigated cryoprotectant solutions differently affected mouse oocytes stability to the action of electric impulse. In AA and sucrose solutions the specific electric conductivity of mouse oocytes was characterized by relatively small values and insignificant growth rate of its dependence on the external electric field intensity until irreversible electric breakdown occurrence, which was observed at 3 kV/cm intensity. The irreversible electric breakdown of mouse oocytes in EG, DMSO and 1,2-PD solutions was not observed, that testified to stabilizing effect of these cryoprotectants on oocyte plasma membranes. Thus, the method of impulse conductometry is a perspective experimental approach to study the influence of physical-chemical factors of cryoinjury on the cell survival.

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием сахарозы

В.В. МУЦЕНКО¹, Ю.А. ПЕТРЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Sucrose

V.V. MUTSENKO¹, YU.A. PETRENKO²

¹V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov

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

Для криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) обычно используются криозащитные среды, включающие 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку ксеногенного происхождения, которые приходится удалять перед введением, что вносит дополнительный технологический этап, часто приводящий к значительной потере клеток. Сахароза часто используется при криоконсервировании клеток в качестве непроводящего нетоксичного осмотически активного компонента. В данной работе исследовали некоторые подходы использования сахарозы для снижения концентрации ДМСО при криоконсервировании МСК человека.

В работе использовали МСК, полученные с письменного согласия информированных доноров, культивированные в течение 4–7 пассажей. Сахарозу в концентрациях 0,1; 0,15 и 0,2 М использовали для предобработки клеток до криоконсервирования, а также в качестве добавки в криозащитную среду. Предобработку проводили путем культивирования клеток в течение суток с указанными концентрациями сахарозы. Криоконсервирование МСК осуществляли со скоростью 1°C/мин до –80°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли путем окрашивания трипановым синим. Метаболическую активность оценивали с использованием редокс-индикаторов МТТ и Alamar Blue (AB).

Криоконсервирование МСК в культуральной среде при отсутствии ДМСО, сахарозы и сыворотки приводило к гибели более 90% клеток. Предобработка клеток сахарозой или ее добавление в эту среду замораживания практически не влияли на жизнеспособность клеток. Вместе с тем значительное количество (около 50%) предобработанных клеток, криоконсервированных в присутствии сахарозы, после отогрева сохраняли жизнеспособность и метаболическую активность, оцененную по МТТ- и АВ-тестам. В условиях монослойного культивирования криоконсервированные клетки были способны к адгезии и пролиферации. Дополнительное введение всего 1% ДМСО в сахарозосодержащую криозащитную среду после предварительной обработки клеток приводило к повышению жизнеспособности, метаболической и пролиферативной активности клеток до 65%, что сопоставимо с результатами, полученными при криоконсервировании МСК под защитой 10% ДМСО в присутствии сыворотки. Дальнейшее изучение механизма криозащитного действия сахарозы может послужить основой для разработки эффективных методов криоконсервирования, исключающих использование токсичных концентраций криопротекторов и ксеногенной сыворотки.

For the cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSC) the cryoprotective solutions, containing 10% Me₂SO and xenogeneic fetal serum are usually applied. To remove these components before infusion the additional technological step, which often leads to significant cell loss is needed. Sucrose is often used for cells cryopreservation as a non-permeant, osmotically active component. In this study some approaches of sucrose application for the reduction of Me₂SO concentration during MSC cryopreservation were investigated.

MSC, used in this study were obtained after a written donor's informed consent with further culturing during 4–7 passages. Sucrose, in concentrations 0.1; 0.15 and 0.2 M was used for the pre-treatment of cells prior to cryopreservation and as an additive into the cryoprotective solution. Pre-treatment was performed by one day culturing of cells with indicated sucrose concentrations. MSCs were cryopreserved using the cooling rate 1°C/min down to –80°C, and following plunging into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue staining. Metabolic activity of cells was assessed by MTT and Alamar Blue (AB) redox indicators.

Cryopreservation of MSC in culture medium without Me₂SO, sucrose and serum resulted in the death of more than 90% cells. Pre-treatment of cells with sucrose or its addition into the freezing medium did not visibly affect the viability of cells. At the same time, the significant amount (about 50%) of pre-treated cells, cryopreserved in the presence of sucrose preserved their survival and metabolic activity, assessed by MTT and AB-tests after thawing. During monolayer culture, cryopreserved cells were able to attach and proliferate. Additional inclusion of just 1% of Me₂SO into sucrose-containing cryoprotective medium after cells pre-treatment resulted in the increase of survival, metabolic and proliferative activity of cells up to 65% that is similar to the data, obtained after cryopreservation of MSC with 10% Me₂SO in the serum presence. Further investigation of the mechanism of the sucrose cryoprotective effect could serve as a basis for the development of the effective cryopreservation methods, which exclude the application of toxic concentrations of cryoprotectants and xenogeneic serum.

Структурно-функциональное состояние ядроконсервированных клеток кордовой крови в процессе криоконсервирования

О.А. МИХАЙЛОВА, П.М. ЗУБОВ, В.В. РЯЗАНЦЕВ, Л.А. БАБИЙЧУК
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Structural and Functional State of Cord Blood Nucleated Cells During Cryopreservation

O.A. MYKHAILOVA, P.M. ZUBOV, V.V. RYAZANTSEV, L.A. BABYCHUK
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

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

Выделение фракции ЯСК из цельной КК человека производили с использованием декстрана (м.м. 60000). Замораживали клетки под защитой 5% ДМСО по разработанной нами программе. Фенотипирование ЯСК (CD45⁺) КК проводилось на проточном цитофлуориметре FACS Calibur с использованием реагентов BD. Жизнеспособность (7AAD), нарушение липидной асимметрии мембран (AnnexinV) и продукцию активных форм кислорода (АФК) (DCFH₂-DA) ЯСК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что при выделении и обработке ЯСК ДМСО сохранность и жизнеспособность клеток снижались. Анализ изменений липидной асимметрии мембран с помощью AnnexinV (маркера начальной стадии апоптоза) не показал увеличения количества AnnexinV⁺-клеток по сравнению с цельной КК. Интенсивность флуоресценции DCF (*I*_{DCF}) ЯСК после процедуры выделения существенно не отличалась от показателей в цельной КК, а обработка клеток ДМСО приводила к повышению уровня внутриклеточных АФК, о чем свидетельствует прирост *I*_{DCF}. Добавление экзогенной H₂O₂ как к выделенным, так и к обработанным ДМСО ЯСК не влияло на временную динамику *I*_{DCF} по сравнению с клетками цельной КК, что свидетельствует о сохранении АОС клеток в состоянии, сходном с нативным в цельной КК.

Дальнейшая процедура замораживания-отогрева позволяла получить до 80% ЯСК с сохранением высокого уровня их жизнеспособности (81,3±2,5% CD45⁺7AAD⁻). При этом количество AnnexinV⁺-клеток составляло 7,35±1,25%, что свидетельствует о сохранении структурной полноценности ЯСК. *I*_{DCF} после криоконсервирования ЯСК существенно не изменялась, однако при добавлении экзогенной H₂O₂ временная динамика *I*_{DCF} отличалась от показателей до замораживания, но с течением времени данные различия нивелировались, что говорит об отсутствии существенных изменений в работе АОС клеток после размораживания.

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

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

NC fraction was isolated from the whole cord blood using dextran (m.m. 60,000). Cells were frozen under protection of 5% DMSO by designed by us program. Phenotyping of CB NC (CD45⁺) was carried out by means of flow cytometer FACS Calibur using BD reagents. The viability (7AAD), disorder of lipid membrane asymmetry (AnnexinV) and production of reactive oxygen species (ROS) (DCFH₂-DA) of the NC was evaluated by the method of flow cytometry. It was shown that during NC isolation and their treatment by DMSO the survival and viability decreased. The analysis of membrane lipid asymmetry changes with AnnexinV (the marker of initial apoptosis stage) did not show the increase of AnnexinV⁺ cells comparing with the data of untreated whole cord blood. The DCF fluorescence intensity (*I*_{DCF}) in NC after isolation did not differ significantly from the indices of the whole CB, and the treatment of cells with DMSO led to the rise of intracellular ROS level, testified by the increased *I*_{DCF}. The addition of exogenous H₂O₂ to the isolated as well as to the treated by DMSO cells did not affect the temporal dynamics of *I*_{DCF} comparing with the cells of the untreated whole CB testifying to the preservation of AOS in the state similar with native one in the whole CB.

Further freeze-thawing allowed to obtain up to 80% of NC with a high viability level (81.3 ± 2.5% CD45⁺7AAD⁻). Moreover, the number of AnnexinV⁺ cells was 7.35 ± 1.25%, that testified to the preservation of structural integrity of NC. *I*_{DCF} after NC cryopreservation was not changed significantly, however, after the addition of exogenous H₂O₂ the temporal dynamics of *I*_{DCF} differed from the indices before the freezing but in due time these differences were neutralized that may testify to the absence of significant changes in the function of AOS cells after thawing.

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

Влияние фракций экстрактов плаценты человека на фазовые переходы в клеточных суспензиях эритроцитов и *Saccharomyces cerevisiae*

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Human Placental Extracts' Fractions on Phase Transitions in Cell Suspensions of Erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae*

YU.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

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

Водно-солевые экстракты плаценты содержат практически весь спектр биологически активных веществ, поэтому экстракты находят широкое применение в медицине. Вместе с тем, благодаря взаимодействию белков экстрактов с клетками, экстракты могут быть использованы в качестве добавок в многокомпонентных защитных средах при низкотемпературном консервировании. Изучение влияния отдельных фракций, входящих в состав экстрактов, на различные биосистемы в процессе термического воздействия является актуальным, так как низкотемпературное консервирование сопровождается рядом физических процессов, способных вызывать определенные повреждения биосистем. В настоящей работе проведено исследование фазовых переходов во фракциях экстрактов с молекулярной массой белков до 5, 50–70 и 750 кДа, в клеточных суспензиях эритроцитов, *Saccharomyces cerevisiae* и в суспензиях клеток в присутствии фракций экстрактов. Эксперименты выполнены на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном и изготовленном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Образцы охлаждали погружением в жидкий азот вне калориметрического блока. Скорость охлаждения образцов составляла $3,3(3)^\circ\text{C}/\text{с}$, затем их помещали в предварительно охлажденный до -130°C калориметрический блок. Термограммы регистрировали при нагреве по линейному закону со скоростью $8,3(3)\times 10^{-3}^\circ\text{C}/\text{с}$ в температурном диапазоне $-130\dots 0^\circ\text{C}$.

На термограмме ДСК для фракций с молекулярной массой белков до 5 кДа из свежеполученного экстракта плаценты зарегистрирован ряд термических эффектов: 1 – узкий экзотермический пик при температуре $-85,5^\circ\text{C}$ отображает, вероятнее всего, инверсию молекул, имеющих углерод-углеродные связи (для данного эффекта в литературе употребляется термин “обращение конфигурации”, связанный с процессом изомеризации); 2 – узкий интенсивный эндотермический пик соответствует плавлению эвтектических составов при -21°C , представляющих собой механическую смесь кристаллов NaCl и воды; 3 – плавление всей системы.

Замораживание экстрактов и хранение их при -20°C не приводят к значительным изменениям интенсивности инверсии на термограммах. Плавление эвтектики и плавление системы остаются неизменными. Смешение в соотношении 1:1 суспензий как эритроцитов, так и *Saccharomyces cerevisiae* со свежеприготовленными, а также фракциями экстракта, предварительно хранившегося при -20°C в течение 2,5 месяцев, приводит к значительному снижению интенсивности пика инверсии и пика плавления эвтектики. В смесях, возможно, происходит связывание определенной части молекул воды с органическими компонентами фракций экстрактов, и в образовании эвтектических составов вода уже не принимает участия.

Aqueous-saline placental extracts contain almost all the spectrum of biologically active substances, that is why the extracts are widely used in medicine. Moreover, due to the interaction of extract proteins and cells, they can be used as additives in multicomponent protective media during low-temperature preservation. The studies of the effect of separate fractions of the extracts on various biological systems under thermal exposure are relevant, since freeze-thawing is accompanied by a number of physical processes that can cause a certain damage of biosystems. This study deals with the phase transitions in fractions of extracts with a molecular mass of proteins up to 5 kDa, 50–70 kDa and 750 kDa, in suspensions of red blood cells, *Saccharomyces cerevisiae*, and in the mixtures of cell suspensions and fractions of extracts. The experiments were performed with a differential scanning calorimeter, designed and manufactured at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. The samples were cooled by immersion in liquid nitrogen outside the calorimetric block. The cooling rate of the samples was $3.3(3)^\circ\text{C}/\text{s}$, and then they were placed into the calorimetric block pre-cooled down to -130°C . The thermograms were recorded under linear heating with the rate of $8.3(3)\times 10^{-3}^\circ\text{C}/\text{s}$ within the temperature range $-130\dots 0^\circ\text{C}$.

DSC thermograms of the fractions with a molecular mass of proteins up to 5 kDa from fresh placental extract comprised following thermal transitions: 1 – narrow exothermic peak at -85.5°C , that is likely associated with the inversion of molecules possessing carbon-carbon bonds (this effect is described usually with the term ‘configuration conversion’, that is associated with the process of isomerization); 2 – narrow intensive endothermic peak, that corresponds to the melting of the eutectic composition at -21°C , representing a mechanical mixture of NaCl crystals and water, and 3 – melting of the whole system.

Freezing and storage of extracts at -20°C did not lead to the significant changes in the intensity of inversion in the thermograms. Eutectic melting and melting of the system remain unchanged. The 1:1 mixture, both of erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae* suspensions with fresh extracts as well as with the fractions of the extract stored at -20°C for 2.5 months led to a significant reduction in the intensity of the inversion and the eutectic melting peaks. Probably the binding of a certain part of water molecules with organic components of extracts' fractions has been occurred in mixtures and as a result water was not involved into the formation of eutectic compositions.

Влияние ДМСО на поведение нервных клеток новорожденных крыс в условиях культивирования *in vitro* после замораживания-отогрева

Т.Д. Ляшенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

DMSO Effect on Behavior of Nerve Cells of New-Born Rats During *In Vitro* Culturing after Freeze-Thawing

T.D. LYASHENKO

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

Целью исследования явилось изучение действия различных концентраций ДМСО, а также сыворотки крови на сохранение постнатальных нервных клеток (НК) после замораживания-отогрева.

Нервные клетки изолировали из ткани мозга новорожденных крыс. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению 0,4% трипанового синего. Замораживание проводили в концентрации 20×10^6 млн клеток/мл под защитой 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5% ДМСО при наличии и отсутствии 10% сыворотки крыс со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -80°C . Далее клетки переносили в жидкий азот. 2×10^6 млн/мл НК культивировали в среде DMEM/F12 с 10% сыворотки крыс. Клетки окрашивали на β -тубулин III, нестин и виментин.

Замораживание-отогрев НК без ДМСО как при наличии, так и при отсутствии сыворотки приводит к падению жизнеспособности и гибели значительной части клеток. ДМСО предохраняет НК от повреждения в процессе их криоконсервирования, что выражается в увеличении сохранности клеток после отогрева. Максимальная сохранность НК наблюдалась при криоконсервировании их с 5 и 7,5% ДМСО. При этом наличие сыворотки в среде криоконсервирования на сохранность и жизнеспособность НК влияния не оказывало.

Культивирование НК, криоконсервированных с ДМСО при отсутствии сыворотки, а также при наличии сыворотки и 2,5% ДМСО, характеризуется формированием мелких, рыхлых и бесформенных агрегатов, которые к подложке не прикрепляются. При этом к подложке прикрепляется небольшое количество единичных клеток, однако их распластывания не наблюдалось.

Культивирование НК, криоконсервированных при наличии сыворотки и 5; 7,5; 10 и 12,5% ДМСО, приводило к формированию агрегатов, которые прикреплялись, а их клетки мигрировали, дифференцировались и пролиферировали. При этом вначале происходило формирование монослоя клеток глии, затем появлялись β -тубулин-III – положительные клетки с морфологией нейробластов и колонии нестин- и виментин-положительных клеток. Максимальное количество нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток появлялось при культивировании НК, криоконсервированных с 7,5 и 10% ДМСО. При культивировании НК, криоконсервированных с 5 и 12,5% ДМСО, нейробласты и колонии нервных стволовых/прогениторных клеток появлялись позже и количество их было значительно меньшим.

