

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

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



<i>Шевченко М.В.</i> Влияние экстрактов тканей мозга и печени на гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс.....	187
<i>Головина К.Н.</i> Осмотическая резистентность эритроцитов барана в условиях гипотермического хранения и воздействия озона.....	189
<i>Тарусин Д.Н., Зайков В.С., Муценко В.В., Петренко Ю.А.</i> Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на выживаемость мезенхимальных стромальных клеток в процессе хранения при различных положительных температурах.....	190
<i>Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф.</i> Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа <i>Cyprinus carpio</i>	191

coldinbiologyandmedicine

current issues of cryobiology,
transplantology and biotechnology



**Abstracts of the 37th Annual Conference of Young Scientists 'Cold in Biology and Medicine.
Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology'
May, 20–21st, 2013, Kharkov, Ukraine**

<i>Bondarovich N.A., Kuznyakov A.V., Ostankov M.V., Chelombitko O.V.</i> Effect of Various Freezing Protocols on Expression of Surface Markers of Fetal Liver Cells of Different Gestation Terms.....	165
<i>Rogulska O.Yu., Mutsenko V.V., Petrenko Yu.A.</i> Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Oligosaccharides.....	166
<i>Chelombitko O.V., Safranchuk O.V., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Dimitrov A.Yu.</i> Change of Molecular and Genetic Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells under Cryopreservation Factors.....	167
<i>Podufaliy V.V.</i> Cryopreservation of Single Epididymal and Testicular Spermatozoa in Microvolume.....	168
<i>Borisov P.A., Dimitrov A.Yu., Goltsev A.N.</i> Selection of Housekeeping Gene for Analysis of Gene Expression Level by Quantitative RT-PCR Method after Cell Cryopreservation.....	169
<i>Mykhailova O.A., Zubov P.M.</i> Apoptosis Stages of Cord Blood Nucleated Cells Depending on Cryopreservation Method.....	170
<i>Sevastianov S.S., Osetsky A.I.</i> Differential Scanning Tensodilatometry in Study of Crystallization Processes and Melting of Cryoprotective Solutions.....	171
<i>Govor I.V., Yakimenko Yu.S.</i> Study of Cryoprotectant Antioxidant Activity by Chemiluminescence Method.....	172
<i>Govorova Yu.S., Zinchenko A.V.</i> Investigation of Influence of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree n=25 on Conformational Stability of Human Hemoglobin.....	173
<i>Vakarchuk M.A.</i> Influence of Freezing on Placenta Extract Anti-Aggregation Properties.....	174
<i>Goriachaya I.P.</i> Adaptive Response to Oxidative Stress and Resistance to Cold Exposures of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast.....	175
<i>Babinets O.M.</i> Enzymatic Properties of Probiotics Immobilized on Enterosorbents after Low-Temperature Storage.....	176
<i>Rudnyeva Yu.V., Babiychuk V.G., Chernyavskaya E.A.</i> Effect of Rhythmic Extreme Cooling (-120°C) and Cord Blood Nucleated Cells on Functional State of Neurohumoral Regulation System in Young and Old Rats.....	177
<i>Pavlova E.V.</i> Criteria of Laboratory Indices during General Air Cryotherapy.....	178
<i>Trofimova A.V., Chizh N.A., Sandomirsky B.P.</i> Electrocardiophysiological Indices when Cooling Head and Neck.....	179
<i>Shkand T.V., Chizh N.A., Sandomirsky B.P.</i> Study of Rat's Myocardium Morphology at Experimental Heart Necrosis.....	180
<i>Bespalova I.G.</i> Dose-Related Effect of Extract of Cryopreserved Newborn Piglets' Skin Fragments on Metabolic Activity of Skin Fibroblasts in Culture.....	181
<i>Mutsenko V.V., Rogulska O.Yu., Petrenko Yu.A.</i> Cultivation and Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells within the Scaffolds Based on Skeletons Derived from the Marine Sponge <i>Ianthella basta</i>	182
<i>Babaieva A.G.</i> Effect of Cryopreserved Piglet Heart Extract on Indices of Cytolysis and Severity of Inflammation in Experimental Myocardial Necrosis.....	183



<i>Rogoza L.A.</i> Correction of ECG Indices of Rats with Myocardial Ischemia with Extract of Cryopreserved Piglet Heart Fragments.....	184
<i>Gorlenko A.A., Mykhailova I.P., Sandomirsky B.P.</i> Effect of Low Temperatures and Ionizing Irradiation on Physical-Mechanical Properties of Porcine Pericardium Fibrous Membrane and Aortic Valve Leaflets.....	185
<i>Shevchenko E.V., Tynnyka L.N., Mykhailova I.P., Sandomirsky B.P.</i> Effect of Ionizing Irradiation and Low Temperatures on Morphological State of Pig Isolated Arteries.....	186
<i>Shevchenko M.V.</i> Influence of Brain and Liver Tissue Extracts on Hypothermic Storage of Newborn Rat Neural Cells.....	187
<i>Golovina K.N.</i> Osmotic Resistance of Ovine Erythrocytes in Hypothermic Storage and Ozone Exposure.....	189
<i>Tarusin D.N., Zaikov V.S., Mutsenko V.V., Petrenko Yu.A.</i> Effect of Encapsulation in Alginate Microspheres on Survival of Mesenchymal Stromal Cells during Storage at Different Positive Temperatures.....	190
<i>Pugovkin A.Yu., Kopeika Ye.F.</i> Osmotic Resistance of Carp <i>Cyprinus carpio</i> Spermatozoa.....	191



Влияние разных протоколов замораживания на экспрессию поверхностных маркеров клеток фетальной печени разных сроков гестации

Н.А. Бондарович, А.В. Кузнецов, М.В. Останков, О.В. Челомбитко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Different Freezing Protocols on Expression of Surface Markers of Fetal Liver Cells of Various Gestation Terms

N.A. Bondarovich, A.V. Kuznyakov, M.V. Ostankov, O.V. Chelombitko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Клетки фетальной печени (КФП) широко используются в клеточной терапии. Обязательным этапом в их использовании является криоконсервирование. Часто в клинической практике применяют КФП разных сроков гестации, которые *a priori* имеют различную криолабильность в связи со значительной модификацией по мере гестации. Подбор оптимальных условий замораживания КФП разных сроков гестации (скорости охлаждения, концентрации криопротектора) и использование адекватных методов оценки деконсервированного материала остаются актуальными. В связи с этим целью исследования было изучение влияния различных протоколов замораживания на экспрессию фенотипических маркеров КФП разных сроков гестации.

Объектом исследования были КФП мышей C57Bl/14 и 18 суток гестации (КФП-14 и КФП-18). Криоконсервирование КФП проводили под защитой ДМСО в концентрациях 7,5; 10 и 12,5% с использованием двух программ охлаждения: I – со скоростью 1 град/мин до -25°C ; II – со скоростью 1 град/мин до -40°C , затем – 10 град/мин до -90°C ; далее в обоих случаях следовало погружение в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 41°C . Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию пропидий йодидом. Оценку фенотипии суспензии КФП проводили методом проточной цитометрии на цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием моноклональных антител («BD Biosciences», США) к молекулам CD34, CD38, Sca1, CD73 и CD44.

После замораживания-отогрева суспензии КФП-14, независимо от программы охлаждения, отмечено обогащение CD34⁺Sca1⁺ клетками. Данный эффект не наблюдался у КФП-18, в которых после замораживания-отогрева наблюдали снижение данного показателя. Использование ДМСО в концентрации 7,5% при обеих программах охлаждения позволило сохранить количество клеток CD34⁺CD38⁻ в КФП-14 на уровне первоначальных значений. При этом использование 12,5%-го раствора ДМСО было неоптимальным для сохранения данной популяции клеток, что выражалось в существенном снижении количества CD34⁺CD38⁻-клеток. С увеличением срока гестации чувствительность CD34⁺CD38⁻-клеток к концентрации криопротектора существенно изменялась, что было подтверждено данными о наибольшем количестве CD34⁺CD38⁻-клеток среди КФП-18 при использовании программы II с 12,5% ДМСО. Наиболее высокое содержание CD44⁺CD73⁺-клеток в КФП 14 и 18 суток гестации было получено после их замораживания-отогрева с использованием программы I и 10% ДМСО. Полученные данные подтверждают необходимость тщательного подбора программы криоконсервирования для КФП разных сроков гестации.

Fetal liver cells (FLCs) have been widely used in cell therapy. Mandatory component of technological process of their application is cryopreservation. It is of common occurrence that applied FLCs are of different gestation terms, and *a priori* are of various cryolability due to their significant modification during gestation. Selection of optimal freezing conditions for FLCs of different gestation terms (cooling rate, cryoprotectant concentration) and application of adequate methods of assessing frozen-thawed material has remained an actual task. In this connection the research aim was to study the effect of different freezing protocols on expression of phenotype markers of FLCs of different gestation terms.