Таким образом, нервные стволовые/прогениторные клетки новорожденных крыс сохраняют способность к пролиферации и дифференциации после замораживания. При этом наилучшие результаты криоконсервирования НК новорожденных крыс достигаются при использовании 7,5 и 10% ДМСО и 10% сыворотки крови.

The research aim was to study the effect of various DMSO concentrations as well as blood serum on the preservation of post-natal nerve cells (NCs) after freeze-thawing.

Nerve cells were isolated from brain tissue of new-born rats. The viability of cells was estimated on the exclusion of 0.4% trypan blue. Freezing was performed for the concentration of 20×10^6 cells/ml under protection of 2.5, 5, 7.5, 10 and 12.5% DMSO in presence or absence of 10% rat blood serum with the rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ down to -80°C . Afterwards the cells were transferred into liquid nitrogen. NCs (2×10^6 cells/ml) were cultured in DMEM/F12 with 10% rat serum. The cells were stained to reveal beta-tubulin III, nestin and vimentin.

Freeze-thawing of NCs without DMSO both in presence and absence of the serum leads to the reduction of viability and death of significant amount of cells. DMSO prevents NCs from the damage during their cryopreservation, which is manifested by the increased viability of cells after thawing. Maximum integrity of NCs was observed after freeze-thawing with 5 or 7.5% DMSO. Herewith the presence of serum in cryopreservation medium had no effect on the integrity and viability of NCs.

Culturing of NCs cryopreserved with DMSO with no serum as well as in its presence and with 2.5% DMSO is characterized by the formation of small, loosen and shapeless aggregates, not adhered to the substrate. Herewith small amount of single cells adhered to the substrate, but their flattening was not observed.

Culturing of NCs cryopreserved in the presence of serum and 5, 7.5, 10 and 12.5% DMSO resulted in the formation of aggregates, which adhered, and their cells migrated, differentiated and proliferated. Herewith, initially the glial cell monolayer was formed, then beta-tubulin positive cells of neuroblast morphology and colonies of nestin and vimentin positive cells appeared. Maximum number of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells appeared during culturing of NCs, frozen-thawed with 7.5 and 10% DMSO. During culturing of NCs frozen-thawed with 5 and 12.5% DMSO neuroblasts and colonies of nerve stem/progenitor cells appeared later and their number was significantly lower.

Thus nerve stem/progenitor cells of newborn rats preserve the ability to proliferation and differentiation after freeze-thawing. Herewith, the highest results of cryopreservation of newborn rat NCs are achieved when using 7.5 or 10% DMSO solutions supplemented with 10% blood serum.

Криоконсервирование как фактор модуляции иммунокорректирующего потенциала клеток фетальной печени

А.Ю. ДИМИТРОВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО, О.В. ЧЕЛОМБИТКО, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation as Modulation Factor for Immune Correcting Potential of Fetal Liver Cells of Different Gestation Terms

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

Применение фетального материала получило широкое распространение в лечении аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) фетальной печени (ФП) благодаря уникальной иммуномодулирующей активности заняли ключевое место в клеточной терапии. Одним из механизмов влияния МСК на иммунные клетки реципиента является синтез фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Криоконсервирование позволяет не только сохранить биообъект, но и перевести его в качественно новое состояние с характерными изменениями на транскрипционном уровне. Известно, что иммуномодулирующая активность клеток ФП (КФП) после воздействия ультранизких температур изменяется и может даже превышать активность нативных клеток. Данные факты обусловили необходимость изучения изменений на молекулярно-генетическом уровне в МСК после процедуры замораживания КФП, что поможет усовершенствовать программы терапевтической аппликации данного материала после криоконсервирования.

Цель исследования – изучение функциональной активности гена *Ido* в КФП разных сроков гестации после криоконсервирования для оценки их терапевтической эффективности при лечении АИЗ.

Объектом исследования были КФП мышей линии СВА/Н. Суспензию клеток получали методом гомогенизации в среде 199 КФП плодов мышей 14 и 18 суток гестации. Криоконсервировали КФП под защитой 10% ДМСО со скоростью замораживания 1°C/мин до –25°C и с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Оттаивание проводили на водяной бане при 37°C. Экспрессию гена *Ido* в общей суспензии КФП, а также в выделенных на магнитном сортере фракциях CD105⁻ и CD105⁺ (МСК) определяли методом ОТ-ПЦР, детекцию продуктов амплификации проводили на биоанализаторе Agilent 2100 (USA).

Установлены отличия содержания транскриптов гена *Ido* в нативных КФП 15 и 18 суток гестации. Фракция CD105⁺ КФП ранних сроков развития характеризовалась значительно большим содержанием мРНК *Ido* по сравнению с общей суспензией КФП, фракцией CD105⁻, а также с фракциями КФП поздних сроков развития. После криоконсервирования наблюдались изменения в активности транскрипции гена *Ido*. Установлен факт повышения экспрессии гена *Ido* в криоконсервированных КФП поздних сроков гестации. Таким образом, криоконсервирование в зависимости от срока гестации может дифференцированно активировать в МСК ФП экспрессию гена *Ido*. Подобные исследования позволят повысить эффективность лечения АИЗ трансплантацией криоконсервированных МСК.

Application of fetal material is widely used for treatment of autoimmune diseases (AID). Fetal liver (FL) mesenchymal stem cells (MSC) play a key role in cell therapy due to their unique immunomodulatory activity. Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) synthesis is one of the possible mechanisms how MSC influence the recipient's immune cells. Cryopreservation allows not only to store biological material but to transfer it in qualitatively new state with typical changes at transcriptional level. It is known that immune modulating activity of FL cells (FLC) changes after the influence of ultralow temperatures and can even exceed the activity of untreated cells. These data have stipulated the necessity to study the molecular-genetic changes in MSCs after the cryopreservation of FLC, that might help to improve the programs for therapeutic application of the given material after its cryopreservation.

The research aim was to study the functional activity of *Ido* gene in FLC of different gestation terms after cryopreservation to estimate their therapeutic efficiency during AID treatment.

The research object were FLC of CBA/H mice. Cell suspension was obtained by homogenization of murine fetuses of the 14th and 18th gestation day in medium 199. FLC were cryopreserved under protection of 10% DMSO in the programmable freezer according to the following program: cooling with the rate of 1°C/min down to –25° with following plunging into liquid nitrogen. Thawing was carried-out at 37°C in water bath. Expression of *Ido* gene in total FLC suspension as well as CD105⁻ and CD105⁺ (MSC) fractions separated by immunomagnetic sorting were examined by RT-PCR method, the amplification products were detected using bioanalyzer Agilent 2100 (USA).

Differences of *Ido* gene transcript content of the 14th and 18th gestation day native FLCs were found. CD105⁺ fraction of FLC of early gestation terms had significantly higher *Ido* mRNA content comparing to total FLC suspension, CD105⁻ fraction and the fraction of FLC of later gestation terms. After cryopreservation the changes in the activity of *Ido* gene transcription were observed. The fact of increased *Ido* expression in cryopreserved FLCs of later gestation terms was established. Thus depending on the gestation term cryopreservation can differentially activate *Ido* gene expression in FL MSC. Such studies will allow the improvement of AID treatment efficiency using cryopreserved MSC transplantation.

Постгипертонический стресс и осмотические свойства замороженных-отогретых эритроцитов

Т.И. ДЕЙНЕКО¹, К.В. МАРКОВА², В.В. РАМАЗАНОВ¹, В.А. БОНДАРЕНКО¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Post-Hypertonic Stress and Osmotic Properties of Frozen-Thawed Erythrocytes

T.I. DEYNEKO¹, K.V. MARKOVA², V.V. RAMAZANOV¹, V.A. BONDARENKO¹

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

²V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

При быстром замораживании-отогреве образцов клеток с высокой концентрацией (погружение в жидкий азот и отогрев на водяной бане при 40°C) значительный вклад в повреждение вносит постгипертонический стресс, которому подвергаются клетки на конечной стадии быстрого отогрева. В связи с этим возникает вопрос поиска подходов повышения устойчивости клеток к данному повреждающему фактору.

В эритроцитах, отмытых после замораживания в среде с декстраном, выявляются значительные изменения осмотических свойств по сравнению с интактными клетками. Наблюдается повышение осмотической устойчивости эритроцитов в гипотонической области концентрации NaCl (0,09–0,4%), которая усиливается при повышении концентрации декстрана в среде замораживания от 5 до 20%. В интервале концентрации NaCl 0,45–0,9% отмечается снижение осмотической устойчивости эритроцитов, которая не зависит от концентрации декстрана в среде замораживания. Кроме того, выявляется значительное снижение содержания глутатиона в клетках после их отмывания от криоконсерванта. Включение в среду замораживания проникающего криопротектора ДМСО в концентрации 5% уменьшает выраженность изменений указанных осмотических свойств и предотвращает потерю барьерной функции мембран для глутатиона.

На основе полученных результатов можно предположить, что образование гипотонической устойчивости замороженных-отогретых эритроцитов при концентрации NaCl 0,09–0,4% связано с концентрированием декстрана при замораживании, тогда как повышение осмотической хрупкости эритроцитов при концентрации NaCl 0,45–0,9% определяется общим повреждающим воздействием при замораживании-отогреве, включая гипертоническое и постгипертоническое воздействия. Включение в криоконсервант ДМСО и поступление его в клетки обеспечивают предупреждение их значительной дегидратации и ослабление повреждающего действия концентрационного градиента декстрана и гипертонического стресса при охлаждении. В результате эритроциты, замороженные в среде с декстраном и ДМСО, по сравнению со средой, содержащей только декстран, являются более устойчивыми к постгипертоническому стрессу при отогреве и сохраняют свои осмотические свойства.

Rapid freeze-thawing of highly concentrated cell samples (plunging into liquid nitrogen and thawing in water bath at 40°C) results in cell damage, which is mainly caused by post-hypertonic stress occurred in the cells during final stage of rapid thawing. In this regard the searching of approaches to increase the cell resistance to this damaging factor appears.

Significant changes of osmotic properties if compared with the intact cells are revealed in erythrocytes washed after freeze-thawing in the medium with dextran. The increasing of erythrocyte osmotic resistance is observed in hypotonic NaCl concentration (0.09–0.4%) with following rise after increasing the dextran concentration in freezing medium from 5 to 20%. Within the range of 0.45–0.9% NaCl concentration the reduction of erythrocyte osmotic resistance is observed, and no dependence on dextran concentration in freezing medium is found. Moreover, a significant reduction of glutathione content in the cells after removing the cryoprotectant is found. Introduction into freezing medium of 5% penetrating cryoprotectant DMSO decreases the intensity of changes in the mentioned osmotic properties and prevents the loss of barrier membrane function in respect of glutathione.

Based on the obtained results we may suggest that formation of hypotonic resistance of frozen-thawed erythrocytes in 0.09–0.4% NaCl concentration range is associated with dextran concentrating during freezing. Whereas the increasing of erythrocyte osmotic fragility in 0.45–0.9% NaCl concentration range is determined by total damaging effect during freeze-thawing, including hypertonic and post-hypertonic effects. Introduction of DMSO into cryopreservative and its entering into the cells provides the prevention of their significant dehydration and weakening of damaging effect of concentration gradient of dextran and hypertonic stress during cooling. Finally, the erythrocytes frozen in the medium with dextran are more resistant to post-hypertonic stress during thawing and preserve their osmotic properties.

Сохранность меристем винограда в процессе низкотемпературного консервирования

Ю.С. ЛЫСАК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Grape Meristems During Low-Temperature Preservation

YU.S. LYSAK

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

Данное исследование направлено на разработку методов низкотемпературного консервирования меристем винограда с использованием быстрых режимов замораживания и витрифицирующих криозащитных сред на основе криопротекторов ряда диолов, полиолов и их смесей.

Для исследования токсического действия криопротекторов на меристемы их помещали в растворы криопротекторов на 30 мин, затем отмывали путем 2-кратной смены среды 1/2 MS в течение 40 мин. Сохранность меристем винограда оценивали на 5-й день культивирования путем подсчета количества живых меристем к общему их количеству.

Исследовали следующие криозащитные среды: 1 M раствор 1,2-пропандиола (1,2-ПД) на среде 1/2 MS; 7%-й раствор поливинилпирролидона (ПВП) с молекулярной массой 24000 на среде 1/2 MS; раствор 1,2-ПД в концентрации 1 M и ПВП в концентрации 3,5% на среде 1/2 MS; раствор 1,2-ПД в концентрации 1 M и ПВП в концентрации 7% на среде 1/2 MS; раствор этиленгликоля в концентрации 1 M и ПВП в концентрации 3,5% на среде 1/2 MS.

Криоконсервирование осуществляли следующим способом: меристемы в течение 30 мин насыщали криопротекторами, далее помещали их в пленочные тонкостенные контейнеры, изготовленные на основе фторопласта, и замораживали прямым погружением в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане с температурой воды 35°C в течение 5–10 с. После отогрева меристемы отмывали от криопротекторов, помещали на среду 1/2 MS и выдерживали в темноте в течение 24 ч. Затем их переносили в фитотрон для дальнейшего культивирования, на 5-й день определяли сохранность. Живыми считались меристемы, проявляющие тенденцию к росту и приобретающие зеленую окраску.

Из исследованных криопротекторов наиболее эффективным и наименее токсичным оказался 1,2 ПД (90% сохранности), тогда как применение ПВП дало 55% сохранных меристем на этапе экспозиции. После замораживания-отогрева сохранность меристем для 1,2-ПД и ПВП составила 45 и 10% соответственно. При использовании смесей криопротекторов в криозащитных средах наиболее эффективной оказалась комбинация 1 M раствора 1,2 ПД и 7% раствора ПВП (сохранность меристем после размораживания составила 80%).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что использование смесей криопротекторов в криозащитных средах для замораживания меристем винограда является более эффективным по сравнению с применением отдельных криопротекторов.

This research is directed to development of low-temperature preservation methods of grape meristems using rapid regimens of freezing and cryoprotective vitrifying media based on cryoprotectants of diol and polyol series and their mixtures.

In order to study the cryoprotectant toxic effect on meristems they were placed into cryoprotectant solutions for 30 min, then washed by 2-fold change of medium 1/2 MS during 40 min. Survival of grape meristems was evaluated to the 5th day of culturing by calculation of a number of vital meristems in relation to their total number.

We studied the following cryoprotective media: 1 M solution of 1,2-propane diol (1,2-PD) in the medium 1/2 MS; 7% polyvinyl pyrrolidone (PVP) of 24,000 molecular mass in the medium 1/2 MS; solution of 1 M 1,2-PD and 3.5% PVP in the medium 1/2 MS; solution of 1 M 1,2-PD and 7% PVP in the medium 1/2 MS; ethylene glycol of 1 M concentration and 3.5% PVP in the medium 1/2 MS.

Cryopreservation was performed by the following method: meristems were saturated with cryoprotectants during 30 min, then placed into plastic thin-walled containers made of fluoroplasts, and frozen by direct plunging into liquid nitrogen. The thawing was carried-out in water bath under temperature of 35°C during 5–10 sec. After thawing the meristems were washed to remove cryoprotectants, placed into the medium 1/2 MS and kept in the darkness for 24 hrs. Then they were transferred into phytotron for further culturing and by the 5th day the survival was assessed. Meristems manifesting tendency to growth and colored green were considered as viable ones.

Among the investigated cryoprotectants the most effective and the least toxic was 1,2-PD (90% survival), whereas the application of PVP resulted in 55% survival after exposure stage. After freeze-thawing the survival of meristems in the cases with 1,2-PD and PVP made 45 and 10%, accordingly. When using mixed cryoprotective media the most effective was the combination of 1 M 1,2-PD and 7% PVP (survival of meristems after freeze-thawing was 80%).

The results of performed researches testify to the fact that the using of cryoprotectant mixtures in cryoprotective media for freezing of grape meristems is more effective if compared with application of single cryoprotectants.

Влияние криоконсервирования на формирование j-агрегатов в клетках коры надпочечников крыс

Т.А. Юрчук¹, Г.А. Божок², И.А. Боровой³, Т.М. Гурина², Т.П. Бондаренко²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

³Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Formation of J-Aggregates in Rat Adrenal Cortex Cell

T.A. YURCHUK¹, G.A. BOZHOK², I.A. BOROVY³, T.M. GURINA², T.P. BONDARENKO²

¹V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

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

³Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine

Одним из способов коррекции гипокортицизма является трансплантация клеток коры надпочечников (ККН), а криоконсервирование решает вопрос хранения биологического материала. Однако остается проблема сохранения гормон-продуцирующей активности ККН. Для обеспечения этой функции необходимо наличие электрохимического градиента (ЭХГ) на митохондриях ККН. ЭХГ можно оценить, используя катионный флуоресцентный краситель JC-1.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования в криозащитных средах с различным содержанием ДМСО и эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) на ЭХГ митохондрий ККН крыс с помощью флуоресцентного красителя JC-1.

Клетки коры надпочечников получали ферментативным способом из коры надпочечников половозрелых крыс. Для получения криозащитных сред использовали концентрации ДМСО 5; 7; 10 и 15%. Часть сред, кроме ДМСО, содержала добавку в виде 25% ЭТС. Токсичность различных концентраций криопротектора определяли путем оценки жизнеспособности и сохранности ККН после 30 мин инкубации в криозащитных средах. Показатели жизнеспособности во всех пробах колебались в среднем от 70 до 80%, а сохранность оставалась на уровне контроля в пробах с концентрацией 7 и 10% ДМСО с ЭТС и в 10% ДМСО без ЭТС ($p < 0,05$). Эти показатели оценивали также после отогрева и установили, что жизнеспособность ККН после криоконсервирования с 7 и 10% ДМСО с ЭТС составила 70%, тогда как с этими же концентрациями ДМСО, но без ЭТС в криозащитных средах – 50% ($p < 0,05$). Самая высокая сохранность наблюдалась в суспензии, криоконсервированной с 7% ДМСО и ЭТС (80%).

После размораживания клетки садили на планшет с коллагеновой подложкой и культивировали в течение суток при 37°C и 5% CO₂. После этого клетки окрашивали JC-1, отмывали, подсчитывали количество клеток, содержащих j-агрегаты. Клетки, криоконсервированные в криозащитной среде с 7% ДМСО, содержали наибольшее количество j-агрегатов – 40%, а с концентрациями ДМСО 5; 10 и 15% их количество колебалось в пределах 10–20% по сравнению с 5% в нативной суспензии. Количество j-агрегатов в клетках, криоконсервированных в средах с комбинацией ДМСО/ЭТС, не отличалось от нативной суспензии.

Таким образом, в ККН, криоконсервированных в криозащитной среде только с ДМСО, после отогрева формируется больше j-агрегатов по сравнению с клетками, криоконсервированными в средах с комбинацией ДМСО/ЭТС.

The transplantation of adrenal cortex cells (ACC) is one of efficient approaches in hypocorticism treatment, and cryopreservation solves the problem of storage of biological materials. However, there have been remained the problems of preserving hormone-producing activity in ACC. Providing of this function requires the electrochemical gradient (ECG) on ACC mitochondria. ECG can be estimated by using the cationic fluorescent dye JC-1.

The research aim was to study the effect of cryopreservation with the cryoprotective media with various DMSO concentrations and fetal calf serum (FCS) on rat ACC mitochondria ECG by fluorescent dye JC-1.

Adrenal cortex cells were obtained by enzymatic method from the adrenal cortex of adult rats. We used several concentrations of DMSO (5, 7, 10 and 15%) to obtain the cryoprotective media. The part of the media were supplemented with 25% FCS. The toxicity of different concentrations of cryoprotectants was determined by assessing the viability and survival of ACC 30 min later the incubation in cryoprotective media. The viability in all the samples ranged from 70 to 80%, and the survival remained at the control level in the samples with 7 and 10% DMSO solutions supplemented with FCS and in 10% DMSO solutions without FCS ($p < 0.05$). These indices were also evaluated after thawing and there was found that the viability of ACC after cryopreservation in 7 and 10% DMSO solutions supplemented with FCS was 70%, whereas with the same concentrations of DMSO, but without FCS in the cryoprotective media it made 50% ($p < 0.05$). The highest survival was observed in the cell suspension cryopreserved with 7% DMSO and FCS and made 80%.

Cells were placed in the plate with the collagen substrate after thawing and cultured overnight at 37°C and 5% CO₂. Afterwards they were stained with JC-1, washed, the amount of cells containing j-aggregates was counted. The cells, frozen-thawed in cryoprotective medium with 7% DMSO, contained the highest number of j-aggregates (40%), with concentrations of DMSO 5; 10 and 15% their number varied between 10–20% if compared to 5% in native suspension. The number of j-aggregates did not differ from the native suspension in the cells frozen-thawed with DMSO/FCS combination.

Thus, ACC frozen-thawed in cryoprotective medium with solely DMSO contained more j-aggregates after thawing if compared with the cells frozen-thawed in the media with a combination of DMSO/FCS.

Сохранность клеток микроорганизмов после иммобилизации в различных гелях с последующим замораживанием до -70°C

Т.В. ДОРОФЕЕВА, О.В. ПИШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Microorganisms' Cells after Immobilization in Different Gels with Following Freezing Down to -70°C

T.V. DOROFEEVA, O.V. PISHKO

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

В связи с развитием современных биотехнологических производств возрос интерес к проблеме иммобилизации клеток микроорганизмов. Иммобилизованные клетки микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ имеют ряд преимуществ в технологических процессах перед свободными клетками – более высокую продуктивность, экономичность, биологическую безопасность, чистоту конечного продукта и др. Предполагается, что рядом преимуществ будут обладать и медицинские препараты иммобилизованных микроорганизмов. В зависимости от задач применяют три вида иммобилизации клеток микроорганизмов – на поверхности носителей, изоляция биологическими мембранами, в материале носителя. Последний способ иммобилизации, на наш взгляд, может представлять интерес и с точки зрения повышения сохранности микробных клеток в процессе хранения при различных температурах.

Цель работы – изучение сохранности микроорганизмов-эубиотиков после иммобилизации в различные гели и кратковременного замораживания до -70°C в этих гелях.

Объектом исследования были микроорганизмы *Saccharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*, вегетативные формы *Bacillus subtilis*. Микроорганизмы включали в гели альгината кальция, каррагинана, агарозы, в предварительно полимеризованный линейный полиакриламид. Иммобилизацию клеток проводили в соответствии с методиками, описанными в руководстве под редакцией J. Woodward (1988). Клетки, иммобилизованные в блоках гелей объемом 5 мл, замораживали в пенициллиновых флаконах в парах азота при -70°C . Через 3-е суток отогревали на водяной бане при 37°C . Жизнеспособность микроорганизмов определяли по способности к колониеобразованию.

Было установлено, что иммобилизация в гелях альгината кальция, каррагинана и агарозы не приводит к гибели микробных клеток. Иммобилизация в полиакриламидном геле приводит к достоверной гибели части клеток. При замораживании до -70°C наиболее низкая выживаемость была также в образцах с полиакриламидным гелем.

Due to the development of contemporary biotechnological technologies the interest to the problem of microorganism cell immobilization has increased. Immobilized cells of microorganism-producers of biologically active substances have some advantages in technological processes if compared with 'free' cells, *i.e.* they are of higher productivity, cost effectiveness, biological safety, purity of final product *etc.* It is supposed that some advantages will be inherent to medical preparations of immobilized microorganisms. Depending on the tasks there are applied three types of microorganism cell immobilization: on a surface of carriers; isolation by biological membranes; on the carrier material. The latter, from our point of view, may be of interest as for increasing the integrity of microbial cells during storage at different temperatures.

The research aim was to study the integrity of microorganisms-eubiotics after immobilization into different gels and short-term freezing down to -70°C in these gels.

The research objects were microorganisms *Saccharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* and vegetative forms of *Bacillus subtilis*. The microorganisms were introduced into gels of calcium alginate, carrageenan, agarose, into preliminary polymerized linear polyacrylamide. The cells were immobilized in the accordance with the methods described in the guidance edited by J. Woodward (1988). The cells immobilized in 5 ml gel blocks were frozen in penicillin flasks by placing into nitrogen vapors at -70°C . In 3 days they were thawed on water bath at 37°C . Viability of microorganisms was examined on the ability to colony formation.

It has been established that immobilization in gels of calcium alginate, carrageenan and agarose does not lead to the death of microbial cells. Immobilization in polyacrylamide gel results in significant death of the part of cells. During freezing down to -70°C the lowest survival was also in the samples with polyacrylamide gel.

Подбор условий культивирования клеток надпочечников взрослых крыс

Г.В. ДУДЕЦКАЯ, Г.А. БОЖОК, Т.П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Selection of Culturing Conditions for Cells of Adult Rat Adrenal Glands

G.V. DUDETSKAYA, G.A. BOZHOK, T.P. BONDARENKO

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

Культивирование является одним из способов оценки жизнеспособности и функциональной активности как нативных, так и криоконсервированных клеток. Поэтому подбор оптимальных условий культивирования для нативных клеток является целесообразным.

Цель работы – сравнить эффективность использования различных подложек (покровное стекло, пластик или коллаген тип I) и сред культивирования различного состава. Суспензии клеток получали из надпочечников взрослых крыс. Жизнеспособность суспензии составила 90%. Средами для культивирования были: среда 199+5% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) (среда 1), среда 199+5% ЭТС+ФРН (фактор роста нервов) (среда 2), среда 199+10% ЭТС (среда 3), среда 199+15% ЭТС (среда 4).

При культивировании клеток на покровных стеклах состав среды не имел решающего значения, так как клетки не прикреплялись к стеклу и оставались в суспензии. В насадке при окрашивании трипановым синим определялись как жизнеспособные, так и мертвые клетки. При использовании пластиковой подложки и всех сред на 3-и сутки прикреплялось 70% клеток. Клетки были разных размеров, распределены по всей поверхности, имели округлую форму, подобную нативной суспензии, наблюдались агрегаты клеток. На 7-е сутки количество клеток сохранялось, также наблюдалось небольшое количество распластанных клеток. Однако уже на 11-е сутки при применении сред 1, 2 и 3 количество клеток значительно снизилось. В образцах, где была использована среда 4, клетки сохранялись прикрепленными и распластанными, тем не менее склонность к образованию монослоя не отмечалась. К 14-м суткам культивирования во всех образцах прослеживалась деградация клеток. Применение чашек Петри, покрытых коллагеном, показало, что на 3-и сутки культивирования было прикреплено 90% клеток при использовании всех сред культивирования. Липидо-содержащие клетки распределялись по всей поверхности, большая часть из них распластывалась. Также были клетки округлой и фибробластоподобной формы. К 7-м суткам культивирования в средах 2 и 4 местами наблюдалась тенденция к образованию монослоя. На 11-е сутки культивирования при использовании среды 1 клетки вновь стали округляться и их количество уменьшилось. При применении сред 2, 3 и 4 клетки образовывали небольшие участки монослоя. На 14-е сутки при использовании среды 1 на поверхности подложки сохранялись единичные клетки. При культивировании в среде 3 наряду с распластыванием у части клеток культуры наблюдались явления деградации. Применение сред 2 и 4 позволило получить наибольшее количество прикрепленных и распластанных клеток, а также сохранить участки монослоя. Установлено, что из 4-х апробированных вариантов сред наиболее эффективными оказались среды 2 и 4 в сочетании с коллагеновой подложкой, которые способствовали переживанию клеток в культуре до 14 суток.

Culturing is one of the ways to assess the viability and functional activity of both native and cryopreserved cells. Therefore the selection of optimal culturing conditions for native cells is an expedient one.

The research aim was to compare the efficiency of the use of different substrates (cover glass, plastic or collagen type I) and culturing media of different composition. Cell suspension was derived from adult rat adrenal glands. Viability of the suspension was 90%. The media for culturing were as follows: medium 199 + 5% FCS (fetal calf serum) (medium 1), medium 199 + 5% FCS + NGF (nerve growth factor) (medium 2), medium 199 + 10% FCS (medium 3), medium 199 + 15% FCS (medium 4).

During cell culturing on cover glasses the medium composition had no decisive value, since the cells did not adhere to glass and remained in the suspension. When staining with trypan blue there were found both viable and dead cells in the supernatant. To the 3rd day 70% of cells were adhered when using plastic embedding in all the media. The cells were of different dimensions, distributed over the whole surface, were of round shape, similar to native suspension, there were observed cell aggregates. To the 7th day the number of cells was the same, and there was found a small amount of flattened cells too. However, to the 11th day when using the media 1, 2 and 3 the number of cells was significantly reduced. In the samples where the medium 4 was used the cells remained adhered and flattened, nevertheless, no tendency to monolayer formation was noted. To the 14th culturing day in all the samples there was observed the cell degradation. Use of Petri dishes coated with collagen has shown that to the 3rd day of culturing 90% of cells were adhered with applying all culturing media. Lipid-containing cells were distributed over the whole surface, the most of them was flattened. In addition there were the cells of round and fibroblast-like shapes. To the 7th culturing day when using the media 2 and 4 in some regions we observed the tendency of monolayer formation. To the 11th culturing day when using the medium 1 the cells again became round and their number decreased. When using media 2, 3 and 4 the cells formed small sites of monolayer. To the 14th day when using the medium 1 only single cells were preserved on the surface of the substrate. When using the medium 3 the cases of degradation were found along with flattening of the part of the culture cells. The using of media 2 and 4 allowed the obtaining of the highest amount of adhered and flattened cells, as well as preservation of monolayer sites. It has been established that among 4 tested variants of the media the most effective occurred to be the media 2 and 4 in combination with collagen embedding, contributing to the survival of cells in the culture up to 14 days.

Спектрофлуориметрические характеристики экстрактов сердца животных

Л.А. РОГОЗА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Spectrofluorimetric Characteristics of Animal Heart Extracts

L.A. ROGOZA

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

Существуют убедительные клинические данные, подтверждающие наличие в волокнах Пуркинье, пучке Гиса, перегородке, предсердиях, желудочках районирования интенсивности (неравномерности) ревитализации, управляемого специфическими пептидами. Пептидные биорегуляторы также могут быть ростовыми дифференцирующими факторами как для стволовых, так и соматических клеток.

В настоящее время установлена специфичность процессов образования таких пептидов в органах и тканях, а также уникальность органоспецифического набора пептидов, получаемого *in vivo* (в норме и, возможно, при соответствующих патологических состояниях).

Цель работы – изучить спектрофлуориметрические характеристики экстрактов замороженных-отогретых фрагментов сердца половозрелых свиней и новорожденных поросят, а также фрагментов сердца молодых и взрослых крыс.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2007 г.) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 1986 г.).

Экстракт получали из криоконсервированных фрагментов сердца свиней и поросят и фрагментов сердца крыс путем их инкубирования в физиологическом растворе 60 мин. Полученные экстракты фильтровали и освобождали от термоллабильных белков. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Австралия).

Спектры флуоресценции экстрактов находятся в области 290–450 нм. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм максимум спектров флуоресценции находится в области 340–354 нм, что может свидетельствовать о наличии в экстрактах доступных растворителю или находящихся в свободном состоянии остатков триптофана.

Наблюдаемые отличия в спектрах флуоресценции экстрактов свидетельствуют о том, что их состав зависит от источника получения, и они включают в себя пептиды, различающиеся как по своему количественному соотношению, так и по аминокислотному составу.

Получены также синхронные спектры экстрактов, которые могут быть использованы для идентификации и стандартизации экстрактов при изучении их биологической активности.

There are the clinical data that Purkinje fibers, bundle of His, interseptum, atria, ventricles possess zoning of intensity (non-uniformity) of revitalization, controlled by specific peptides. Peptide bioregulators also may be growth differentiation factors for both stem and somatic cells.

Noadays the specificity of the formation processes of these peptides in organs and tissues is established as well as the fact that the obtained *in vivo* set of molecules represents a unique organ specific (in the norm and likely in corresponding pathological states) peptide complex.