The research objects were FLCs derived from C57Bl mice of 14 and 18 gestation day (FLC-14 and FLC-18). FLCs were cryopreserved under protection of DMSO in concentrations of 7.5%; 10% and 12.5% utilizing two programs: I – cooling rate of 1 deg/min down to -25°C ; II – cooling rate of 1 deg/min down to -40°C and 10 deg/min down to -90°C ; in both cases with following plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed in water bath at 41°C . Cell viability was examined by staining with propidium iodide. The phenotype of FLCs was assessed by flow cytometry with FACS Calibur (BD, USA) using monoclonal antibodies (BD, USA) against molecules CD34, CD38, Sca1, CD73 and CD44.

After freeze-thawing of FLC-14 suspension independently on cooling program we noted a risen content of CD34⁺Sca1⁺ cells. This effect was not found in FLC-18 suspension, where this index reduced after freeze-thawing. Use of DMSO in concentration of 7.5% in all the cryopreservation programs allowed the preservation of the number of CD34⁺CD38⁻ cells at the level of the control values in FLC-14. Application of 12.5% DMSO solution was not optimal to preserve this cell population, that was manifested in a significant reduction of CD34⁺CD38⁻ cell number. It is of interest that with a rise in gestation term the sensitivity of CD34⁺CD38⁻ cells to cryoprotectant concentration significantly altered, which was confirmed by the data on the highest amount of CD34⁺CD38⁻ cells among FLC-18 after application of program II with 12.5% DMSO. The highest number of CD44⁺CD73⁺ cells in FLC of 14 and 18 gestation days were obtained after freeze-thawing using program I and 10% DMSO. The findings focus the attention to the need of thorough selection of cryopreservation program for FLCs of different gestation terms.

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием олигосахаридов

Е.Ю. Рогульская, В.В. Муценко, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Human Mesenchymal Stromal Cells Using Oligosaccharides

O.Yu. Rogulska, V.V. Mutsenko, Yu.A. Petrenko

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

Экспериментальное и клиническое применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) требует разработки новых подходов и усовершенствования существующих методов криоконсервирования клеток. Криозащитные среды для эффективного замораживания МСК обычно содержат 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку, которые приходится удалять после отогрева, что может приводить к значительной потере клеток. При криоконсервировании клеток используются непроницающие в клетки осмотически активные компоненты среды замораживания, зачастую – различные сахара. Цель данной работы – исследование целесообразности использования олигосахаридов для подготовки МСК к криоконсервированию и для снижения концентрации ДМСО в криозащитной среде.

В работе использовали МСК дермы человека 4–7 пассажей. Сахарозу, трегалозу и рафинозу в концентрациях 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 М использовали для предобработки клеток до криоконсервирования, а также как добавку в криозащитную среду. Предобработку проводили путем культивирования клеток в течение суток с указанными концентрациями олигосахаридов. Охлаждение МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до –80°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли окрашиванием трипановым синим. Метаболическую активность оценивали по редокс-индикаторам МТТ и Alamar Blue. Адипогенную и остеогенную дифференцировку проводили в средах, содержащих специфические индукторы, и определяли по накоплению липидов, позитивно окрашивающихся Oil Red O, или по экспрессии клетками щелочной фосфатазы.

Криоконсервирование суспензий МСК, не прошедших предобработку, в среде без криопротекторов приводило к гибели более 90% клеток. Между показателями сохранности клеток и содержанием сахаров в исследуемом диапазоне концентраций в криозащитной среде и среде для предобработки установлена куполообразная зависимость. Предварительное культивирование МСК в присутствии любого из исследуемых олигосахаридов значительно повышало их криоустойчивость. Даже при полном отсутствии ДМСО и сыворотки около 50% предобработанных клеток после замораживания-отогрева сохраняли жизнеспособность, проявляли метаболическую активность и были способны к адгезии и пролиферации в условиях монослойного культивирования. Индукция клеток в адипогенном и остеогенном направлениях приводила к накоплению в них внутриклеточных липидов и экспрессии щелочной фосфатазы соответственно.

Полученные результаты указывают на целесообразность использования сахаров для разработки эффективных методов криоконсервирования МСК, исключающих применение токсичных концентраций криопротекторов и ксеногенной сыворотки.

Experimental and clinical applications of mesenchymal stromal cells (MSCs) require the development of new approaches and improvement of existing methods of cells cryopreservation. Cryoprotective solutions for effective freezing of MSCs usually contain 10% Me₂SO and fetal serum. These components must be removed after thawing and this often leads to significant cell loss. Various sugars are often used for cells cryopreservation as non-permeant osmotically active freezing media components. The aim of this study was to evaluate the feasibility of oligosaccharides using for the preparation of MSCs to cryopreservation and to reduce Me₂SO concentration in cryoprotective solution.

Human dermal MSCs of the 4–7th passages were used in this study. Sucrose, trehalose, and raffinose in concentrations of 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 0.5 M were used for pretreatment of cells prior to cryopreservation and as an additive into the cryoprotective solution. Pretreatment was performed by one day cell culturing with indicated concentrations of oligosaccharides. MSCs were cryopreserved using the cooling rate of 1 deg/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 redox indicators MTT and Alamar Blue (AB). Osteogenic and adipogenic differentiation was induced in media supplemented with specific differentiation factors and determined by the accumulation of lipids, positively stained with Oil Red O, or by expression of alkaline phosphatase.

Cryopreservation of MSC suspensions without pretreatment stage in a cryoprotectant free solution resulted in the death of more than 90% of cells. Dome-shaped dependence between rates of cell survival and sugars concentrations in cryoprotective solution and in culture medium for pretreatment was established. Pretreatment of MSCs with any of the studied oligosaccharides resulted in a significant increase in their cryostability. 50% of pretreated cells after freezing in the absence of Me₂SO and serum preserved their survival and metabolic activity and were able to attach and proliferate during monolayer culture. Induction of cells into adipogenic and osteogenic direction led to lipid intracellular accumulation and expression of alkaline phosphatase, respectively.

The obtained results indicate the feasibility of using sugars for the development of effective cryopreservation methods, which exclude the application of toxic concentrations of cryoprotectants and xenogeneic serum.



Изменение молекулярно-генетических характеристик клеток аденокарциномы Эрлиха под воздействием факторов криоконсервирования

О.В. Челомбитко, О.В. Сафранчук, Н.А. Бондарович, М.В. Останков, А.Ю. Димитров
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Change of Molecular and Genetic Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells Due to Cryopreservation

O.V. Chelombitko, O.V. Safranchuk, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov, A.Yu. Dimitrov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В современных подходах лечения онкологических заболеваний большое внимание уделяется применению стволовых раковых клеток (СРК) как индукторов роста опухоли. Использование в медицинской практике метода криодеструкции при лечении некоторых онкологических заболеваний не исключает изменения свойств СРК, которые могут оставаться в месте извлечения опухоли. Изучение влияния холода на поведение генов плюрипотентности в СРК на такой экспериментальной модели, как аденокарцинома Эрлиха (АКЭ), поможет раскрыть механизмы возникновения возможных рецидивов после данной процедуры.

Целью работы было изучение влияния процессов замораживания-отогрева на молекулярно-генетические свойства клеток АКЭ 7-х и 14-х суток развития, а также выделенной из них фракции CD44⁺.

Материалы и методы. Клетки АКЭ вводили внутрибрюшинно (3×10^6 клеток) самкам мышей BALB/c и культивировали *in vivo*. На 7-е и 14-е сутки получали культуру клеток АКЭ (АКЭ-7 и АКЭ-14), криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов по двухэтапной программе (скорость 1 град/мин до -80°C , 300–400 град/мин от -80 до -196°C). Популяцию клеток с маркером CD44 выделяли методом магнитной сепарации на магнитном сортере «BD Imagnet» (США). Анализ процентного содержания субпопуляций с маркерами CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high} проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («Becton Dickinson», США). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью пропидий йодида. Уровень экспрессии генов *sox-2*, *nanog*, *oct-4* в общей популяции клеток АКЭ-7 и АКЭ-14 в выделенной фракции CD44⁺ и фракции без CD44⁺ определяли методом ОТ-ПЦР.

Результаты. Содержание клеток-предшественников (CD44^{high}) и более дифференцированных (CD44⁺CD24⁻) в популяции клеток АКЭ 7-х суток культивирования было достоверно выше по сравнению с культурой АКЭ-14. Процессы замораживания-отогрева оказывали ингибирующее действие на экспрессию поверхностных фенотипических маркеров CD44^{high} в культуре клеток обоих сроков развития, а содержание клеток CD44⁺CD24⁻ особенно повышалось в культуре 14-х суток развития. Активация экспрессии генов *sox-2*, *nanog* и *oct-4* после воздействия холода на общую популяцию клеток АКЭ и выделенную фракцию CD44⁺ свидетельствует об их ключевой роли в увеличении численности популяции клеток опухоли.