The research aim was to study spectrofluorimetric characteristics of extracts of frozen-thawed heart fragments of adult pigs and new-born piglets, as well as those of young and adult rats.

The experiments were carried-out in accordance with General principles of the experiments in animals, approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2007) and coordinated with the statements of European convention on the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Strasbourg, 1986).

The extract was derived from frozen-thawed fragments of pig and piglet hearts, as well as from rat hearts by means of incubation in physiological solution during 60 min. The obtained extracts were filtered and created from thermolabile proteins. Fluorescence spectra were measured with spectrofluorimeter Varian Cary Eclipse (Australia).

Fluorescence spectra of extracts are within the range of 290–450 nm. At light excitation with 280 nm wave length the maximum of fluorescence spectra are within the range of 340–354 nm, testifying to the presence of available for solvent or being in a free state tryptophan residues in the extracts.

The observed differences in fluorescence spectra of extracts testify to the fact that their composition depends on the origin and they comprise peptides, varying both in the quantitative ratio and amino acid composition.

There were also obtained synchronous spectra of the extracts, which may be used for identification and standardizing the extracts when investigating their biological activity.

Экспрессия β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят

О.С. СИДОРЕНКО, Г.А. БОЖОК, Е.И. ЛЕГАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Expression of Beta-III Tubulin in Newborn Piglet Adrenal Cell Culture

O.S. SIDORENKO, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH

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

В последнее время все больше внимания уделяется недифференцированным клеткам мозгового вещества надпочечников и рассматривается возможность их использования в регенеративной медицине. Вместе с симпатическими нейронами они являются производными клеток нервного гребня, относящимися к симпатoadrenal-линии, то есть имеют общего предшественника. Развитие клетки-предшественника по эндокринному или нейрональному пути определяется набором специфических факторов, выделяемых клетками микроокружения. Методика обогащения культуры такими мультипотентными клетками включает в себя формирование сферических колоний клеток (хромосфер) в условиях, препятствующих их адгезии к поверхности культивирования. Из клеток медуллы надпочечников быка были получены хромосферы, клетки которых дифференцировались в нейроны под действием NGF.

Цель работы – получение сферических структур (хромосфер) и исследование экспрессии β -III тубулина в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят.

Клетки, полученные из надпочечных желез ферментативным методом, культивировали в среде 199 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из крупных фибробластоподобных клеток, на котором в дальнейшем формировались сфероподобные структуры. Затем часть клеток культивировали в среде с добавлением фактора роста нервов (NGF), остальные – в среде без NGF, и исследовали экспрессию β -III тубулина в обоих случаях.

При культивировании сферические колонии увеличивались в размере, из них выселялись клетки нейроноподобной морфологии. Местами такие клетки образовывали цепочки, соединенные тяжами, формируя сеть на монослое из фибробластоподобных клеток. Иммуноцитохимическое окрашивание выявило экспрессию β -III тубулина в соме и отростках клеток, выселяющихся из сферических колоний. При этом фибробластоподобные клетки, формирующие монослой, не экспрессировали β -III тубулин. Экспрессия β -III тубулина наблюдалась в культурах, выращенных как в среде с NGF, так и без него.

Таким образом, в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят на монослое из фибробластоподобных клеток формируются сферические клеточные колонии. В дальнейшем из них выселяются клетки нейроноподобной структуры, экспрессирующие β -III тубулин. Экспрессия β -III тубулина не зависит от присутствия NGF в среде культивирования.

Nowadays more and more attention has been paid to non-differentiated cells of adrenal medulla and the possibility of their application in regenerative medicine has been considered. Along with sympathetic neurons they are derivatives of the cells of neural crest referred to sympathoadrenal line, *i. e.* have the common progenitor. The development of progenitor cell according to endocrine or neuronal lineage is determined by the set of specific factors, released by the microenvironment cells. The methods of enriching the culture with these multipotent cells comprise the formation of spherical cell colonies (chromospheres) under the conditions preventing their adhesion to the culturing surface. From the cells of bovine adrenal medulla there were obtained chromospheres, the cells which differentiated into neurons under NGF effect.

The research aim was to obtain spherical structures (chromospheres) and investigate the expression of beta-III tubulin in culture of newborn piglet adrenal cells.

The cells obtained from adrenal glands by enzyme method were cultured in medium 199 with 10% fetal calf serum. To the 3–4th day there was formed the monolayer consisting of large fibroblast-like cells, on which later the sphere-like structures appeared. Then a part of cells was cultured in the medium supplemented with the nerve growth factor (NGF) and the rest of them were cultured without NGF and there was examined the expression of beta-III tubulin in both cases.

During culturing the spherical colonies increased, and the cells of neuron-like morphology migrated from them. Somewhere these cells formed the chains, connected with the bundles, forming the net on monolayer of fibroblast-like cells. Immune cytochemical staining revealed the expression of beta-III tubulin in the soma and processes of cells, migrated from spherical colonies. Herewith the fibroblast-like cells forming monolayer did not express beta-III tubulin. The expression of beta-III tubulin was observed in the cultures grown both in the medium with NGF and without it.

Consequently, spherical cell colonies are formed in adrenal cell culture of newborn piglets on the monolayer of fibroblast-like cells. Thereafter the cells of neuron-like structure migrate from them, and express beta-III tubulin. Expression of beta-III tubulin does not depend on the presence of NGF in culture medium.

Применение физических факторов при создании девитализированных сосудистых скаффолдов

Д.В. БЫЗОВ, Б.П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Physical Factors when Designing Devitalized Vascular Scaffolds

D.V. BYZOV, B.P. SANDOMIRSKIY

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

Существующие методы протезирования артерий малого диаметра ($d \approx 6$ мм) имеют ряд существенных недостатков. Количество аутологичных сосудистых протезов ограничено, их выделение увеличивает длительность и травматичность оперативного вмешательства. Аллогенные протезы склонны к отторжению и тромбозам. Синтетические графты непригодны для такого рода протезирования. Технологии создания биологических протезов на основе ксеногенных сосудов до настоящего времени не эффективны.

Концепция данного исследования базируется на использовании низких температур и ионизирующего облучения с целью девитализации ксеногенных артерий при сохранении их прочностных характеристик.

Объектом исследования служили внутригрудные артерии половозрелых свиней, выделенные при соблюдении биоэтических правил. Заготовленные сосуды подвергали охлаждению до -196°C и последующему ионизирующему облучению в дозах, обеспечивающих стерилизацию образцов. Ультроструктуру артерий изучали с помощью оптической и электронной микроскопии. Механические параметры сосудов исследовали путем определения пластичности артериальной стенки. Также проводились гистологические исследования сосудистых скаффолдов после ксеногенной трансплантации под кожу и в системный кровоток в качестве протеза брюшной аорты.

Замораживание до -196°C и последующее отогревание артерий свиньи приводили к очаговой десквамации эндотелия. При этом коллагеновые и эластические волокна сосудистой стенки не имели грубых структурных нарушений. После облучения выявлены глубокие деструктивные изменения всех клеточных компонентов сосудистой стенки. В структуре медиа эластические и коллагеновые волокна в основном сохранялись. Имплантация под кожу крысам артерий после замораживания продемонстрировала снижение выраженности иммунного ответа на ксеноткань. Не отмечено каких-либо реакций иммунного воспаления на артерии после замораживания и облучения на всех сроках наблюдения. К 8-й неделе выявлено равномерное заселение импланта фибробластами реципиента. При имплантации в системный кровоток показано адекватное функционирование девитализированных артерий в течение 5 месяцев.

Применение низких температур в сочетании с ионизирующим облучением позволяет сохранить соединительнотканную структуру нативных артерий, воздействуя на основные носители иммуногенности – клетки. Предлагаемый метод девитализации позволяет создать полноценно функционирующие биологические сосудистые протезы и может быть альтернативой при выборе графтов для протезирования артерий малого диаметра, в том числе аортокоронарного шунтирования.

Existing methods of prosthesis of small diameter ($d \approx 6$ mm) arteries have certain short-comings. The number of autological vascular prostheses is limited, their isolation prolongs the duration and traumaticity of surgery. Allogeneic prostheses are inclined to rejections and thrombosis. Synthetic grafts are not suitable for such prosthesis. The technologies of designing the biological prostheses based on xenogeneic vessels have not been effective till now.

This research conceptual design is based on the use of low temperatures and ionizing irradiation aimed at devitalization of xenogeneic arteries preserving their strength parameters.

The research objects were intrathoracic arteries of mature pigs, isolated with meeting of the bioethical rules. The procured vessels were frozen down to -196°C and then were subjected to ionizing irradiation in the doses, providing sterilization of the samples. Ultrastructure of arteries were studied by means of optical and electron microcopies. Mechanical parameters of vessels were investigated by determining the plasticity of arterial wall. As well there were carried-out histological studies of vascular scaffolds after xenogeneic transplantation under the skin and into system blood flow as the prosthesis of abdominal aorta.

Freezing down to -196°C and following thawing of pig arteries led to a focal desquamation of endothelium. Here-with collagen and elastic fibers of vascular wall had no strong structural impairments. Structure of arteries after irradiation was characterized with deep destructive changes in cell components of vascular wall. In the structure of media the elastic and collagen fibers were basically kept. The implantation of arteries under the rat skin after freeze-thawing demonstrated the reduced manifestation of immune response to the xenotissue. No immune inflammation reactions to arteries after freezing and irradiation at all the observation terms were found. To the 8th week there was revealed an even population of the implant with fibroblasts of a recipient. During implantation into system blood flow an adequate functioning of devitalized arteries during 5 months was shown.

The application of low temperatures in combination with ionizing irradiation enables the preservation of connective-tissue structure of native arteries affecting the main carriers of immunogeneity, the cells. The proposed method of devitalization allows the creation of integrally functioning biological vascular prostheses and may be an alternative when selecting the grafts for prostheses of small diameter arteries, including the coronary artery by-pass.

Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на функциональную активность нейтрофилов донорской крови, подвергнутых гипотермическому хранению

О.Л. ГОРИНА, Н.Н. МОИСЕЕВА, А.К. ГУЛЕВСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Cord Blood Low-Molecular Fraction on Functional Activity of Human Blood Neutrophils after Hypothermic Storage

O.L. GORINA, N.N. MOISEYEVA, A.K. GULEVSKY

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

Хранение лейкоцитов в условиях гипотермии (4°C) является одним из доступных и простых методов для широкого применения в трансфузиологии. Накопленный опыт свидетельствует о том, что функциональная активность лейкоцитов в условиях положительных температур сохраняется лишь до 24 ч. Такой непродолжительный срок хранения обусловлен быстрым истощением энергетического потенциала нейтрофилов, что, в свою очередь, проявляется в ингибировании их основной функции (способности к хемотаксису и фагоцитозу), снижающей эффективность использования концентратов лейкоцитов в медицинской практике.

Цель работы – изучить влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота (ФКК) и препарата сравнения Актовегина на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов лейкоцитарной массы после гипотермического хранения в течение 24 ч.

Установлено, что практически все изучаемые показатели фагоцитарной активности нейтрофилов, подвергнутых гипотермическому хранению, достоверно ($p < 0,05$) снижаются по сравнению с анализируемыми показателями нативных клеток, что согласуется с данными литературы. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что инкубация лейкоцитов с ФКК в течение 45 мин повышала показатель фагоцитарного числа (ФЧ) нейтрофилов после гипотермического хранения в 1,7 раза по сравнению с контролем. Коэффициент завершенности фагоцитоза (КФЧ) нейтрофилов после инкубации с ФКК в оптимальной концентрации увеличивался в 1,8 раза. Инкубация лейкоцитов с Актовегином также стимулировала поглотительную (ФЧ) и переваривающую (КФЧ) способность фагоцитов, но в значительно большей концентрации препарата по сравнению с ФКК. Исследование влияния ФКК и Актовегина на количество фагоцитирующих нейтрофилов не выявило достоверных ($p < 0,05$) изменений данного показателя. Установлено, что после гипотермического хранения лейкоцитов показатель НСТ-теста достоверно ($p < 0,05$) не отличался от соответствующего показателя нативных клеток. Однако количество НСТ-положительных нейтрофилов после инкубации лейкоцитарной массы с ФКК достоверно ($p < 0,05$) превышало значение в контроле. При внесении в среду инкубации Актовегина достоверного ($p < 0,05$) повышения исследуемого показателя не отмечено.

Таким образом, полученные результаты обосновывают перспективу включения низкомолекулярной фракции кордовой крови и Актовегина в состав восстанавливающих сред после гипотермического хранения лейкоцитов для повышения их функциональной активности.

Storage of leukocytes under hypothermia (4°C) is an affordable and simple method for wide application in transfusiology. The gained experience attests to the fact that functional activity of leukocytes at positive temperature remains unchanged only for 24 hrs. Such a short-term storage is attributed to rapid depletion of neutrophil energy potential, which, in its turn, shows as inhibition of their principal functions (capacity for chemotaxis and phagocytosis) reducing the efficiency of usage of leukocyte concentrates in medicine.

The research aim was the investigation of the influence of the cattle cord blood low-molecular (below 5 kDa) fraction (CBF) and the comparator agent Actovegin on phagocytic and metabolic activities of neutrophils after 24-hour hypothermic storage of white-cell-rich suspension.

We ascertained all the studied indices of neutrophil phagocytic activity after hypothermic storage significantly ($p < 0.05$) decreased as compared to the indices of native cells, conforming to the results of other researchers. We observed the 1.7-fold increase in phagocytic number (PN) of neutrophils induced by 45-min incubation of leukocytes with CBF after hypothermic storage in comparison with the control. The index of phagocytosis completeness (IPC) of neutrophils after incubation with CBF at the optimal concentration was 1.8-fold risen. Actovegin also simulated engulfing (PN) and digesting (IPC) capacities of phagocytes, but it was required at a much higher concentration. Studies of the effect of SBF and Actovegin on the number of phagocytosing neutrophils did not reveal statistically significant ($p < 0.05$) changes of this index.

After hypothermic storage the number of NBT-positive neutrophils did not differ significantly ($p < 0.05$) from that of native cells. However, the number of NBT-positive neutrophils after incubation of white-cell-rich suspension with CBF significantly ($p < 0.05$) exceeded the control value. Actovegin had no significant ($p < 0.05$) effect on this parameter.

Thus the data obtained substantiate the prospect of introduction of the cord blood low-molecular fraction and Actovegin in rehabilitating media for leukocytes after hypothermic storage for the purpose of enhancing their functional activity.

Сравнительное изучение терапевтического действия нативных и криоконсервированных пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, при экспериментальном дисбиозе

О.М. БАБИНЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Studying of Therapeutical Effect of Native and Cryopreserved Probiotics Immobilized on Enterosorbents During Experimental Dysbiosis

O.M. BABINETS

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

В современной медицинской практике значительное внимание уделяют коррекции микробиоты при дисбиозах с помощью пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков и энтеросорбентов. Одним из осложнений дисбиоза кишечника является транслокация кишечной микрофлоры во внутренние органы. В этом случае дополнительно назначают антибиотикотерапию и антисептические мероприятия.

В ИПКиК НАН Украины проводятся исследования по созданию экспериментальных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах. Эффективным методом их долгосрочного хранения является криоконсервирование.

Целью исследования являлось сравнительное изучение восстановления кишечной микрофлоры и эрадикации внутренних органов у животных с экспериментальным дисбиозом, осложненным транслокацией кишечной микрофлоры, после курса терапии нативными и криоконсервированными иммобилизованными пробиотиками (ИП).

Эксперименты проводили на белых лабораторных крысах. Дисбиоз кишечника воспроизводили пероральным введением 15 мг ампициллина и 10 мг метронидазола. В качестве ИП использовали *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum*, иммобилизованные на энтеросорбентах Сорбекс и СУМС-1. Криоконсервировали ИП через 30 мин после начала адсорбции. В группах сравнения вводили свободные пробиотики, энтеросорбенты и смеси энтеросорбентов и пробиотиков.