An emphasis is paid currently to cancer stem cells (CSCs) as inducers of tumor growth during treatment of malignancies. Application of cryodestruction in medical practice during treatment of some malignancies does not exclude the change of CSC properties, which may remain in the site of tumor ablation. The investigation of cold effect on pluripotency gene behavior in SCCs in such experimental model as Ehrlich adenocarcinoma (EAC) would help to reveal the mechanisms of appearance after this procedure.

The research aim was to study the effect of freeze-thawing on molecular and genetic properties of EAC cells of 7th and 14th day of development as well as isolated CD44⁺ fraction.

Materials and methods. EAC cells were intraperitoneally introduced (3×10^6 cells) to BALB/c female mice and cultured *in vivo*. To the 7th and 14th day the EAC cell cultures (EAC-7 and EAC-14) were isolated, cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectants by two-stage program (1 deg/min rate down to -80°C , 300–400 deg/min from -80 down to -196°C). Cell population with CD44 marker was isolated by magnetic separation using magnetic sorter BD Imagnet (USA). Percentage of subpopulations with CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} markers was assessed with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA). Cell viability was assessed by propidium iodide (PI) staining. Expression level of *sox-2*, *nanog*, *oct-4* genes in total population of EAC-7 and EAC-14 cells in isolated CD44⁺ fraction and in left CD34⁻ fraction was determined by RT-PCR.

Results. The content of CD44^{high} precursors and more differentiated CD44⁺CD24⁻ cells in population of EAC cells of 7th culture day was significantly higher if compared with the EAC-14 cells. Freeze-thawing had an inhibiting effect on expression of surface phenotypic markers CD44^{high} in cell culture of both terms. Content of CD44⁺CD24⁻ cells increased especially in the 14th day culture. Activation of *sox-2*, *nanog* and *oct-4* genes expression after cold exposure in EAC cells total population and CD44⁺ isolated fraction testified to their key role in increasing number of tumor cells population.



Криоконсервирование единичных эпидидимальных и тестикулярных спермиев в микрообъеме

В.В. Подуфалий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
3-я городская больница, г. Львов

Cryopreservation of Single Epididymal and Testicular Spermatozoa in Microvolume

V.V. Podufaliy

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
City Hospital Nr. 3, Lviv, Ukraine

Широкое внедрение методики ICSI в клиническую эмбриологию позволило проводить оплодотворение единичными сперматозоидами пациентов с азооспермией после получения эпидидимальных и тестикулярных сперматозоидов [O. Hovatta, 1995]. В случае высокого риска повторного неполучения этого уникального генетического материала требуется криоконсервирование выделенных единичных сперматозоидов. Поэтому целью данной работы было изучение клинических параметров программы лечения бесплодия с применением криоконсервированных в микрообъеме эпидидимальных и тестикулярных спермиев.

Материалы и методы. Для криоконсервирования единичных сперматозоидов использовали микрокапилляры диаметром 120 мкм. Криоконсервирование осуществляли по двухэтапному методу [В.И. Грищенко, 2001]. Жизнеспособность сперматозоидов после размораживания оценивали по сохранению подвижности. В связи с азооспермией супруга у 58 супружеских пар была проведена программа ЭКО + ICSI с получением эпидидимальных спермиев, из них у 32 супружеских пар (группа 1) без криоконсервирования спермиев; у 26 – с применением криоконсервирования (группа 2).

Результаты исследования. Среднее количество спермиев в группах 1 и 2 составило $178,9 \pm 16,2$ и $171,2 \pm 18,6$, количество активно-подвижных спермиев – $12 \pm 0,8$ и $8 \pm 0,8\%$ соответственно. Выживаемость спермиев после криоконсервирования составила $92 \pm 8,8\%$. Было оплодотворено 178 и 171 ооциты на стадии МII, наличие пронуклеусов зарегистрировано в $94,8 \pm 7,87$ и $96,9 \pm 6,6\%$ клеток. Изучение морфологических характеристик эмбрионов на 5-е сутки культивирования показало высокую динамику дробления и качество эмбрионов: в группе 1 количество эмбрионов категории 3AA составило $55,0 \pm 4,0$, в группе 2 – $68,5 \pm 5,5\%$. Частота наступления беременности в группе с применением криоконсервированных спермиев составила 53,1, без криоконсервирования – 46,1%.

Выводы. Единичные эпидидимальные и тестикулярные сперматозоиды, несмотря на их незначительное количество и слабую подвижность, могут быть успешно криоконсервированы в микрообъемах, что дает возможность использовать их в лечении бесплодия методом ICSI.

Wide introduction of ICSI methods into clinical embryology practice allowed the fertilization with single spermatozoa of the patients with azoospermia after obtaining epididymal and testicular spermatozoa [O. Hovatta, 1995]. In the case if repeated obtaining of this unique genetic material is highly possible the cryopreservation of isolated single spermatozoa is needed. Therefore the aim of this investigation was to assess clinical parameters during infertility treatment protocols using epididymal and testicular spermatozoa cryopreserved in microvolume.

Materials and methods. For cryopreservation of single spermatozoa we used the capillaries of 120 μm diameter. Cryopreservation was performed according to two-stage method [V.I. Grischenko, 2001]. Post-thaw viability of spermatozoa was assessed by motility preservation. In 58 couples the IVF + ICSI with obtaining epididymal spermatozoa was performed due to husband azoospermia, including 32 couples without cryopreservation of spermatozoa (group 1), and 26 couples with cryopreservation (group 2).

Results. Mean number of spermatozoa in the first and second groups made 178.9 ± 16.2 and 171.2 ± 18.6 . The number of actively motile spermatozoa was 12 ± 0.8 and $8 \pm 0.8\%$, correspondingly. The post-thaw survival of spermatozoa made $92 \pm 8.8\%$. There were fertilized 178 and 171 oocytes at MII stage. The presence of pronuclei was found in 94.8 ± 7.87 and $96.9 \pm 6.6\%$ cells. Study of morphological characteristics of embryos to the 5th culturing day has shown a high dynamics of cleavage and the quality of embryos: in group 1 the number of embryos of 3AA category made 55.0 ± 4.0 and in the second one it was $68.5 \pm 5.5\%$. Frequency of pregnancy onset in the group with applying cryopreserved spermatozoa made 53.1% and in the group without cryopreservation it made 46.1%.

Conclusions. Single epididymal and testicular spermatozoa in spite of their small number and low motility can be successfully cryopreserved in microvolumes, providing their further use when treating infertility with ICSI method.



Выбор «хаускипинг-гена» для анализа уровня экспрессии генов методом количественной ОТ-ПЦР после криоконсервирования клеток

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Selection of Housekeeping Gene for Analysis of Gene Expression Level in Post-Thaw Cells Using Quantitative RT-PCR Method

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev

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

Криоконсервирование является эффективным способом долгосрочного хранения биообъектов, а также мультифакторным стрессом, который заключается в воздействии физических и химических факторов, обуславливающих, как следствие, множество изменений структурного и функционального характера в криоконсервированном материале. В результате этого может происходить модификация биообъекта, которая затрагивает не только метаболические процессы, но и самый низкий уровень их регуляции – геномный [B. Fuller, 2004]. Более того, различные режимы криоконсервирования могут по-разному влиять на работу генома одной и той же клетки.

На сегодня наиболее точным и чувствительным способом количественного определения изменений экспрессии генов является проведение обратной транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Определение относительного уровня представленности транскриптов позволяет сравнить контрольный и опытный экспериментальные образцы. При этом проводится нормирование общего количества РНК в образцах, которое позволяет нивелировать различия в количестве и/или качестве стартового материала, а также в условиях пробоподготовки. Для этого используют транскрипты «хаускипинг-генов», имеющих относительно стабильный уровень экспрессии во всех типах клеток, а также, предположительно, не поддающихся влиянию экспериментальных воздействий [Д. Ребриков, 2009]. Однако согласно данным литературы не существует такого «хаускипинг-гена», уровень экспрессии которого был бы стабильным при различных экспериментальных условиях [E. Spanakis, 1993; R. Hanafy, 2011]. Пока не существует данных о влиянии криоконсервирования на экспрессию «хаускипинг-генов», что не исключает ее изменение после замораживания-оттаивания.

Поэтому при использовании конкретного референсного гена необходимо экспериментально подтвердить постоянство уровня его представленности в исследуемых образцах. Вариантом решения такой задачи является параллельное определение уровня представленности транскриптов и их стабильности для нескольких «хаускипинг-генов». В результате такого исследования можно будет объяснить выбор референсного гена, наиболее подходящего для конкретного исследования, в частности для определенного режима криоконсервирования.