Установлено, что пристеночная микрофлора толстого кишечника наиболее быстро и в полном объеме восстанавливается после приема ИП. Достоверные различия в терапевтическом эффекте нативных и криоконсервированных ИП не установлены. Положительным моментом являлось то, что *S. boulardii*, который является транзитным микроорганизмом ЖКТ, после приема ИП выделяли из кишечника животных в течение 7–10 суток, а в группах сравнения – в течение 2–5 суток.

Эрадикация кишечной микрофлоры из печени, селезенки и мезентериальных лимфоузлов наиболее быстро происходила в группах животных, принимавших нативные, криоконсервированные ИП и смеси пробиотиков и энтеросорбентов.

Current medical practice pays a considerable attention to the correction of microbiota during dysbiosis by means of probiotics, prebiotics, sinbiotics and enterosorbents. One of the bowel dysbiosis complications is the translocation of intestine organisms into the internals. In this case antibiotic therapy and antiseptic measures are prescribed.

At the IPC&C of the NAS of Ukraine there have been carried-out the investigations for developing of experimental probiotic preparations immobilized on enterosorbents. Cryopreservation is an effective method of their long-term storage.

The research aim was a comparative studying of intestine organism restoration and internal eradication in animals with experimental dysbiosis complicated by translocation of bowel microflora after therapy with native and cryopreserved immobilized probiotics (IP).

The experiments were carried-out in white laboratory rats. Bowel dysbiosis was simulated by peroral injection of 15 mg Ampicillin and 10 mg Metronidazol. *Saccharomyces boulardii* and *Bifidobacterium bifidum* immobilized on Sorbex and SUMS-1 enterosorbents were used as IPs. IPs were cryopreserved 30 min later the adsorption. Free probiotics, enterosorbents and mixtures of enterosorbents and probiotics were injected in the reference groups.

The most rapid and complete restoration of large intestine parietal microflora has been established after IP receiving. No significant differences in therapeutic effect of native and cryopreserved IPs were found. The positive moment was the fact that *S. boulardii*, the transitory microorganism of gastrointestinal tract, was found in animal bowel after IP introduction within 7–10 days and in the reference groups it was found within 2–5 days.

Eradication of intestinal microflora from liver, spleen and mesenteric lymph nodes occurred most rapidly in the groups of animals received native, cryopreserved IPs and mixtures of probiotics and enterosorbents.

Экстракт печени оказывает угнетающее действие на нервные клетки новорожденных крыс, культивируемые *in vitro*

М.В. ШЕВЧЕНКО

Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

Liver Extract Affects Suppressively *In Vitro* Cultured Nerve Cells of Newborn Rats

M.V. SHEVCHENKO

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

Изучение действия экстрактов, полученных из различных тканей, на изолированные клетки, с одной стороны, позволяет исследовать *in vitro* влияние различного микроокружения на трансплантированные клетки, а с другой – изучать специфичность действия на различные клетки факторов, продуцируемых в различных тканях. Поэтому целью работы явилось изучение особенностей действия экстрактов тканей мозга и печени на нервные клетки новорожденных крыс *in vitro*.

Экстракты мозга (ЭМ) и печени (ЭП) получали гомогенизацией тканей мозга и печени новорожденных крыс с последующим их центрифугированием.

Нервные клетки (НК) получали из мозга новорожденных крыс, отмывали и культивировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10% сыворотки крыс. Экстракты добавляли в концентрации 0,3 мг белка/мл среды.

В процессе культивирования как в присутствии, так и без ЭМ и ЭП большинство НК образуют агрегаты, которые отличаются по размеру, структуре и форме. В процессе культивирования изменяются структура и форма агрегатов. Упаковка клеток в некоторых агрегатах становится плотнее, что приводит к превращению агрегатов в сфероиды, поведение которых в процессе культивирования сходно с поведением нейросфер. Они могут расти, а после прикрепления к подложке составляющие их клетки мигрируют и дифференцируются в нейроны и клетки глии. Часть агрегатов сливается. Клетки, сформировавшие мелкие рыхлые агрегаты, в процессе культивирования погибают. В процессе культивирования наблюдается увеличение жизнеспособности НК, сформировавших агрегаты, более чем в 2 раза уже через 1 сутки после культивирования.

Культивирование НК в присутствии ЭМ не оказывает достоверного влияния на образование агрегатов и их структурные изменения по сравнению с контрольными клетками. Присутствие в среде культивирования ЭП оказывает ингибирующее действие на агрегацию НК. Агрегатов образуется меньше, структурно они мелкие и рыхлые, уплотнение клеток агрегатов и их слияние в процессе культивирования наблюдаются позже по сравнению с контролем и ЭМ. Также отмечается замедление скорости прикрепления агрегатов к подложке.

Экстракт мозга оказывает стимулирующее, а экстракт печени угнетающее влияние на формирование монослоя клетками глии и образование нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток.

Таким образом, можно заключить, что регуляторные факторы в ЭМ активируют, а в ЭП – угнетают адгезию клеток, глиогенез, нейрогенез и пролиферацию стволовых/прогениторных клеток.

The studying of effect of the extracts, derived from different tissues, on isolated cells on the one hand enables to investigate *in vitro* the effect of various microenvironment on transplanted cells, and on the other hand to examine the effect specificity on different cells of the factors, produced in various tissues. Therefore the research aim was to study peculiarities of brain and liver extracts effect on behavior of newborn rat nerve cells *in vitro*.

Brain (BE) and liver (LE) extracts were derived by homogenization of newborn rat brain and liver tissues with their further centrifugation.

Nerve cells (NCs) were derived from newborn rat brain, washed and cultured in concentration of 2×10^6 cells/ml in DMEM/F12 enriched with 10% rat blood serum. The extracts were added in concentration of 0.3 mg protein/ml of medium.

During culturing both in absence and presence of BE and LE most of NCs form aggregates differing in size, structure and shape. During culturing the structure and aggregate shape are changed. Cell packing in some aggregates becomes more compact, that results in the transformation of aggregates to spheroids, which act like neurospheres during culturing. They can grow and after attachment to a substrate the cells comprising them migrate and differentiate into neurons and glial cells. A part of aggregates merges. The cells, forming small spongy aggregates, die during culturing. During culturing the viability of NCs, forming aggregates, increases more than twice already after the 1st day of culturing.

NC culturing in presence of BE does not significantly affect the aggregate formation and their structural changes if compared with the control cells. The presence of LE in culturing medium has an inhibiting effect on NC aggregation. The number of formed aggregates is lower, they are structurally small and spongy, during culturing the packing of cell aggregates and their mergence are observed later if compared with the control and cultures with BE. In addition the reduction of rate of aggregate attachment to substrate is observed.

Brain extract has stimulating effect and liver extract has suppressing effect on formation of glial cell monolayer and the of neuroblasts and colonies of stem/progenitor cells.

Thus, we may conclude that regulatory factors of BE activate, and LE factors suppress cell adhesion, glyogenesis, neurogenesis and proliferation of stem/progenitor cells.

Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на стромальные и цитокин-продуцирующие клетки тимуса при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Stromal and Cytokine-Producing Thymus Cells during Development of Experimental Allergic Encephalomyelitis

YE.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV

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

Важным звеном кооперации и координации деятельности нервной, эндокринной и иммунной систем является тимус. Это не только центральный орган иммунитета, но и центр регуляции гормонального профиля организма независимо от того, участвует ли он непосредственно в образовании этих гормонов или только контролирует реализацию их активности. В реализации этих механизмов активное участие принимает эпителиальная строма тимуса, продуцирующая различные гуморальные факторы, IFN- γ , IL-10, TGF- β и др. Гормоны тимуса в этих сложных каскадных взаимодействиях выступают также в роли посредников взаимодействия тимуса и структур нервной системы, функционирование которых нарушается при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ). Поэтому для лечения целесообразно использовать модуляторы надсистемного воздействия, комплексно влияющие на механизмы иммунного ответа, например фетальные нервные клетки (ФНК).

Цель исследования – изучить стромальные и цитокин-продуцирующие клетки тимуса в динамике развития ЭАЭ после применения криоконсервированных по разным режимам ФНК (кФНК).

Эксперименты на крысах проведены в соответствии с правилами “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986 г.). ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой (1976 г.). Суспензию ФНК из мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации криоконсервировали по двум режимам (P1 и P2). Суспензию кФНК крыс вводили внутривентриально на 14-е сутки развития ЭАЭ. Методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) на 7–35-е сутки развития патологии определяли DC⁺, Ia⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺ – клетки с использованием соответствующих МАТ (BD). Методом ELISA определяли уровень тимозина β 4 (Abcam) и TGF- β (BD). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Полученные данные продемонстрировали волнообразное изменение изучаемых показателей в тимусе при развитии ЭАЭ. Введенные кФНК обеспечивали коррекцию клеток соединительнотканной стромы тимуса. Содержание Ia⁺- и DC⁺-клеток коррелировало с концентрацией IL-10⁺ – клеток и к 35-м суткам развития патологии снижалось. Результаты показали, что кФНК достоверно повышали содержание IFN- γ ⁺ – клеток, концентрацию TGF- β и тимозина β 4 в тимусе крыс с ЭАЭ. Более выраженное корректирующее влияние оказывали кФНК (P2), о чем свидетельствовала суммарная степень отклонений.

Таким образом, продемонстрирована способность кФНК воздействовать на стромальные элементы тимуса (DC⁺, Ia⁺-клетки) животных с ЭАЭ, нормализуя содержание IFN- γ ⁺, IL-10⁺ – клеток, а также концентрацию TGF- β и тимозина β 4.

Thymus is an important link for the cooperation and coordination of nervous, endocrine and immune systems activity. It is not just a central organ of immunity but a center of body hormonal profile regulation as well regardless of the fact if it is directly involved in the production of these hormones or only controls the implementation of their activity. Thymus epithelial stroma actively participates in the implementation of these mechanisms by producing various humoral factors, IFN- γ , IL-10, TGF- β etc. In these complex cascade interactions thymus hormones also act as mediators of interactions between thymus and structures of nervous system which functions are impaired during experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Therefore for the treatment one should use modulators with suprasystem effect which have complex influence on the immune response mechanisms, for example, fetal nerve cells (FNC).

The research aim was to investigate stromal and cytokine-producing thymus cells during EAE development after administration of FNC cryopreserved according different regimens (cFNC).

The experiments in rats have been performed according to the regulations of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). EAE was induced in rats by Davydova's method (1976). FNC suspension obtained from the brain of rat embryos of 11 gestation days was cryopreserved according two regimens (R1 and R2). Rat cFNC suspension was injected intraperitoneally to the day 14 of EAE development. DC⁺, Ia⁺, IFN- γ ⁺, IL-10⁺ cells were examined by flow cytometry method (FACS Calibur, BD, USA) to the days 7–35 using appropriate monoclonal antibodies (BD). Levels of thymosine β 4 (Abcam) and TGF- β (BD) were determined by ELISA method. Statistical processing of the results was performed with Mann-Whitney criterion.

The obtained data demonstrated a wave-like change of the studied parameters in the thymus during EAE development. Injected cFNC provided the correction of the thymus connective tissue stromal cells. The level of Ia⁺ and DC⁺ cells decreased to the day 35, that correlated with the concentration of IL-10⁺ cells. The results showed that cFNC significantly increased the number of IFN- γ ⁺ cells, concentration of TGF- β and thymosine β 4 in the thymus of rats with EAE. More pronounced correction influence was rendered by cFNC (R2) which was indicated by cumulative degree of deviations.

Consequently, we demonstrated an ability of cFNC to influence thymus stromal elements (DC⁺ and Ia⁺ cells) of EAE animals normalizing the level of IFN- γ ⁺, IL-10⁺ cells as well as TGF- β and thymosine β 4 concentrations.

Клинико-экспериментальная оценка эффективности криоконсервированной сыворотки кордовой крови в прегравидарной подготовке при антифосфолипидном синдроме

В.Ю. ПРОКОПЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
ГП «МНЦ криобиологии и криомедицины НАН, АМН, МОЗ Украины», г. Харьков

Clinical and Experimental Estimation of Efficiency of Cryopreserved Cord Blood Serum in Pregnancy Preparing at Anti-Phospholipid Syndrome

V.YU. PROKOPIUK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
Interdepartmental Centre of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences, Ministry of Health Care of Ukraine

Акушерский антифосфолипидный синдром (АФС) – патология, начинающаяся с взаимодействия антифосфолипидных антител с эндометрием, эмбрионом, приводит к микротромбозам в спиральных артериях и таким осложнениям беременности, как невынашивание, плацентарная недостаточность, синдром задержки развития плода. Лечение АФС, как правило, начинается уже в разгаре самого заболевания.

Целью работы была экспериментальная и клиническая оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения АФС с использованием криоконсервированного препарата сыворотки кордовой крови “Криоцелл-Криокорд” и традиционного лечения аспирином и гепарином.

Антифосфолипидный синдром моделировали введением кардиолипинового антигена самкам мышей линии BALB/c в общей дозе 120 мкг на 1 животное. Сравнивали эффективность прегравидарной подготовки с традиционным лечением и применением комплекса из двух методов. Оценивали репродуктивные показатели, состояние плаценты. Проводили прегравидарную подготовку с использованием “Криоцелл-Криокорда” женщинам с АФС, планирующим беременность и имеющим репродуктивные потери, по 1,8 мл в/м 1 раз в 2 дня (№5). Наблюдали течение беременности, родов, состояние новорожденных по утверждённым протоколам.

Показано, что применение как прегравидарной подготовки, так и традиционной терапии у животных сокращает количество грубых изменений в плаценте и исключает мёртворождения (прерывание беременности в поздние сроки), сокращает количество резорбций (результат прерывания беременности в ранние сроки) с 75 до 20–30%. В то же время применение прегравидарной подготовки совместно с лечением во время беременности позволяет избежать репродуктивных потерь. Использование прегравидарной подготовки с применением “Криоцелл-Криокорда” у женщин с АФС позволяет улучшить кровоснабжение и предимплантационную готовность эндометрия, снизить количество осложнений беременности с 72 до 45%. Прогностическим критерием при АФС могут являться индексы резистентности в маточных сосудах ниже 0,9, артериях пуповины ниже 0,7, снижение титров антифосфолипидных антител в 1,5–2 раза, нормализация показателей коагулограммы.

Прегравидарная подготовка женщин, страдающих АФС, с помощью препарата “Криоцелл-Криокорд” улучшает течение и результат беременности.

Obstetric anti-phospholipid syndrome (APS) is the pathology, beginning with the interaction of antiphospholipid antibodies with endometrium and embryo, leads to microthromboses in spiral arteries and such complications of pregnancy as miscarriage, placental insufficiency, fetal growth retardation syndrome. APS treatment as a rule starts just in the height of disease.

The research aim was to experimentally and clinically estimate the efficiency of pregnancy preparing and treatment of APS using cryopreserved preparation of cord blood serum “Cryocell-Cryocord” as well as traditional treatment by Aspirin and Heparin.

Anti-phospholipid syndrome was modelled by introduction of cardiolipin antigen to female BALB/c mice in total dose of 120 mg per one animal. The efficiencies of preparing to pregnancy with traditional treatment and application of the combination of two methods were compared. There were assessed reproductive indices, state of placentas. There was performed the preparing to pregnancy using “Cryocell-Cryocord” to women with APS planning the pregnancy and having reproductive losses by 1.8 ml intramuscularly once during 2 days (totally 5 doses). There was observed the course of pregnancy, labours, state of newborns according to the approved protocols.

It has been shown that both application of preparing to pregnancy and traditional therapy in animals reduce the number of rough changes in placenta and exclude the dead birth (termination of pregnancy at late terms), decrease the number of resorptions (result of pregnancy termination at early terms) from 75% to 20–30%. At the same time the application of preparing to pregnancy together with the treatment during pregnancy allows the avoiding of reproductive losses. The use of preparing to pregnancy jointly with “Cryocell-Cryocord” in the women with APS allows the improvement of blood supply and preimplantation readiness of endometrium, the reduction of the number of pregnancy complications from 72 to 45%. Prognostic criteria at APS may be the indices of resistance in uterine vessels (below 0.9), arteries of umbilical cord (below 0.7), reduction of the titres of antiphospholipid antibodies in 1.5–2 times, normalization of indices of coagulograms.