Cryopreservation is an effective method for long-term storage of bioobjects, on another hand it causes a multifactor stress consisting in physical and chemical exposures resulting in stipulation of multiple structural and functional changes in cryopreserved specimens. Finally these may lead to the bioobject modification affecting metabolic processes as well as the basic level of their regulation, the genome [B. Fuller, 2004]. Moreover, different cryopreservation regimens may affect the functioning of genome of the same cell in a various way.

Nowadays the real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is the most accurate and sensitive method of estimation of gene expression changes. Assessment of relative transcript representation allows to compare control and experimental samples. Total RNA amount in the samples is usually normalized, that enables to balance the differences in quantity and/or quality of initial material and during sample preparing as well. The transcripts of housekeeping genes are used for this purpose, they possess relatively stable expression in all cell types, as well as are presumably non-sensitive to experiment conditions [D. Rebrikov, 2009]. However there is no reports on housekeeping gene, which expression level is stable in different experimental conditions [E. Spanakis, 1993; R. Hanafy, 2011]. Moreover, there is no data on how cryopreservation affect housekeeping genes expression, but the post-thaw changes could not be excluded.

Thus, using the particular reference gene requires the experimental evidence for stability of its representation level in the studied samples. Simultaneous assessment of transcript representation level and their stability for some housekeeping genes is likely to solve this task. Such a research will allow to explain the selection of reference gene, the most appropriate for certain investigation, in particular, for specific cryopreservation regimen.



Стадии апоптоза ядродержащих клеток кордовой крови в зависимости от метода криоконсервирования

О.А. Михайлова, П.М. Зубов

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Apoptosis Stages in Cord Blood Nucleated Cells Depending on Cryopreservation Method

О.А. Mykhailova, P.M. Zubov

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Дифференциальная сканирующая тензодилатометрия в изучении процессов кристаллизации и плавления криопротекторных растворов

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Differential Scanning Tensodilatometry in Study of Crystallization and Melting of Cryoprotective Solutions

S.S. Sevastianov, A.I. Osetsky

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

В настоящее время установлено, что при охлаждении водных растворов с концентрацией глицерина, ДМСО, этиленгликоля, ПЭО-1500 в диапазоне 5–15% весовых образуются две кристаллические фазы (лёд и фаза β_c), окруженные прослойками из застекловывшейся жидкой фракции. Этот факт хорошо подтверждается термограммами и термопластическими кривыми, получаемыми при последующем отогреве замороженных растворов. На них чётко фиксируются процессы расстеклования аморфных фракций и отдельные пики плавления обеих кристаллических фаз. Однако природа фазы β_c , возникающей в охлаждаемых водных растворах криопротекторных веществ, до сих пор не определена. В то же время без установления природы второй твёрдой фазы нельзя сформулировать принципы построения диаграмм состояния криопротекторных растворов, что не позволяет определить возможные механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов, связанных с возникновением этой фазы.

Очевидно, что для решения данной проблемы необходимо привлекать дополнительные методы исследования, позволяющие регистрировать температурные зависимости наиболее важных термодинамических параметров, одним из которых является объём системы V . Объёмные эффекты – объективные показатели происходящих в системе фазовых превращений. Кроме того, образование (плавление) кристаллов льда сопровождается увеличением (уменьшением) объёма системы, а образование (плавление) кристаллической или аморфной матрицы из молекул криопротекторного вещества, напротив, – его уменьшением (увеличением). Этот факт даёт дополнительные возможности для изучения природы образующейся фазы β_c .

В связи с этим была исследована кинетика кристаллизации-плавления водных растворов глицерина и ПЭО-1500 с помощью объёмной сканирующей дилатометрии. На основании экспериментально полученных для этих растворов в диапазоне 20...–150°C зависимостей $V = V(T)$ сделаны следующие выводы:

– образование второй твёрдой фазы в охлаждаемых криопротекторных растворах имеет двухстадийный характер, что ингибирует её образование в процессе охлаждения и приводит к выраженному эффекту докристаллизации при последующем отогреве;

– у криопротекторных веществ, склонных к стеклованию (глицерин), докристаллизация в жидких фракциях сопровождается значительным увеличением суммарного объёма, что может приводить к механическому повреждению криоконсервируемых биообъектов [A.I. Osetsky *et al.*, 2007].

Nowadays It is established that cooling of aqueous solutions of glycerol, DMSO, ethylene glycol, PEO-1500 in the range of 5–15% (w/w) is accompanied by formation of two crystal phases (ice and β_c phase) surrounded by layers of vitrified liquid fraction. This fact is properly supported by thermograms and thermoplastic curves obtained by subsequent heating of frozen solutions. They clearly reflect devitrification processes in amorphous fractions and individual melting peaks of both crystal phases. However, it should be stated that the nature of the β_c phase appeared in the cooled aqueous solutions of cryoprotective substances has not been identified. At the same time, the principles of obtaining phase diagrams for cryoprotective solutions are not complete without determining the nature of the second solid phase. In addition, this does not allow to determine the possible mechanisms of freeze-thawing caused injury in biological objects, associated with the appearance of this phase.

It is obvious that to solve this problem there is a need of additional research methods allowing to register the temperature dependences of the most important thermodynamic parameters, one of which is the volume of system V . Volumetric effects are an objective indicator of phase transformations occurring in the system. Moreover, formation (melting) of ice crystals is accompanied by increase (decrease) of the system volume, and formation (melting) of crystal or amorphous matrix consisting of cryoprotectant molecules, on the contrary, by its decrease (increase). This fact provides additional possibilities in the study of the nature of β_c phase.

In this regard, we studied crystallization-melting kinetics of water solutions of glycerol and PEO-1500 using volumetric scanning dilatometry. On the basis of dependences $V = V(T)$ experimentally obtained for these solutions within the range of 20...–150°C the following conclusions were made:

– formation of the second solid phase in cooled cryoprotective solutions has two-stage character, which inhibits its formation during cooling and leads to a significant additional crystallization effect during subsequent heating;

– if the cryoprotective agents are able to vitrification (e.g. glycerol), in the liquid fractions, additional crystallization is accompanied by a significant increase in their total volume which may result in mechanical damage of cryopreserved bioobjects [A.I. Osetsky *et al.*, 2007].



Исследование антиоксидантной активности криопротекторов методом хемилюминесценции

И.В. Говор¹, Ю.С. Якименко²

¹НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, г. Харьков

²Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины, г. Харьков

Study of Cryoprotectant Antioxidant Activity by Chemiluminescence Method

I.V. Govor¹, Yu.S. Yakimenko²

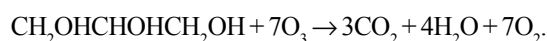
¹Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²L.T. Malaya Institute of Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Известно, что глубокое замораживание сопровождается активацией процессов окислительного повреждения в живых системах, что, помимо эффектов механического повреждения и других механизмов криповреждения клеток, приводит к дополнительному снижению их сохранности при криоконсервировании [L.K. Thomson *et al.*, 2009; C. Tatone *et al.*, 2010]. Снижение уровня окислительных повреждений путем модификации криозащитной среды может быть одним из способов повышения криорезистентности биологических объектов [K. Katerogu, 2012]. Целью данной работы было исследование антиоксидантного действия криопротекторов ДМСО и глицерина по отношению к плазме крови человека. Выбор плазмы крови в качестве исследуемого биологического объекта связан с более простым ее поведением при замораживании по сравнению с клетками – картина не осложняется таким явлением, как лизис клеток. Использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции при введении в систему озона как одной из активных форм кислорода (АФК).

В раствор люминола с концентрацией 5×10^{-5} М вводили озонированный физиологический раствор и регистрировали светосумму (площадь под кривой вспышки люминесценции). Светосумма вспышки уменьшается при введении в раствор люминола плазмы крови, что объясняется нейтрализацией части АФК антиоксидантными системами плазмы. Добавление криопротекторов, глицерина и ДМСО приводит к дополнительному снижению светосуммы вспышки хемилюминесценции. Следовательно, в присутствии криозащитных веществ происходит дополнительная нейтрализация АФК.

Известно, что озон разлагает одно- и многоатомные спирты до воды и углекислого газа. Например, окисление глицерина озоном происходит по следующей реакции:



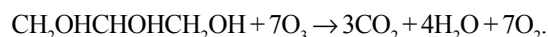
Другие криопротекторы также подвергаются глубокой деструкции под действием озона и других активных форм кислорода. При реакциях с озоном получаются озониды, причем озон присоединяется по месту двойной связи. Озониды, как правило, неустойчивы и легко разлагаются водой.

Таким образом, экспериментально показано, что криопротекторы глицерин и ДМСО оказывают антиоксидантное действие по отношению к плазме крови. Полученные результаты указывают на то, что антиоксидантное действие криопротекторов требует дальнейшего изучения с целью практического применения в криобиологии.

It is known that deep freezing is accompanied by activation of oxidative damage in living systems, that together with mechanical damage and other mechanisms of cell cryodamage induces additional decrease in their integrity following cryopreservation [L.K. Thomson *et al.*, 2009; C. Tatone *et al.*, 2010]. The decreased level of oxidative damage provided by modified cryoprotective medium can be one of the ways to raise bioobject cryoresistance [K. Katerogu, 2012]. The research aim was to study antioxidant effect of cryoprotectants DMSO and glycerol on human blood plasma. The selection of blood plasma as the investigated biological object was pre-conditioned by its simple behaviour during freeze-thawing if compared with the cells, and the observing is not complicated with such a phenomenon as cell lysis. We used the method of luminol dependent chemiluminescence and introduction of ozone into the system as one of reactive oxygen species (ROS).

Luminol solution of 5×10^{-5} M concentration was supplemented by ozonized physiological saline and the light sum was assessed (area under curve of luminescence burst). Light sum of burst decreased after introducing blood plasma into luminol solution, that could be explained by partial neutralization of ROS by plasma antioxidant systems. Introduction of cryoprotectants DMSO and glycerol caused an additional decrease in light sum of chemiluminescence burst. Therefore an additional neutralization of ROS occurred in the presence of cryoprotective substances.

Ozone is known to decompose mono- and polyatomic alcohols to water and carbon dioxide. For instance, oxidation of glycerol by ozone occurs as follows:



Other cryoprotectants are also exposed to deep destruction under effect of ozone and other reactive oxygen species. The reactions with ozone result in appearance of ozonides after binding of ozone to the double linkage site. Most ozonides are non-stable and easily dissociated by water.

Thus, the experiments shown that cryoprotectants glycerol and DMSO have antioxidant effect on blood plasma. The obtained results indicate that antioxidant effect of cryoprotectants requires the further studying aimed to practical application of these properties in cryobiology.



Исследование влияния оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ на конформационную стабильность гемоглобина человека

Ю.С. Говорова, А.В. Зинченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Influence of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree $n = 25$ on Conformational Stability of Human Hemoglobin

Yu.S. Govorova, A.V. Zinchenko

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

Консервирование биологических систем с использованием низких температур в последние десятилетия получило широкое развитие [А.М. Белоус, В.И. Грищенко, 1994]. Начальный этап криоконсервирования биологических объектов – инкубирование с криозащитными средами. Этот процесс может вызывать определенные изменения в пространственной организации белков, что отражается на их термоденатурации. Одним из прямых экспериментальных подходов в исследовании термоденатурации белков является дифференциальная сканирующая калориметрия, позволяющая оценить термодинамические и кинетические параметры плавления макромолекул [G. Bruylants, 2005]. Оксиглицированный глицерин со степенью полимеризации $n = 25$ (ОЭГ _{$n=25$}) – новый криопротектор экзоцеллюлярного действия, показавший хорошие результаты при криоконсервировании эритроцитов человека [А.М. Компаниец, В.В. Чеканова, 2012]. В настоящей работе методом дифференциальной сканирующей калориметрии на основе анализа пика плавления проведено исследование влияния ОЭГ _{$n=25$} на термодинамические и кинетические параметры денатурации гемоглобина человека. Концентрация криопротектора составляла от 0 до 50%.

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

Процесс денатурации гемоглобина (HbA) необратимый и описывается двустадийной моделью $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$, включающей частичное обратимое разворачивание белка (стадия 1) и необратимую денатурацию (стадия 2) [P.S. Santiago, 2010]. Кинетический анализ проводился согласно методике, приведенной в литературе для подобных моделей денатурации белков [А. Любарев, 2000].

Нами были рассчитаны температуры, калориметрические энтальпии, а также энергии активации процесса денатурации гемоглобина в зависимости от концентрации криопротектора. Показано, что повышение концентрации ОЭГ _{$n=25$} в растворе гемоглобина приводит к понижению стабильности пространственной структуры белка. Проведен сравнительный анализ влияния на конформационную стабильность гемоглобина криопротекторов ОЭГ _{$n=25$} и ОЭГ _{$n=5$} .

Preservation of biological systems using low temperatures has been widely developed in the last decades [A.M. Belous, V.I. Grischenko, 1994]. The initial stage of cryopreservation of biological objects is incubating in cryoprotective media. This process can cause some changes in the spatial organization of proteins, reflected in their thermodenaturation features. One of the direct experimental approaches in the study of proteins thermodenaturation is differential scanning calorimetry that permits to assess the thermodynamic and kinetic parameters of macromolecules melting [G. Bruylants, 2005]. Oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 25$ (OEG _{$n=25$}) a new cryoprotectant with exocellular affect, revealed good effect for the cryopreservation of human erythrocytes [A.M. Kompaniets, V.V. Chekanova, 2012]. Differential scanning calorimetry was applied to study the influence of OEG _{$n=25$} on the thermodynamic and kinetic parameters of the denaturation of human hemoglobin on the basis of melting peak analysis.

Thermograms were recorded on a differential scanning adiabatic microcalorimeter DASM-4 (Russia). Scan area was from 25 to 90°C at a excess pressure of 2.5 atm. Heating rate was 1 deg/min.

The process of denaturation of hemoglobin (HbA) is irreversible and is described by two-stage model $N \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} U \xrightarrow{k_2} D$, including the partial reversible unfolding of the protein (Stage 1) and the irreversible denaturation (Stage 2) [P.S. Santiago, 2010]. The kinetic analysis was carried out according the technique reported for similar models of proteins denaturation [A. Lyubarev, 2000].

We calculated temperatures, calorimetric enthalpies and activation energies of hemoglobin denaturation depending on concentration of cryoprotectant. It was shown that increasing of OEG _{$n=25$} concentration in hemoglobin solution led to the decreasing of the stability of protein spatial structure. Comparative analysis of the influence of OEG _{$n=25$} and OEG _{$n=5$} cryoprotectants on hemoglobin conformational stability was also carried out.



Влияние замораживания на антиагрегационные свойства экстрактов плаценты

М.А. Вакарчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Freezing on Placenta Extract Anti-Aggregation Properties

M.A. Vakarchuk

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

Плацента человека содержит большое количество биологически активных веществ, которые определяют перспективу использования плаценты и ее экстрактов. Экстракты плаценты человека (ЭПЧ) обладают противовоспалительными, иммуностимулирующими, репаративными и другими терапевтическими свойствами. В последние годы для оценки биологической активности различных веществ часто используются результаты их влияния на отдельные клетки. Например, снижение уровня агрегации тромбоцитов, вызванной адреналином, связывают с противовоспалительным действием лекарственных препаратов. Существенными ограничениями для использования тканей плаценты является короткий срок хранения из-за развивающегося, даже в условиях гипотермии, аутолиза, а также изменение в связи с этим состава и свойств экстрактов. Применение методов низкотемпературного хранения позволяет расширить перспективы использования ткани плаценты в медицине. Однако процессы замораживания-оттаивания, а также низкотемпературного хранения могут приводить к значительной трансформации свойств биологических объектов вследствие конформационных изменений макромолекул, а также повреждения клеток ткани.

В данной работе было исследовано влияние замораживания-оттаивания на способность экстрактов плаценты снижать агрегацию тромбоцитов.

ЭПЧ получали из плацент (срок беременности 40 недель) от рожениц с их информированного согласия; плазму, богатую тромбоцитами, получали из цельной крови доноров-мужчин (A β (II) Rh⁺) путем центрифугирования в течение 15 минут при 100g; эритроциты человека – из цельной донорской крови (мужчины AB (II) Rh⁺) с помощью центрифугирования и отмывания физиологическим раствором.

Для исследования влияния ЭПЧ на степень агрегации тромбоцитов плазму, богатую тромбоцитами, инкубировали в течение 10 мин с ЭПЧ (из свежей плаценты и плаценты после замораживания-оттаивания) или отдельными фракциями при температуре 37°C. После чего к экспериментальным образцам добавляли адреналин в концентрации 5 мМ. Уровень агрегации тромбоцитов определяли спектрофотометрически на длине волны 650 нм.

Установлено, что замораживание до –20 и –196°C и последующее оттаивание не приводило к потере свойств ЭПЧ и отдельных фракций снижать степень агрегации тромбоцитов по сравнению со свежим экстрактом. Кроме того, были выявлены фракции экстракта с указанными свойствами.