Preparing to pregnancy of the women suffering from APS with the help of preparation “Cryocell-Cryocord” improves the pregnancy course and result.

Значение стадии гистогенеза неонатальной овариальной ткани для ее развития в условиях гетеротопической трансплантации

Ю.О. ТИШЕНКО, В.В. КИРОШКА, Т.П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Importance of Histogenesis Stage of Neonatal Ovarian Tissue for Its Development under Conditions of Heterotopic Transplantation

YU.O. TISCHENKO, V.V. KIROSHKA, T.P. BONDARENKO

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

В настоящее время предполагается, что одной из стратегий сохранения репродуктивной функции женщин при патологиях яичников различного генеза может быть трансплантация фетальной овариальной ткани, содержащей максимальный пул половых клеток. Ранее получены противоречивые данные о возможности развития фетальной овариальной ткани в организме половозрелого реципиента в условиях гетеротопической трансплантации.

В связи с этим целью данной работы было изучить значение стадии гистогенеза неонатальной овариальной ткани для ее роста, развития и функционирования при гетеротопической трансплантации. Для достижения поставленной цели проводили аллотрансплантацию яичников 1-, 3- или 10-го дня постнатального развития (группы 1, 2 и 3 соответственно) под капсулу левой почки овариоэктомированным животным-реципиентам. На 30-, 60- и 100-е сутки осуществляли гистологический анализ трансплантатов и измеряли концентрацию половых гормонов. Показано, что на 30-е сутки наблюдения морфология трансплантатов овариальной ткани была представлена фолликулами различной степени зрелости, желтыми телами, а также фолликулярными кистами во всех экспериментальных группах. При этом у животных 2- и 3-й групп количество фолликулов на единицу объема трансплантата (1 мм³) было в 4-6 раз больше по сравнению с таковым в 1-й группе. При увеличении сроков наблюдения у животных 1-й группы отмечалось склерозирование ткани трансплантата, тогда как в других экспериментальных группах были выявлены значительные участки ткани, морфологически соответствующие половозрелым яичникам. Анализ уровня эстрадиола и прогестерона показал достоверное их повышение во всех экспериментальных группах относительно кастрированных животных на 30-е сутки. Восстановление концентрации половых гормонов до физиологических значений наблюдалось только у животных 3-й группы к 60-м суткам наблюдения.

Таким образом, можно сделать вывод, что развитие и эндокринная функция трансплантатов неонатальной овариальной ткани определяются стадией ее гистогенеза. Так, трансплантация яичников 1-х суток постнатального развития приводит к ее атипичному развитию, при этом стероидогенная функция наблюдается только на ранних этапах наблюдения (30 суток). При трансплантации овариальной ткани 3- и 10-х суток постнатального развития происходят ее развитие до половозрелой стадии и достоверное повышение уровня половых гормонов на длительных этапах наблюдения.

Nowadays there is the supposition that one of the strategies to preserve reproductive function of women with ovarian pathologies of different genesis may be the transplantation of fetal ovarian tissue, containing maximum pool of sexual cells. Previously there were obtained contradictory findings on the possibility of the development of fetal ovarian tissue in an organism of mature recipient under the conditions of heterotopic transplantation.

In this connection the aim of this work was to study the importance of histogenesis stage of neonatal ovarian tissue for its growth, development and functioning at heterotopic transplantation. To achieve the set aim there were transplanted the ovaries of the 1st, 3rd or 10th day of post-natal development (group 1, 2, 3, correspondingly) under the capsule of left kidney to ovary-ectomized recipient animals. To the 30th, 60th and 100th days there were done histological analysis of the grafts and measurement of the sexual hormones concentration. It has been shown that to the 30th observation day the morphology of ovarian tissue grafts was represented by the follicles of different maturity extent, yellow bodies, as well as by follicular cysts in all the experimental groups. Herewith in the animals of the 2nd and 3rd groups the number of follicles per graft volume unit (1 mm³) was 4–6 times higher if compared with that in the 1st group. With the increase of observation terms in the animals of group 1 there was noted the graft tissue sclerозation. Meanwhile in other experimental groups there were revealed significant sites of the tissue, morphologically corresponding to mature ovaries. Analysis of estradiol and progesterone level has shown their statistically significant rise in all the experimental groups as for the castrated animals to the 30th day. The restoration of sexual hormone concentration up to physiological values was observed only in the animals of the third group to the 60th observation day.

Thus we can conclude that the development and endocrine function of the grafts of neonatal ovarian tissue are determined by the stage of its histogenesis. So, transplantation of the ovaries of the first day of postnatal development results in its atypical development, herewith the steroid function is observed only at early observation stages (30 days). During transplantation of ovarian tissue of the 3rd and 10th days of postnatal development it develops till mature stage and there is statistically significant rise of the level of sexual hormones at long-term observation stages.

Экспериментальная модель лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия для исследования действия криоконсервированных клеток крови

Е.Н. СВИДКО, Ю.А. ДЕМИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Experimental Model of Limbal Inefficiency of Cornea Epithelia Regional Stem Cells for Investigation of Cryopreserved Blood Cell Influence

YE.N. SVIDKO, YU.A. DEMIN

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

Наиболее оправданной моделью лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток является модель с использованием аппликации 0,04% MMC на область лимба. Однако известно, что MMC обладает цитостатическим действием на клетки роговицы и криоконсервированные клетки крови. Поэтому для исследования необходимо знать время выведения препарата из роговицы животного, адаптировать данную модель для получения наиболее достоверных результатов и предотвращения его цитостатического действия на вводимые препараты.

Для разработки модели были взяты 3 кролика (6 глаз). По результатам измерения роговицы штангенциркулем были отобраны кролики с одинаковым диаметром роговицы, который составил 10 мм. Каждому животному была выполнена пахиметрия на ультразвуковом пахиметре Ocuscan фирмы Alcon. Затем смоделирована дистрофия роговицы. Для приготовления исходного испытываемого раствора использовали флакон препарата, содержащий 2 мг митомидина С. Содержимое флакона растворяли в 5 мл воды очищенной (концентрация митомидина С – 0,04%). Экспонирование на роговице глаза кружка фильтровальной бумаги проводили с различными интервалами времени: 0,5; 1, 2, 3, 4 или 5 мин. После экспонирования кружок помещали в вialку объемом 20 мл и герметично закрывали резиновой пробкой. В каждую вialку одной пипеткой 1 класса добавляли 2 мл метилового спирта. Затем вialки помещали на 5 мин на УЗ баню. Количественное определение митомидина С в образцах проводили, используя жидкостную хроматографию с диодноматричной детекцией. В качестве разделяющей колонки использовали колонку с октадецилсилильной привитой фазой, имеющей 3-кратное эндкипирование. В качестве аналитической длины волны использовали максимум поглощения митомидина С при 360 нм, что обеспечило достаточно высокую селективность сигнала в сочетании с низким порогом обнаружения вещества в пробах. Элюирование пробы проводили, используя градиентный режим для двух фаз – ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (рН 3,0) с концентрацией ион-парной добавки – гептансульфоната натрия – 0,01 М. Скорость диффузии (v) составила 19,98 мкг в минуту. Таким образом, время выведения митомидина С составит 26,2 ч.

Можно сделать вывод, что применение криоконсервированных клеток пуповинной крови оправдано при окончании данного периода времени.

The most reasonable model of limbal insufficiency of regional stem cells is the model with the use of 0.04% MMC application to the limb area. However it is known that MMC cytostatically affects the cornea cells and cryopreserved blood cells. So for investigation it is necessary to know the time of removal of the preparation from animal cornea, to adapt this model for the obtaining of the most significant results and for prevention of its cytostatically influence on the injected preparations.

To develop the model 3 rabbits (6 eyes) were used. According to the results of the cornea measurements with the caliper there were selected the rabbits with the same 10 mm diameter of cornea. Also each one underwent the pachymetry with ultrasonic pachymeter Ocuscan (Alcon). Later the cornea dystrophy was simulated. For the preparation of an initial experimented solution the flask of preparation containing 2 mg of mitomycin C was used. The content of flask was dissolved in 5 ml of purified water (mitomycin C concentration was 0.04%). The exposure of filtrated paper circle was carried-out on the cornea within different time intervals, 30 sec, 1, 2, 3, 4 and 5 min. After the exposure the circle was placed into the 20 ml vial and closed hermetically with a rubber plug. 2 ml of methyl alcohol was added with the same pipette of the first class into each vial. Later the vials were placed into the ultrasonic bath for 5 min. The quantitative determination of mitomycin C in the samples was carried-out by means of the liquid chromatography with the single diode-matrix detection. Octadecylsilic bonded phase having the 3-fold endotyping was used as the dividing column. The maximal absorption of mitomycin C at 360 nm was used as the analytical wave length that provided quite a high signal selectivity with the low detection limit of the substance in the samples. The sample elution was performed with the gradient regimen for two phases, acetonitrile and phosphate buffer solution having pH 3.0 with the concentration of ion-pair addition of 0.01 M sodium heptanesulfonate. The diffusion speed (v) was 19.98 μ g per min. Thus the removal time of mitomycin C was 26.2 hrs.

It may be concluded that the application of umbilical blood cryopreserved cells is expedient at the end of the given time period.

Влияние криоэкстракта липидов плаценты на структурно-функциональные изменения в региональных лимфоузлах крыс при адьювантном артрите

М.А. КРАВЧЕНКО, Н.А. БОНДАРОВИЧ, О.В. ЧЕЛОМБИТКО, А.И. ОСЕЦКИЙ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Placental Lipid Cryoextract on Structure-Functional Changes in Regional Lymph Nodes of Rats with Adjuvant Arthritis

M.A. KRAVCHENKO, N.A. BONDAROVICH, O.V. CHELOMBITKO, A.I. OSETSKY, A.N. GOLTSEV
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 из биологически активного тканевого сырья, в частности ткани плаценты, липидный состав которой обуславливает один из механизмов ее иммуносупрессивной активности. Использование для этих целей криотехнологий, в частности методов криоэкстракции, позволяет минимизировать влияние ряда повреждающих факторов на биологический материал, а также дифференцированно выделить липидную фракцию плаценты (ЛФП). В основе одного из механизмов реализации ее антиартритической активности может лежать способность липидных биомолекул выступать в роли эндогенных лигандов ядерных рецепторов Т-клеток и таким образом влиять на процессы периферической дифференцировки эффекторных $CD4^+CD25^-$ – Т-клеток с образованием индуцированных $CD4^+CD25^+$ – Т-регуляторных клеток (Т-рег). Таким образом, целью данной работы было изучить содержание $CD4^+CD25^+$ – Т-клеток в региональных лимфатических узлах крыс с адьювантным артритом (АА) до и после введения ЛФП.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар. Адьювантный артрит индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. Линейную фракцию плаценты получали методом криогенного молекулярного фракционирования (КМФ) из тканей плаценты свиньи и вводили с 14-х по 28-е сутки развития АА через день внутримышечно в дозе 100 мг/кг. На 7, 14, 21, 28, 35 и 42-е сутки развития АА проводилось определение массы и общего количества клеток в подколенных лимфатических узлах, а также содержания среди них $CD4^+CD25^+$ – клеток (Т-рег) методом прямой иммунофлюоресценции с использованием мАт (BD) к структурам CD4 (PE) и CD25 (FITC) на проточном цитофлуориметре (FACS Calibur, BD).

Показано волнообразное изменение изученных показателей в динамике развития АА, при этом, если для массы и общего количества клеток максимальные изменения наблюдались в опытных подколенных лимфатических узлах, то изменение содержания $CD4^+CD25^+$ -клеток имело максимальную выраженность с контралатеральной стороны. В группе лечения, получавшей ЛФП, содержание $CD4^+CD25^+$ -клеток и их концентрация в общей популяции $CD4^+$ -клеток в опытных лимфатических узлах приближались к контрольным показателям к 42-м суткам развития АА.

Таким образом, показано, что ЛФП способна корректировать содержание Т-регуляторных клеток в региональных лимфатических узлах при развитии АА, что может объяснить один из механизмов реализации ее антиартритической активности.

The known fact of immune modulating activity possessed by substances of lipid origin makes it topical to develop the technologies for obtaining such substances from biologically active tissue raw material, particularly, placental tissues. Lipid composition of placenta determines one of the mechanisms of placental immunosuppressive activity. The use of cryotechnologies, particularly, the methods of cryo-extraction, allows to minimize the influence of the number of damaging factors on the biological material and isolate the placental lipid fraction (PLF). One of the mechanisms of its anti-arthritis activity can be based on the ability of lipid biomolecules to act as endogenous ligands for T-cell nuclear receptors and thereby to influence peripheral differentiation of effector $CD4^+CD25^-$ T-cells with generation of inducible $CD4^+CD25^+$ T-regulatory (T-reg) cells. Thus the aim of this work was to study $CD4^+CD25^+$ T-cell content in regional lymph nodes of rats with adjuvant arthritis (AA) prior to and after administration of PLF.

The experiments were performed in Wistar male rats. Adjuvant arthritis was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant. Placental lipid fraction was obtained with the use of cryogenic molecular fractionation (CMF) method from pig placental tissues and it was administered from the 14th to the 28th days of AA development each other day intramuscularly in the dose of 100 mg/kg. Mass and total amount of cells in popliteal lymph nodes were determined to the 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and the 42nd day of AA, as well as $CD4^+CD25^+$ (T-reg) content by direct immunofluorescence method with the use of mAb (BD) to $CD4^+$ (PE) and $CD25^+$ (FITC) structures with flow cytometer (FACS Calibur, BD).

It has been shown that the change of the studied parameters had an undulating pattern with maximum changes of mass and total cell amount in the popliteal lymph nodes of adjuvant treated paws while changes of $CD4^+CD25^+$ content were more pronounced in the contralateral lymph nodes. In the treatment group received PLF the $CD4^+CD25^+$ content and their concentration in the total $CD4^+$ population in experimental lymph nodes approached the control parameters to the 42nd day of AA.

Thus, it was shown that PLF was capable to correct the content of T-reg cells in the regional lymph nodes during AA development and this fact can explain one of the mechanisms of its anti-arthritis activity.

Сравнительная характеристика ишемического и крионекроза миокарда

А.Г. БАБАЕВА, Н.А. ЧИЖ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Characteristics of Ischemic Necrosis and Myocardium Cryonecrosis

A.G. BABAYEVA, N.A. CHIZH

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

Изучение патогенетических механизмов инфаркта миокарда и создание на этой основе современных методов лечения невозможно без адекватной экспериментальной модели.

Цель работы – сравнительный анализ некроза миокарда, полученного путем перевязки левой коронарной артерии и методом локальной криодеструкции сердца.

Работа проведена на 90 беспородных крысах массой 180–250 г. Ишемический некроз миокарда (ИМ) моделировали путем механической перевязки левой коронарной артерии. Криовоздействие на стенку левого желудочка производили криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности -195°C в течение 15 и 30 с. Электрокардиограммы (ЭКГ) регистрировали и анализировали на аппаратно-программном комплексе “Полиспектр-12”. Прижизненную микроскопическую картину сердца оценивали с помощью контактного микроскопа ЛЮМАМ К-1.

Гистологические исследования миокарда проведены на 1, 7, 14 и 30-е сутки.

По данным ЭКГ исследования на 1-е сутки после перевязки левой коронарной артерии и криовоздействия на сердце в течение 30 с выявили наличие *Q* зубца с элевацией сегмента *ST* в *I* и *avL* отведениях, что свидетельствует о формировании у животных переднебокового трансмурального некроза миокарда. При 15-секундном криовоздействии на сердце регистрировали *Q* зубец и отрицательный зубец *T* в *I* и *avL* отведениях, что указывает на наличие субэпикардального некроза в тех же топографических областях сердца.

Область и степень деструктивно-воспалительных изменений в миокарде при моделировании различными способами ИМ подтвердились при исследовании гистологических препаратов. При этом формирование соединительнотканного рубца после криодеструкции сердца происходило на 5–7 суток быстрее, чем после перевязки коронарной артерии.

Впервые применена прижизненная микроскопия миокарда для оценки зоны некроза, состояния пограничных зон и участков сердца, удаленных от места повреждения.