Human placenta and its preparations are of prospect for application in clinical practice due to a high concentration of bio-active substances. Human placenta extract (HPE) is known to have anti-inflammatory, immune-stimulating, reparative as well as other therapeutic properties. Different biological models are used in order to assess biological activity of various bioactive substances. Among them is the reducing of platelet adrenalin induced aggregation may testify to anti-inflammatory effect of the preparation. A major barrier for clinical usage of placental material appears to be a short admissible period of time between procurement and application of the material, due to autolysis occurring even under hypothermic storage of the tissue, as well as following changes in composition and properties of the extracts. Application of low temperature preservation would allow to widen the prospects of application of placenta tissues. However, freeze-thawing process as well as low temperature storage may lead to significant alterations of biological object properties due to macromolecule conformational changes and tissue cell damage.

The research aim was to investigate the freeze-thawing influence on ability of HPE to reduce platelet aggregation.

HPEs were obtained from placentas (40 weeks of gestation term), derived from maternity patients after their informed consent. Platelet rich plasma was procured from whole blood of male donors (A β (II) Rh⁺) by means of centrifugation at 100g during 15 min. Human erythrocytes were obtained from whole donor blood (male AB (II) Rh⁺) by centrifugation and washing with physiological solution.

In order to investigate the effect of HPE on platelet aggregation, platelet rich plasma was incubated for 10 min with HPE (from fresh or frozen-thawed placenta) or its isolated fractions at 37°C. Thereafter the specimens were supplemented with adrenalin of 5 μ M concentration. Level of platelet aggregation was measured spectrophotometrically at 650 nm.

It was found that freezing down to –20°C and –196°C and following thawing did not change the ability of HPE and separate fractions to decrease the platelet aggregation comparing to the fresh extract. The extract fractions possessing such properties have been found.



Адаптивный ответ на окислительный стресс и устойчивость к холодовым воздействиям дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

И.П. Горячая

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Adaptive Response to Oxidative Stress and Resistance to Cold Exposures of *Saccharomyces cerevisiae* yeast

I.P. Goriachaya

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

Способность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к адаптации и их ответ на холодовой и окислительный стресс представляют интерес для фармацевтической, медицинской, пищевой промышленности и для биотехнологий, связанных с ферментативными процессами. Целью данной работы было исследование способности клеток *S. cerevisiae* противостоять действию озона, как одной из активных форм кислорода, и влияния обработки клеток озоном на повреждение мембран при замораживании-отогреве. Реакцию клеток на озон регистрировали методом хемилюминесценции, повреждение мембран – методами флуоресцентной микроскопии и цитофлуориметрии с использованием флуоресцентного зонда K8-3010 («SETA BioMedicals», США).

Установлено, что по характеру реакции клеток *S. cerevisiae* на озон можно выделить три диапазона доз: низкие $(1,3-4,2) \times 10^{-17}$ моль O_3 /кл.; средние $(4,2-24) \times 10^{-17}$ моль O_3 /кл.; высокие – более 30×10^{-17} моль O_3 /кл. Клетки *S. cerevisiae*, обработанные озоном в низких дозах (около 10^{-17} моль O_3 /кл.), лучше восстанавливают свои показатели деления и роста после замораживания-отогрева. Действие озона можно объяснить ответной реакцией живой системы на низкие дозы раздражителя, так называемым гормезисом. В диапазоне средних доз наблюдается обратимое торможение деления и роста клеток, при высоких дозах – апоптоз и некроз клеток.

Для объяснения отличий действия озона на клетки в разных дозах исследовали общую антиоксидантную активность клеток как показатель способности клеток противостоять влиянию активных форм кислорода.

В суспензию клеток вводили порции озона в дозе 3×10^{-17} моль/кл. После введения каждой порции регистрировалась вспышка хемилюминесценции. Амплитуда каждой вспышки не изменялась, пока суммарная доза введенного озона не достигала около 10^{-16} моль/кл. При увеличении суммарной дозы озона выше $1,62 \times 10^{-16}$ моль/кл. наблюдалось снижение амплитуды каждой последующей вспышки хемилюминесценции вплоть до полного исчезновения люминесцентного ответа клеток на озон.

Показано, что устойчивость клетки к действию озона проявляется при такой степени оксидативного стресса, при которой ресурсы системы антиоксидантной защиты не исчерпаны и клетка способна нейтрализовать избыточный индуктор оксидативного стресса.

Ability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast to adaptation and their response to cold and oxidative stress is of interest for pharmaceutical, medical, food industries and biotechnologies associated with the enzymatic processing. The research aim was to study the ability of *S. cerevisiae* cells to resist the effect of ozone as one of reactive oxygen species as well as how treatment of cells with ozone affect membrane damage during freeze-thawing. Cell response to ozone was recorded by chemiluminescence method. Membrane damage was assessed by fluorescent microscopy and flow cytometry using fluorescent probe K8-3010 (SETA BioMedicals, USA).

We have revealed that by the response of *S. cerevisiae* cells to ozone could be divided to three dose ranges depending on the character of reactions: low doses $(1.3-4.2) \times 10^{-17}$ mol O_3 /cell, medium doses $(4.2-24) \times 10^{-17}$ mol O_3 /cell and high ones – more than 30×10^{-17} mol O_3 /cell. In case if *S. cerevisiae* cells were treated with ozone in low doses (about 10^{-17} mol O_3 /cell) its division and growth after freeze-thawing were restored better. Ozone effect could be explained by the response of living system to low doses of irritant, what is referred to as 'hormesis'. Within the range of medium doses we observed a reversible inhibition in division and growth of cells, when high doses were applied the apoptosis and necrosis of cells were found.

To find out the differences in ozone effect on cells between different doses we investigated general antioxidant activity of cells as a measure of cell ability to resist the action of reactive oxygen species.

Cell suspensions were supplemented by ozone portions in dose of 3×10^{-17} mol/cell. After administration of each portion the burst of chemiluminescence was recorded. Amplitude of each burst was not changed until total dose of introduced ozone reached the value of about 10^{-16} mol/cell. When the total dose of ozone was higher than 1.62×10^{-16} mol/cell we noted the decrease in amplitude of each following chemiluminescence burst until complete disappearance of luminescent cell response to ozone introduction.

We have shown that resistance of the cells to ozone effect was manifested at such degree of oxidative stress when the resources of antioxidant defence system were not exhausted and cells were able to neutralize an excessive inducer of oxidative stress.



Ферментативные свойства иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения

О.М. Бабинец

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Enzymatic Properties of Probiotics Immobilized on Enterosorbents after Low-Temperature Storage

O.M. Babinets

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

Для профилактики и комплексного лечения дисбиозов кишечника применяют пробиотические препараты, среди которых наиболее эффективны синбиотики. Большой интерес уделяют разработке синбиотиков с применением иммобилизации микроорганизмов на/в различных носителях. Ранее нами было показано, что пробиотики, иммобилизованные на углеродсодержащих энтеросорбентах, способствуют более быстрому и эффективному восстановлению микрофлоры кишечника и эрадикации патогенных микроорганизмов при экспериментальном химиотерапевтическом дисбиозе. Пробиотические микроорганизмы должны иметь технологические характеристики, в частности это ферментация и ассимиляция различных углеводов, кислотообразование. Данные характеристики иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков ранее не изучали.

Целью исследования являлось изучение спектра и интенсивности ферментации и ассимиляции углеводов комплексами «носитель-клетки» после хранения при температурах -20 , -80 , -196°C . Объектами исследования были дрожжи *Saccharomyces boulardii*, бактерии *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 и *Lactobacillus bulgaricus* 1ZO3501, иммобилизованные на энтеросорбентах «Сорбекс» и «СУМС-1». Изучали ферментативные свойства изолированных комплексов «носитель-клетки», полученных по разработанному нами ранее методу. Ферментативные свойства бактерий *B. bifidum* и *L. bulgaricus* определяли с помощью коммерческих наборов API 50 CHL («bioMerieux», Польша), а *S. boulardii* – API-ZYM («bioMerieux»). Кислотообразующую активность бактерий исследовали по методу Тернера.

Было установлено, что после хранения при указанных температурах в течение 6 месяцев (срок наблюдения) спектры ферментации и ассимиляции углеводов не изменялись. После хранения при -80 и -196°C показатели интенсивности кислотообразования, ферментации и ассимиляции углеводов не отличались от исходных показателей, а после хранения при -20°C достоверно снижались.

Prophylaxis and complex treatment of intestinal dysbioses usually involves variety of probiotics, the most effective among which are synbiotics. Of a great interest is the development of synbiotics using immobilization of microorganisms on/in different carriers. Recently we have shown that probiotics immobilized on carbon enterosorbents contribute to more rapid and effective recovery of intestinal microflora and eradication of pathogenic microorganisms at experimental chemotherapeutic dysbiosis. Probiotic microorganisms should possess technological characteristics, in particular fermentation and assimilation of various carbohydrates and acid production. These characteristics of probiotics immobilized on enterosorbents have not been studied yet.