Перевязка левой коронарной артерии приводит к формированию у животных переднебокового трансмурального некроза миокарда. Криохирургический метод моделирования позволяет достаточно надежно прогнозировать зону и степень повреждения сердечной мышцы при заданных параметрах криовоздействия с формированием как субэпикардального, так и трансмурального некроза миокарда. При криохирургическом методе моделирования формирование зоны некроза и соединительнотканного рубца происходит в более ранние сроки.

The studying of pathogenetic mechanisms of myocardial infarction and development of current methods of treatment on the base of this studies are impossible without adequate experimental model.

The research aim was a comparative analysis of myocardial necrosis, obtained by ligation of left coronary artery and cardiac local cryodestruction method.

The work was carried-out in 90 breedless rats of 180–250 g. Myocardial ischemic necrosis (MN) was modeled by mechanical ligation of left coronary artery. Cryoeffect on left ventricular wall was performed with cryoinstrument of 3 mm applicator diameter under operating surface temperature -195°C for 15 and 30 sec. Electrocardiograms (ECG) were recorded and analyzed with hardware and software complex “Polispektr-12”. Vital microscopic cardiac pattern was estimated with contact microscope LYUMAM K-1.

Histological examinations of myocardium were carried-out by the 1, 7, 14 and 30th days.

According to the data of ECG by the 1st day after ligation of left coronary artery and cryoeffect on heart for 30 sec we revealed the presence of *Q* deflection with a rise of *ST* segment in *I* and *avL* leads testifying to the formation of anteriolateral transmural necrosis of myocardium in animals. Under 15th-second cryoeffect on heart *Q* deflection and negative *T* deflection in *I* and *avL* leads pointing to the presence of sub-epicardial necrosis in the same topographic cardiac regions were recorded.

Region and level of destructive-inflammatory changes in myocardium during MN modeling with different methods were verified by analysis of histological preparations. It was shown that the formation of connective tissue cicatrix after cardiac cryodestruction took place in 5–7 days more rapid than after ligation of coronary artery.

In our study firstly was applied vital microscopy of myocardium to estimate necrosis zone, state of boundary zones and cardiac areas distant from injury.

Ligation of left coronary artery results in the formation of anteriolateral transmural necrosis of myocardium in animals. Cryosurgical modeling method enables quite reliable predicting of zone and injury rate of myocardium at certain parameters of cryoeffect with formation as sub-epicardial and transmural necrosis of myocardium. At cryosurgical modeling method the formation of necrosis zone and connective-tissue cicatrix takes place in earlier terms.

Використання кріоконсервованого екстракту плаценти в комплексному лікуванні подагричного артриту у хворих з ожирінням

А.А. КАПУСТЯНЬСКА, В.М. ЖДАН, В.І. ШЕПІТЬКО, А.Л. ЧЕЛІШВІЛІ

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Application of Cryopreserved Placenta Extract in Combined Treatment of Gout Arthritis in Patients with Obesity

A.A. KAPUSTYANSKA, V.M. ZHDAN, V.I. SHEPITKO, A.L. CHELISHVILI

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Успішний розвиток клітинних технологій в світі дає підстави розраховувати на появу в майбутньому нових ефективних методів для лікування різних захворювань [Рябинин В.Е., 2010].

Наші дослідження проводились на базі поліклінічного відділення Полтавської обласної клінічної лікарні та Полтавської філії ДП «МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, АМН та МОЗ України». Під спостереженням знаходилось 107 чоловіків, хворих на подагричний артрит з ожирінням, віком від 32 до 73 років включно. Всі пацієнти були розподілені на дві групи. Першу групу склали 52 хворих на подагричний артрит з ожирінням, яким крім базисної терапії додатково вводили «Кріоцелл – Кріоекстракт плаценти» (ККЕП). Препарат ККЕП являє собою рідку фракцію з плаценти (об'єм 1,8 мл), виготовлений в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Препарат в асептичних умовах вводили внутрішньом'язово в дозі 1,8 мл 1 раз на добу, через день, тричі. До другої групи, яким проводили виключно базисну фармакотерапію, ввійшли 55 хворих на подагричний артрит з ожирінням. Всім пацієнтам після тканинної і клітинної терапії рекомендовано дотримуватися дієти №6–8 за Певзнером. Для визначення ефективності лікування оцінювали клінічні дані та результати лабораторних методів дослідження.

Спостереження засвідчили, що комплексне лікування із застосуванням ККЕП має суттєві переваги в порівнянні з традиційним, а саме: серед хворих 1 групи позитивний клінічний ефект досягнуто у 97,2 % випадках, а серед хворих 2 групи, яким проводили стандартну терапію – у 94,8% випадках. Клінічне покращення у хворих на подагричний артрит проявлялось зменшенням деформації та дефігурації суглобів, відновленням м'язової сили, зменшенням болю в суглобах, що оцінювали за шкалою ВАШ. В результаті комплексного лікування із застосуванням ККЕП у 19,23% хворих відновлена нормальна маса тіла, а 80,77% хворих досягли її стабілізації. Разом із клінічним покращенням зафіксовано позитивну динаміку лабораторних показників активності процесу. А саме, у хворих 1 групи вже після другого внутрішньом'язового введення препарату ККЕП спостерігалось більш стрімке зниження рівня сечової кислоти, порівняно з показниками у хворих 2 групи. Водночас із зниженням рівня сечової кислоти досягли коригування андрогенного дисбалансу шляхом нормалізації показника рівня тестостерону крові.

Встановлено, що комплексне лікування загострення подагричного артриту у хворих з ожирінням при використанні препарату ККЕП достовірно призводить до коригування андрогенного дисбалансу шляхом нормалізації рівня тестостерону крові, більш динамічного зменшення рівня сечової кислоти забезпечує значне поліпшення функціональної активності суглобів, достовірну стабілізацію маси з наступною її нормалізацією.

Successful development of cell technologies in the world provides the conditions for appearance in future of new effective methods to treat different diseases [Ryabinin V.E., 2010].

Our studies were performed at the base of Polyclinical Department of Poltava Regional Clinical Hospital and Poltava Branch of State Enterprise “Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences and Ministry of Health Care of Ukraine”. Under monitoring there were 107 men, suffered from gout arthritis with obesity, aged from 32 to 73 years inclusive. All the patients were divided into two groups. The first one comprised 52 patients with gout arthritis with obesity, who were additionally to basic therapy introduced with “Cryocell – Placental Cryoextract” (CPCE). The CPCE preparation is the liquid fraction from placenta of 1.8 ml volume, produced at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov. The preparation under aseptic conditions was intramuscularly injected in a dose of 1.8 ml once within 24 hrs, in a day, thrice. Another group with just traditional basic pharmacotherapy comprised 55 patients with gout arthritis and obesity. All the patients after tissue and cell therapy were recommended to keep the Pevzner diet N6–8. To examine the efficiency of treatment there were assessed clinical data and results of laboratory methods of investigation.

The observations have shown that the combined treatment with CPCE has significant advantages if compared with traditional ones, namely among the patients of the 1st group a positive clinical effect was achieved in 97.2% cases, and in 94.8% among the patients of the group 2 with the standard therapy. Clinical improvement in the patients with gout arthritis was manifested in a reduced deformation and defiguration of joints, recovery of muscular strength, decreased pain in joints, assessed according to the VAS scale. As a result of complex treatment using CPCE in 19.23% of patients there was recovered a normal body mass and 80.77% of patients stabilized it. Together with clinical improvement there was fixed a positive dynamics of laboratory indices of the process activity. Namely, in the patients of the group 1 already after the second intramuscular injection of CPCE preparation there was observed more rapid decrease of the level of uric acid if compared with the indices for the patients of group 2. Simultaneously with the reduction of the level of uric acid we achieved the correction of androgenic imbalance by means of normalization of testosterone level in blood.

It has been established that complex treatment of aggravation of gout arthritis in the patients with obesity using CPCE preparation statistically and significantly leads to the correction of androgenic imbalance by normalizing the testosterone level in blood, more dynamic reduction in the level of uric acid, provides a significant improvement of functional activity of joints, statistically significant stabilization of the mass with its following normalization.

Пептидный состав кожи крыс при холодовой травме

И.Г. БЕСПАЛОВА, Е.О. БОГАТЫРЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peptide Composition of Rat Skin During Cold Trauma

I.G. BESPALOVA, E.O. BOGATYREVA

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

Регуляторные пептиды играют чрезвычайно важную роль в поддержании гомеостаза организма. Любое отклонение от нормального функционирования ткани, органа или организма должно сопровождаться изменением молекулярно-массового распределения пептидов как на местном, так и на организменном уровне.

Целью данной работы было изучение пептидного состава сыворотки крови и кожи крыс при холодовой травме и влияния на него введения животным экстрактов криоконсервированных фрагментов органов.

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986 г.).

Экстракт селезенки свиней (ЭСС) и экстракт кожи поросят (ЭКП) получали из криоконсервированных фрагментов селезенки свиней и кожи поросят, а экстракты кожи крыс – из измельченных участков, прилегающих к зоне травмы, путем их инкубирования в физиологическом растворе 60 мин. Полученный экстракт фильтровали и освобождали от термоллабильных белков.

В работе были использованы беспородные крысы массой 190–220 г. Холодовые травмы наносились на наружную поверхность бедра медным аппликатором диаметром 10 мм, охлажденным в жидком азоте, время экспозиции – 60 с. Экстракты вводили внутривентриально по 1 мл один раз в сутки на протяжении всего эксперимента (концентрация пептидов 100 мкг/мл). Контрольным животным вводили по 1 мл физиологического раствора. Для определения молекулярно-массового распределения пептидов использовали метод высокоэффективной гельпроницающей хроматографии.

При изучении дозозависимого влияния вводимых животным ЭСС и ЭКП (доза пептидов 1000, 100, 10 и 0,1 мкг) на пептидный состав сыворотки крови и кожи крыс установлено, что максимальные изменения в молекулярно-массовом распределении пептидов наблюдаются при введении животным пептидов в дозе 100 мкг.

При изучении заживления холодовых ран кожи было установлено, что при введении ЭСС или ЭКП наблюдается увеличение скорости заживления ран и в более ранние сроки происходит нормализация пептидного состава экстрактов кожи по сравнению с контролем.

Regulatory peptides play an overwhelmingly important role in maintenance of organism homeostasis. Any deviation from normal function of tissue, organ or organism must be accompanied by the change of molecular-mass distribution of peptides as at the local and organism levels.

The aim of this work was the investigation of peptide content of blood serum and rat skin after cold trauma and its dependence on injection into the animals of extracts of frozen-thawed organ fragments.

The experiments have been carried-out according to the General Principles of Experiments in Animals approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the regulations of European Convention on the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Pig spleen (PSE) and piglet skin (PISE) extracts were obtained from frozen-thawed pig spleen fragments and piglet skin by their incubation in physiological solution for 60 min, as well as rat skin extracts from fragments of the areas, adjoining the trauma zone. The derived extracts were filtrated and cleared from thermolabile proteins.

Breedless rats of 190–220g were used in the work. Cold traumas were applied to outer surface of thigh with copper applicator of 10 mm diameter cooled in liquid nitrogen, exposure time was 60 sec. The extracts were intraperitoneally injected with 1 ml once a day during the whole experiment (peptide concentration 100 mg/ml). Physiological solution (1 ml) was injected into the control animals. For determination of molecular-mass peptide distribution there was used the highly effective gel-penetrating chromatography.

During the studying of dose-dependent influence of injected PSE and PISE in animals (peptide dose was 1,000, 100, 10 and 0.1 mg) on peptide content of blood serum and rat skin it was established that maximal changes in molecular-mass peptide distribution were observed after the injection of peptides in animals in dose of 100 mg.

The investigation of cold skin trauma regenerative process showed that injection of PSE and PISE resulted in the increase of regenerative process rate and more rapid normalization of skin extract peptide content comparing to the control.

Механизмы формирования противовирусной резистентности после введения препарата “Криоцелл-Гемокорд”

О.Ю. КОЖИНА, Е.С. ОНАСЕНКО, Н.А. БОНДАРОВИЧ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Formation Mechanisms of Antiviral Resistance after Injection of Preparation “CryoCell-Hemocord”

O.YU. KOZHINA, YE.S. ONASENKO, N.A. BONDAROVICH, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Из всех известных вирусов, вызывающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей, самым распространенным является вирус гриппа. На базе ИПКиК НАН Украины был разработан препарат “Криоцелл-Гемокорд”, представляющий собой криоконсервированную суспензию ядросодержащих клеток кордовой крови человека в аутологичной плазме. В предварительных исследованиях была обнаружена противовирусная активность препарата по отношению к вирусу гриппа в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Однако механизмы реализации такого рода активности препарата остаются до конца не выясненными.

Целью данной работы было изучение функциональной активности клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) на экспериментальной модели вирусной инфекции (гриппа) у мышей после превентивного введения препарата “Криоцелл-Гемокорд”.

В эксперименте были использованы мыши линии Balb/C массой 18–20 г. Животных разделили на 3 группы (n = 10): 1 – мыши, которым препарат “Криоцелл-Гемокорд” вводили за 6 месяцев до инфицирования вирусом гриппа штамма А/Виктория в LD_{100/10}; 2 – мыши, которым за 6 месяцев до инфицирования вирусом гриппа превентивно вводили физиологический раствор (контроль); 3 – интактные мыши, которым за 6 месяцев вводили препарат “Криоцелл-Гемокорд” без последующего инфицирования. Штамм вируса гриппа А/Виктория (H₃N₂) имел гемагглютинирующий титр 1:512, инфекционный титр – 10⁴ LD_{50/10}. Препарат “Криоцелл-Гемокорд” вводили интраназально по 0,05 мл/мышь (6 ± 2 × 10⁵ клеток). У мышей всех опытных групп оценивали состояние клеток МФС перитонеальной полости (ПП) на 2 и 7-е сутки.

Превентивное введение препарата “Криоцелл-Гемокорд” интактным животным не влияло на активность моноцитов и несколько повышало активность макрофагов. В контрольной группе отмечалась 100% гибель животных к 10 суткам. При этом оценка функционального состояния клеток МФС со 2 до 7 суток выявила угнетение активности моноцитов ПП и незначительное её повышение у макрофагов. После заражения вирусом гриппа животных, которым предварительно был введен “Криоцелл-Гемокорд”, отмечалось повышение функциональной активности моноцитов со 2 по 7 сутки после инфицирования, а показатели активности макрофагов мышей повышались ко 2 суткам после заражения вирусом гриппа и возвращались к исходным величинам к 7 суткам.

Таким образом, при развитии вирусной инфекции в организме мышей на фоне предварительного введения препарата “Криоцелл-Гемокорд” наблюдалась стимуляция фагоцитарной активности популяции клеток, отвечающей за развитие неспецифического иммунного ответа.

The most wide-spread of all known viruses caused infective diseases of upper respiratory tracts is the virus of influenza. At the IPC&C of the NAS of Ukraine there was developed the preparation “CryoCell-Hemocord”, the cryopreserved suspension of human cord blood nucleated cells in autologous plasma. In previous investigations there was found the preparation antiviral activity against the virus of influenza in the experiments *in vitro* and *in vivo*. However, the mechanisms of such activity preparation remain unclear.

Research aim was to study the functional cell activity of monocyte-phagocyte system (MPS) in experimental model of mice viral infection (influenza) after preventive injection of preparation “CryoCell-Hemocord”.

Balb/C mice of 18–20 g mass were used in the experiment. The animals were divided into 3 groups (n = 10): 1 – mice injected with the preparation “CryoCell-Hemocord” 6 months prior to infection by influenza A/Victoria virus strain in LD_{100/10}; 2 – mice injected with the physiological solution 6 months before infection by influenza virus (the control); 3 – intact mice injected with the preparation “CryoCell-Hemocord” 6 months before examination without following infection. Influenza A/Victoria (H₃N₂) virus strain had hemagglutinating titre 1:512, infective titre was 10⁴ LD_{50/10}. The preparation “CryoCell-Hemocord” was intranasally introduced per 0.05 ml/mouse (6 ± 2 × 10⁵ cells). The state of MPS cells of peritoneal cavity (PC) in all the experimental mice were evaluated in the 2nd and 7th days.