The research aim was to analyze the spectrum and intensity of fermentation and assimilation of carbohydrates by carrier-cells complexes after storage at -20 , -80 , -196°C . Research objects were *Saccharomyces boulardii* yeast, *Bifidobacterium bifidum* LVA-3 bacteria and *Lactobacillus bulgaricus* 1ZO3501 immobilized on enterosorbents Sorbex and SUMS-1. We studied enzymatic properties of isolated carrier-cells complexes derived by developed method. Enzymatic properties of *B. bifidum* and *L. bulgaricus* bacteria were determined with commercial kits API 50 CHL (bioMerieux, Poland), and *S. boulardii* were assessed with API-ZYM (bioMerieux). Acid-productive activity of bacteria was studied by Turner's method.

We have found that storage under the mentioned temperatures during 6 months (observation term) did not changed the spectra of fermentation and assimilation of carbohydrates. Storage at -80 and -196°C the intensities of acid production, fermentation and assimilation of carbohydrates were not changed if compared to the initial indices, and after storage at -20°C were insignificantly decreased.



Влияние ритмического экстремального охлаждения (-120°C) и ядродержащих клеток кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у молодых и старых крыс

Ю.В. Руднева, В.Г. Бабийчук, Е.А. Чернявская

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Rhythmic Extreme Cooling (-120°C) and Cord Blood Nucleated Cells on Functional State of Neurohumoral Regulation System in Young and Old Rats

Yu.V. Rudnyeva, V.G. Babychuk, E.A. Chernyavskaya

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

Важнейшей социальной и медико-биологической проблемой является преждевременное старение организма человека. Одна из главных задач практического здравоохранения – поиск методов, способных повысить индивидуальную устойчивость организма в пожилом возрасте к развитию сопутствующих старению заболеваний. С появлением адекватной медицинской техники появилась возможность для терапевтического применения экстремально низких температур (-120°C) [А.Г. Шиман и др., 2001]. Успешное развитие клеточно-тканевой терапии [L. Roccanova, P. Ramphal, 2003] открывает новые перспективы для медицины. Целью работы было изучить влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий (РЭХВ) и препарата ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых и старых крыс.

Исследования проводили на белых молодых и старых беспородных крысах-самцах (возраст 6 и 28–30 месяцев). Каждая возрастная группа животных была разделена на две подгруппы: первая – интактные; вторая – животные, которым проводили РЭХВ (в криокамере) и вводили препарат ЯСК КК. Было проведено 9 сеансов охлаждения по 2 минуты при -120°C . Криоконсервированный препарат ЯСК КК вводили после 6- и 9-й процедуры охлаждения. Состояние вегетативного статуса организма крыс оценивали с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм» после 3-, 6- и 9-го сеанса РЭХВ, а также через неделю и месяц после введения ЯСК КК.

Установлено, что у контрольных старых животных значения общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции (ТР) были ниже, чем у молодых. У крыс после 3- и 6-й процедуры охлаждения показатели ТР значительно возрастали по отношению к контролю. На фоне активации гуморального звена регуляции повышался тонус симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы (ВНС). У животных, получивших 9 сеансов РЭХВ в сочетании с введением ЯСК КК, в структуре ТР преобладала активность парасимпатического отдела ВНС. Проведенный анализ экспериментальных данных по сочетанному влиянию РЭХВ и ЯСК КК в отдаленные сроки наблюдения показал существенное увеличение ТР как по отношению к контролю, так и более ранним срокам за счет повышения активности вегетативных центров и гуморального звена регуляции.

Таким образом, можно предположить, что сочетанное применение РЭХВ и ЯСК КК способно значительно повышать адаптационные возможности организма независимо от возраста животных и благодаря общему специфическому воздействию на гомеостатические регуляторные системы.

The most important social, medical and biological problem is the premature aging of the human organism. One of the main tasks of practical public health care is the search for methods capable to increase an old organism individual resistance to the development of age-related diseases. Emerging of appropriate medical technology provided the possibility of the therapeutic application of extremely low temperatures (-120°C) [A.G. Schiman *et al.*, 2001]. Successful development of cell and tissue therapy [L. Roccanova, P. Ramphal, 2003] is extremely promising for medical purposes. The aim of this study was to assess the effect of rhythmic extreme cold exposures (RECEs) and the preparation of cord blood nucleated cells (CB NCs) on the state of the vegetative control of cardiac rhythm in young and old rats.

The studies were performed in young and old breedless white male rats (age of 6 and 28–30 months). Each age group of animals was divided into two subgroups: the first comprised intact animals, the second was the animals who received RECEs (in cryochamber) and were injected the preparation of CB NCs. Animals were cooled (at -120°C) totally 9 times, and 2 minutes each. Cryopreserved preparation of CB NCs was injected after the 6th and 9th cooling procedures. The state of vegetative status of rat organisms was evaluated using the Poly-Spectrum-Rhythm software after the 3rd, 6th, 9th RECEs session, as well as one week and one month after injection of CB NCs.

It has been found that the values of the total spectral power of neurohumoral regulation (TP) in the old control animals were significantly lower than in the young rats. In rats after the 3rd and 6th cooling procedure the TP indices were significantly higher comparing to the control. On the background of activation of humoral regulation there was increased sympathetic and parasympathetic tone of vegetative nervous system (VNS). The animals, underwent 9 sessions of RECEs combined with the injection of CB NCs, showed the prevalence of activity of VNS parasympathetic division in the structure of TP. The analysis of experimental data of the combined effects of RECEs and CB NCs during long-term observation showed more significant increase in TP in comparison to the control as well as to the previous periods, due to increased activity of the autonomic centers and humoral regulation.

Thus, we can assume that the combined use of RECEs and CB NCs could improve significantly an organism adaptive abilities, regardless of animal age due to general specific effects on homeostatic regulatory systems.



Критерии лабораторных показателей при общей воздушной криотерапии

Е.В. Павлова

ГУ «Научно-практический медицинский реабилитационно-диагностический центр МЗ Украины», г. Донецк

Criteria of Laboratory Indices During General Air Cryotherapy

E.V. Pavlova

Medical Rehabilitation and Diagnostic Center of the Ministry of Health Care of Ukraine, Donetsk, Ukraine

В последние годы значительно большее внимание уделяется методике общей криотерапии. С прогрессом науки холод с успехом применяют для лечения многих заболеваний [В.И. Грищенко, 1974]. Криотерапия своим лечебным воздействием обязана активации защитной реакции человеческого организма на резкое изменение окружающей среды: гипотермия провоцирует мозг на запуск защитных механизмов, тем самым стимулируя работу иммунитета.

Материалы и методы. Исследование проведено на базе ГУ «НПМ РДЦ МЗ Украины» с использованием криокамеры «Zimmer Medizin Systeme» (Германия), в которой достигается температура $-110...-113^{\circ}\text{C}$. Курс криотерапии составлял 20 сеансов. В исследовании приняли участие 65 человек: 43 женщины (66%) и 22 мужчины (34%) возрастом 36–50 лет. Перед началом криотерапии и после окончания курса проводилась комплексная оценка лабораторных показателей.

Результаты. На основании полученных анализов крови после курса общей криотерапии установлены увеличение числа эритроцитов и концентрация в них гемоглобина, уменьшение количества тромбоцитов, снижение СОЭ по сравнению с показателями до криотерапии. Изучение биохимических показателей крови выявило достоверное снижение уровня общего холестерина, сахара крови, триглицеридов, β -липопротеидов. Показатели коагулограммы после курса общей криотерапии изменились следующим образом: снизился уровень фибриногена и протромбина, достоверно увеличилось активированное время рекальцификации, понизилась толерантность плазмы к гепарину. Исследование иммунологических показателей выявило постепенное снижение уровня кортизола, увеличение количества иммунных клеток (Т- и В-лимфоцитов), превышение исходных значений среднего содержания IgA, IgM в сыворотке крови обследуемых.

Выводы. Под действием холода в организме происходит стимуляция защитных систем организма. Повышение концентрации IgA, IgM свидетельствует о реакции иммунной системы на температурный стресс, проявляющейся в тенденции к нормализации количественного соотношения пулов Т- и В-лимфоцитов. Даже кратковременное воздействие на организм экстремально низкой температуры воспринимается как мощный стресс, который мобилизует и усиливает все защитные функции, активизирует биохимические и иммунные реакции. Постепенное снижение уровня кортизола в крови пациентов свидетельствует о снижении стресса, а также об адаптации организма человека к экстремально низкой температуре.

Methods of general cryotherapy are getting greater emphasis nowadays. Progress of science contribute to successful application of cold for treating many diseases [V.I. Grischenko, 1974]. Curative effect of cryotherapy is due to activation of protective response of human organism onto a sharp changes in environment: hypothermia provokes brain to initiate protective pathways, thereby stimulating the immune activity.