Preventive injection of the preparation “CryoCell-Hemocord” into intact animals did not affect the monocyte activity and slightly increased the macrophage activity. Animal death of 100% was noted in the control group to the 10th day. Moreover, the evaluation of MPS cell functional state from 2 up to 7 days revealed the suppression of PC monocyte activity and the insignificant increase of macrophages. The animals previously injected with “CryoCell-Hemocord” were later infected by the influenza virus and there was noted the rise of monocyte functional activity from 2 up to 7 days after infection and the indices of mice macrophage activity increased to the 2nd day after infection by influenza virus and returned to the initial indices to the 7th day.

Consequently, the development of viral infection in mice organism after the preliminary injection of the preparation “CryoCell-Hemocord” was accompanied by the stimulation of cell population phagocytic activity responsible for the development of non-specific immune response.

**Восстановление дегенеративно измененной хрящевой ткани
межпозвоночных дисков после неинъекционного введения
мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток**

М.С. ЮХТА, Н.А. ВОЛКОВА, Е.И. ГОНЧАРУК, **В.И. ГРИШЕНКО**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Renewal of Degeneratively Changed Intervertebral Disc Cartilage after Non-Injectonal
Introduction of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells**

M.S. IUKHTA, N.A. VOLKOVA, YE.I. GONCHARUK, **V.I. GRISCHENKO**

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

Цель исследования – оценка терапевтического потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при дегенеративно-дистрофическом повреждении хрящевой ткани межпозвоночных дисков (МПД).

Исследование проведено на взрослых крысах-самцах массой 350–400 г, у которых моделировалось компрессионное дегенеративно-дистрофическое повреждение Сс_{VI-VII}. На 60-е сутки животным экспериментальной группы (n = 14) в зону дефекта вводили 0,5×10⁶ МСК на коллагеновой губке, которую укладывали на поврежденный МПД в сформированное из мягких тканей хвоста ложе. Контрольным животным (n = 14) таким же образом вводился физиологический раствор NaCl. Из опыта животных выводили на 30 и 60-е сутки после терапии. Оценку эффективности введения МСК проводили с помощью спиральной компьютерной томографии (КТ) и гистологических методов исследования. Работа проведена в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007 г.).

По данным КТ на 30-е сутки после введения МСК четко определялось увеличение высоты Сс_{VI-VII} по сравнению с контролем (0,7 ± 0,03 и 0,5 ± 0,04 мм соответственно). На 60-е сутки высота МПД достигала нормальных размеров, характерных для животных данной возрастной группы (1,0 ± 0,06 мм). В то же время значение данного показателя в группе контроля составило лишь 0,7 ± 0,03 мм. Анализ гистологических препаратов показал, что после введения МСК происходит постепенное восстановление структуры МПД. На 30-е сутки увеличивается клеточность фиброзного кольца (ФК), при этом фибробластоподобные клетки располагаются как вдоль, так и внутри пучков коллагеновых волокон. На 60-е сутки исчезают разволокнения коллагеновых волокон ФК, трещины и щели в нем. При этом у контрольных животных признаки дегенеративно-дистрофических изменений МПД сохраняются на всех сроках наблюдения. Проведенные морфометрические исследования также показали достоверное увеличение высоты МПД: у экспериментальной группы животных на 30-е сутки этот показатель составил 0,7 ± 0,034 мм, на 60-е сутки – 1,0 ± 0,051 мм, в то время как в контроле – 0,57 ± 0,029 и 0,6 ± 0,032 мм соответственно.

Таким образом, полученные данные компьютерно-томографических, гистологических и морфометрических исследований указывают на достоверно положительный эффект применения суспензии МСК при дегенеративно-дистрофических повреждениях МПД, что проявляется не только в увеличении высоты диска, но и в восстановлении его структуры.

The research aim was to evaluate multipotent mesenchymal stromal cell (MSCs) therapeutic potential under the conditions of degenerative and dystrophic cartilage damage of intervertebral discs (IVDs).

The study was carried-out in adult male rats of 350–400 g weight, in which the compressive degenerative-dystrophic damage of Сс_{VI-VII} was modelled. To the 60th day the animals of experimental group (n = 14) were treated with 0.5×10⁶ MSCs on a collagen sponge which was placed over the damaged IVD into the bed formed from tail soft tissues. The animals of control group (n = 14) were treated with NaCl physiological solution in the same manner. The animals were sacrificed to the 30th and 60th day after therapy. The efficiency of MSC introduction was estimated with spiral computer tomography (CT) and histological methods. The research was performed according to the General principles of experiments in animals approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007).

Analysis of the CT data revealed to the 30th day after MSC introduction an increase of Сс_{VI-VII} compared with the control (0.7 ± 0.03 and 0.5 ± 0.04 mm, respectively). To the 60th day the IVD height reached a normal value, typical for animals of this age group (1.0 ± 0.06 mm). At the same time, this parameter in the control group was only 0.7 ± 0.03 mm. Histological analysis showed gradual renewal of the IVD structure after MSC injection. To the 30th day we found an increased number of cells in the fibrous ring (FR), while fibroblast-like cells were located both along and inside of the collagen fiber bundles. To the 60th day the collagen fiber dissociation in FR were dissappeared, as well as fissures and cracks. At the same time the degenerative-dystrophic changes in IVDs in the control animals were preserved in all observation terms. The performed morphometric studies also showed significant increase in the IVD height: in the experimental group of animals this parameter to the 30th day was 0.7 ± 0.034 mm, to the 60th day it was 1.0±0.051 mm, while in the control group it reached 0.57 ± 0.029 mm and 0.6 ± 0.032 mm, respectively.

Thus, the data of computer tomography, histological and morphometric studies point to the statistically significant positive effect of MSC application under the conditions of degenerative-dystrophic cartilage damages of IVDs, that is manifested both in an increasing of disc height, and in renewal of its structure.

Трансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени, заселенных в макропористые губки, крысам с печеночной недостаточностью

Д.В. ГРИЦАЙ, А.О. КОЗЛОВА, А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Transplantation of Cryopreserved Fetal Liver Cells Immobilized in Macroporous Sponge in Rats with Liver Failure

D.V. GRITSAY, A.O. KOZLOVA, A.S. LEBEDINSKY

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

Целью исследования явилось изучение эффективности трансплантации клеток фетальной печени (КФП), иммобилизованных в макропористых альгинатных губках (МПГ), крысам с печеночной недостаточностью, формирующейся проведением частичной гепатэктомии (ЧГЭ) в условиях ингибирования пролиферации гепатоцитов 2-ацетиламинофлуореном (ААФ).

Модель формировали на крысах-самцах путем интрагастрального введения ААФ (30 мг ААФ/кг) на протяжении 5 суток, после чего проводили ЧГЭ. Было сформировано 3 группы животных: группа 1 – контроль; группа 2 – животные с моделью ААФ/ЧГЭ, которым в сальник имплантировали пустые МПГ; группа 3 – животные с моделью ААФ/ЧГЭ, которым в сальник имплантировали МПГ с иммобилизованными в них КФП человека первого триместра гестации, полученные после письменного согласия пациента с соблюдением этических норм. Макропористые альгинатные губки получали методом криотропного гелирования из альгината. Имплантацию МПГ проводили одновременно с проведением ЧГЭ. На 7, 14, 21 и 28-е сутки в сыворотке крови измеряли содержание альбумина и общего билирубина, а также активность АЛТ и АСТ, а также проводили мониторинг содержания эритроцитов в крови.

Смертность животных в группе 3 на 28-е сутки после трансплантации составляла 20%, против 40 % в группе 2. Уровень альбумина резко снижался после проведения ЧГЭ в обеих группах с минимумом на 7-е сутки, когда он составлял $19,26 \pm 1,9$ г/л в группе 2 (против $44,39 \pm 3,7$ г/л в контроле) и $27,14 \pm 2,4$ г/л в группе 3 ($p < 0,05$ относительно группы 2). Схожая динамика наблюдалась в содержании общего билирубина. Активность АСТ в группе 2 повышалась на 7–21-е сутки после ЧГЭ, а к 28-м суткам возвращалась к нормальному уровню. Трансплантация иммобилизованных КФП нивелировала повышение данного показателя на 7 и 21-е сутки после введения. Изменение активности АЛТ имело сходный характер. Поскольку печень является одним из основных депо крови, ЧГЭ сопровождалась значительной кровопотерей и, как следствие, снижением содержания эритроцитов в крови. В группе 2 данный показатель оставался достоверно ниже контроля на протяжении всего периода наблюдения. В группе 3 он не отличался от значений группы 2 на 7–14-е сутки, однако на 21-е сутки наблюдалось достоверное его повышение ($p = 0,01$), а на 28-е сутки содержание эритроцитов нормализовалось.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о положительном действии клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых губках, на течение печеночной недостаточности и перспективности данного подхода при лечении заболеваний печени.

The aim of study was to investigate the efficiency of transplantation of fetal liver cell (FLC) immobilized in macroporous alginate sponge (MPS) in rats with liver failure formed by partial hepatectomy (PHE) under inhibition of hepatocytes proliferation with 2-acetyl aminofluorene (AAF).

AAF/PHE model was formed in male rats by intragastric administration of 2-acetyl aminofluorene solution (30 mg/1 kg) during 5 days, on the 5th day PHE was performed. 3 groups of animals were formed: group 1 – the control; group 2 – rats with AAF/PHE model with cell-free MPS implanted into *omentum majus*; group 3 – rats with AAF/PHE model with human FLCs immobilized in MPS implanted in *omentum majus*. Human FLC of the 1st gestation trimester were collected after written consent of recipient in accordance to ethical norms. Macroporous alginate sponges were produced by cryotropic gelation of alginate. MPS implantation was carried-out at the same time with PHE. To the 7th, 14th, 21st and 28th days total bilirubin content, ALT and AST activities in blood serum were assessed, as well as and the erythrocyte number in whole blood was counted.

Mortality in animals of the 3rd group to the 28th day after transplantation comprised 20% vs. 40 % in group 2. Albumin content sharply decreased after PHE in both groups with minimum at the 7th day, when this index was 19.26 ± 1.9 g/l in group 2 (vs. 44.39 ± 3.7 g/l in the control) and 27.14 ± 2.4 g/l in group 3 ($p < 0.05$ compared to group 2). Similar dynamics was observed in total bilirubin content. AST activity in group 2 increased to the 7–21st days after PHE and by the 28th day returned to normal level. Immobilized FLC transplantation balanced the increase of this index to the 7th and 21st days after implantation. Similar dynamics was observed in ALT activity. As liver is one of the most important blood depot in organism PHE was accompanied by significant blood loss and consequently by decrease of erythrocyte number in blood. In group 2 this index was significantly lower compared to the control during whole observation period. In group 3 it did not differ from values of group 2 to the 7–14th day but to the 21st day its significant increase ($p = 0.01$) was observed. To the 28th day erythrocyte number returned to the normal content.

The results of this work testify to positive effect of fetal liver cells immobilized in macroporous sponge on proceeding of liver failure and perspective of this approach in liver disease treatment.

Особенности изменения иммунного статуса крыс с острым гнойным перитонитом после лечения препаратом “Криоцелл-Гемокорд”

К.А. ГОЛЬЦЕВ, О.Ю. КОЖИНА, О.В. САФРАНЧУК, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Changes of Rats Immune Status with Acute Purulent Peritonitis after Treatment with “Cryocell-Hemocord” Preparation

K.A. GOLTSEV, O.YU. KOZHINA, O.V. SAFRANCHUK, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Перитониты, независимо от их причины, в подавляющем большинстве случаев представляют собой воспаление бактериальной природы. Антибактериальную терапию при данной патологии нельзя считать полноценной, если она не сочетается со стимуляцией иммуногенеза, поскольку использование антибиотиков широкого спектра действия сопровождается иммунодепрессией.

Цель работы – оценить состояние иммунного статуса крыс в экспериментальной модели острого гнойного перитонита (ОГП) после лечения антибиотиком *per se* и в сочетании с препаратом “Криоцелл-Гемокорд”.

Работа выполнена на крысах линии Вистар массой 160–180 г в возрасте 6 месяцев в соответствии с правилами “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых в научных целях” (Страсбург, 1986 г.). Моделировали ОГП путем перевязки и отсечения червеобразного отростка, который оставляли в брюшной полости. Препарат “Криоцелл-Гемокорд” получали из цельной кордовой крови человека. Крысы были разделены на 4 группы: 1 – интактные (контроль), 2 – с ОГП, которым через 24 ч проводили релапаротомию и санацию брюшной полости раствором фурацилина, 3 – с ОГП, такое же лечение с внутримышечной инъекцией ампицилина, 4 – с ОГП, такое же лечение ампицилином и внутривенным введением препарата “Криоцелл-Гемокорд” в объеме 0,3 мл (56×10^6 клеток). Все показатели оценивали на 1, 3, 5 и 7-е сутки после операции. Иммунофенотипирование клеток селезенки проводили на цитофлюорометре (FACS Calibur, BD, США) с использованием МАТ к CD3, CD4, CD8, CD25, IFN- γ и IL-10 (BD, США).

Во всех опытных группах крыс наблюдали отклонения исследованных показателей состояния иммунной системы. В первую очередь, это касалось общих Т-клеток (CD3⁺), субпопуляции T_{reg} клеток (CD4⁺CD25⁺), а также повышения содержания клеток-продуцентов провоспалительного цитокина IFN- γ . Применение препарата “Криоцелл-Гемокорд” обеспечивало восстановление субпопуляционного состава у крыс с ОГП, увеличивая процент CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и снижая содержание CD4⁺CD25⁺-клеток. Судя по снижению содержания IFN- γ ⁺ и повышению IL-10⁺-клеток, введение препарата “Криоцелл-Гемокорд” может положительно влиять на цитокиновый профиль животных с ОГП, перепрофилируя синтез противовоспалительного IL-10 и провоспалительного цитокина IFN- γ .

Peritonites regardless on their causes mostly represent the inflammation of bacterial origin. Antibacterial therapy of this pathology could not be considered complete, if it is not combined with the stimulation of immunogenesis, whereas the application of antibiotics of wide spectrum is accompanied with an immune depression.

The research aim is to estimate the rat immune status in experimental model of acute purulent peritonitis (APP) after treatment with antibiotics *per se* and in combination with “Cryocell-Hemocord” preparation.

The work was performed in 160–180g 6-month-old Wistar rats according to the rules of European convention on the protection of vertebrate animals used for scientific purposes (Strasbourg, 1986). APP was simulated by means of ligation and dissecting of vermicular appendix which was left in peritoneal cavity. The preparation “Cryocell-Hemocord” was derived from the whole human cord blood. The rats were divided into 4 groups: the 1st one was intact animals (the control); the 2nd – those with APP, which in 24 hrs were relaparotomized and the cavity was sanitized with Furacinum; the 3rd – with APP, the same treatment and intramuscular injection of Ampicillin; the 4th – with APP and the same treatment with Ampicillin and intravenous injection of “Cryocell-Hemocord” in the volume of 0.3 ml (56×10^6 cells). All the indices were estimated to the 1st, 3rd, 5th and 7th days after surgery. Immune phenotyping of spleen cells was performed with cytofluorimeter (FACS Calibur, BD, USA) using MAB to CD3, CD4, CD8, CD25, IFN- γ , IL-10 (BD, USA).

In all the experimental groups of rats we found the deviations of the studied indices of immune system state. Firstly this concerned total T-cells (CD3⁺), T_{reg} cell subpopulation (CD4⁺CD25⁺) as well as the rise in the content of the cells producing of antiinflammatory cytokine IFN- γ . Application of the “Cryocell-Hemocord” preparation provided the restoration of subpopulation composition in the rats with APP, by means of increasing the percentage of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and reducing the content of CD4⁺CD25⁺ cells. Judging on the reduced content of IFN- γ ⁺ and increased IL-10⁺ cells, the introduction of the “Cryocell-Hemocord” preparation may positively affect the cytokine profile of animals with APP by means of re-orientation of the synthesis of anti-inflammatory IL-10 and pro-inflammatory cytokine IFN- γ .