Materials and methods. The study was performed at the base of Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center of the Ministry of Health Care of Ukraine using cryochamber Zimmer Medizin Systeme (Germany) with low temperatures of $-110...-113^{\circ}\text{C}$. Cryotherapy course made 20 sessions. The research involved 65 persons: 43 women (66%) and 22 men (34%) of 36–50 years. Prior to cryotherapy and after finishing the course the laboratory tests were performed.

Results. Basing of the blood counts we revealed the rise in the number of erythrocytes and concentration of hemoglobin, reduction of the number of platelets, reduced erythrocyte sedimentation rate after general cryotherapy course. Analysis of blood biochemical indices revealed a statistically significant decrease in the level of total cholesterol, blood sugar, triglycerides, β -lipoproteids. Coagulogram indices after general cryotherapy changed in the following way: fibrinogen and prothrombin levels were reduced, activation time of recalcification was significantly increased, plasma tolerance to heparin was reduced. Estimation of immunological indices revealed gradual reduction of cortisol level, increased number of immune cells (T- and B-lymphocytes), average content of IgA, IgM in patients' blood serum also exceeded the initial values.

Conclusion. Cold effect on an organism stimulated its protective systems. The rise in the concentration of IgA, IgM testified to a response of immune system to temperature stress, that was manifested in the tendency to normalizing of quantitative ratio in the T and B cell pools. Even short-time effect of extremely low temperature on an organism was recognized as a powerful stress, mobilizing and increasing all protective functions, activating biochemical and immune reactions. Gradual reduction in cortisol level in patients' blood testified to a decreased stress as well as to adaptation of human organism to extreme low temperature.



Электрокардиофизиологические показатели при охлаждении головы и шеи

А.В. Трофимова, Н.А. Чиж, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Electrocardiophysiological Indices When Cooling Head and Neck

A.V. Trofimova, N.A. Chizh, B.P. Sandomirsky

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

Ежегодно сотни тысяч человек умирают от инфаркта миокарда и инсульта, которые развиваются на фоне гипоксического повреждения клеток головного мозга и сердца. Ведущие медицинские организации мира включили терапевтическую гипотермию в протоколы реанимации больных как основной эффективный метод кардио- и нейропротекции [A. Schneider, 2006].

Цель работы – изучение электрокардиографических показателей в условиях гипотермии.

Работа проведена на 15 беспородных крысах-самцах, разделенных на 2 группы: нормотермия (контроль) – 5 животных и гипотермия – 10 животных. Система для индукции гипотермии состояла из емкости с 40%-м охлажденным раствором этилового спирта объемом 1000 мл, воротника, охватывающего часть головы и шеи (вокруг магистральных сосудов), и емкости для сбора хладагента. Экспериментальные животные находились под ингаляционным наркозом в течение 60 мин. Измеряли ректальную, тимпаническую и локальную температуру кожи воротниковой зоны. Температурные показатели регистрировали с помощью цифрового электронного термометра MP 707 и 2-канального USB осциллографа с термодатчиками. Электрокардиограммы регистрировали на аппаратно-программном комплексе «Полиспектр-8/В» (Россия).

В контрольной группе при введении животного в наркоз и нахождении в течение 60 мин под наркозом ректальная температура снижалась с 34,5 до 32°C, тимпаническая – с 35 до 30°C, температура кожи воротниковой зоны – с 32 до 30,5...31°C. В группе гипотермии показатели разности температур воротниковой зоны и температуры самой воротниковой зоны находились в пределах 4...5°C. Значения ректальной и тимпанической температуры снижались со скоростью 0,1 град/мин. В норме у крыс на электрокардиограммах фиксировали правильный синусовый ритм. Частота сердечных сокращений (ЧСС) в норме составляла 354/мин, а в группе нормотермии через 60 мин анестезии она увеличивалась до 381/мин. После проведения гипотермии ЧСС снижалась на 16% от исходного показателя, на ЭКГ при этом отмечали удлинение интервала R-R. Стандартное отклонение (SDNN) в обеих группах в течение 60 мин увеличилось в 2,3–2,5 раза. Гипотермия привела к перераспределению влияния симпатической и парасимпатической вегетативной нервной системы (последней с 15 до 36%).

При достижении режима локальной температуры 4°C воротниковой зоны у крыс снижалась как ректальная, так и тимпаническая температура, что свидетельствовало об эффективности данного способа охлаждения. При анализе вариабельности сердечного ритма выявлено, что гипотермия способствует смещению баланса вегетативной нервной системы в сторону ее парасимпатического отдела.

Hundred thousands people are dying from heart and brain strokes, developed on a background of hypoxic injury of brain and heart cells. Leading medical institutions of the world have included a therapeutic hypothermia into the protocols of patients' rehabilitation as the main effective method for cardio- and neuroprotection [A. Schneider, 2006].

The research aim was to study electrocardiographic indices under hypothermia conditions.

The study was performed in 15 white breedless male rats divided into 2 groups: normothermia (control) – 5 animals, and hypothermia – 10 animals. The device for inducing hypothermia consisted of 1000 ml vessel filled with 40% cooled solution of ethyl alcohol, collar covering the part of head and neck (around the main vessels) and the vessel for collecting a coolant. Experimental animals were subjected to inhalation anaesthesia for 60 min. Rectal, tympanic and skin (in the collar zone) temperatures were measured. Temperature indices were recorded using digital electronic thermometer MP 707 and 2-channel USB oscillograph with thermocouples. Electrocardiograms were recorded by means of hardware-software complex Polispекtr (Russia).

Control group animals being in the state of anaesthesia 60 min had rectal temperature changed from 34.5 down to 32°C, tympanic temperature decreased from 35 down to 30°C, and skin temperature in collar zone fell from 32°C down to 30.5...31°C. In the group of hypothermia the difference of temperatures of collar zone and temperature of collar zone itself were within 4–5°C. Rectal and tympanic temperatures decreased with the rate of 0.1 deg/min. Normal electrocardiograms in rats had regular sinus rhythm. Frequency of heart beats made 354 per min in the norm, and after 60 min of anaesthesia in the group of normothermia the index increased up to 381 per minute. After 60 min of hypothermia the heart beat frequency reduced by 16% from initial value, moreover ECG represented elongated R-R interval. Standard deviation (SDNN) in the groups with normothermia and hypothermia increased 2.3–2.5 times after 60 min. Hypothermia led to redistribution the control between sympathetic and parasympathetic vegetative nervous system (from 15 to 36% in favour of the latter).

Thus, when achieving the local temperature 4°C in the collar zone both rectal and tympanic temperatures reduced in the rats, testifying to the efficiency of this method of cooling. Analysis of the cardiac rhythm variability revealed that hypothermia contributed to the change in the balance in vegetative nervous system towards parasympathetic department.



Исследование морфологии миокарда крыс в условиях экспериментального некроза сердца

Т.В. Шканд, Н.А. Чиж, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Rat Myocardium Morphology at Experimental Heart Necrosis

T.V. Shkand, N.A. Chizh, B.P. Sandomirsky

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

Инфаркт миокарда (ИМ) является одним из грозных осложнений ишемической болезни сердца, которое приводит к инвалидизации и смертности населения [В.А. Люсов, 2010]. Этим обусловлена необходимость дальнейшего изучения механизмов развития данной патологии с целью улучшения профилактики и лечения ИМ. Для этого исследования по изучению патогенеза и протекания ИМ должны базироваться на адекватных экспериментальных моделях. Цель работы – изучение морфологических особенностей развития некроза и ремоделирования сердца после повреждения миокарда на моделях механической перевязки левой коронарной артерии, крионекроза сердечной мышцы и токсического воздействия на миокард адреналином.

Материалы и методы. Работу выполняли на 105 беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Оперативные вмешательства проводили под ингаляционным наркозом на спонтанном дыхании. Ишемический некроз миокарда (НМ) моделировали путем перевязки левой коронарной артерии проленовой нитью №6.0 [А.Г. Бабаева и соавт., 2012]. Криовоздействие на стенку левого желудочка выполняли азотным инструментом при температуре рабочей поверхности аппликатора –195°C [И.В. Слета и соавт., 2011]. Для формирования токсического поражения миокарда подкожно вводили адреналин в дозе 0,5 мг/100г животного [С.Л. Богородская и соавт., 2006]. Морфологические исследования сердца проводили по гистологическим срезам методом световой микроскопии с помощью микроскопа МТ 4000 с программным обеспечением для анализа изображений «BioVision ver. 4.0». При морфологическом исследовании визуально оценивали стромально-кардиомиоцитарное состояние гистологических образцов тканей (форму кардиомиоцитов, диаметр просвета сосудов, их кровенаполнение и состояние периваскулярных интерстициальных пространств). Иммуногистохимически определяли экспрессию антигена p53 в кардиомиоцитах и исследовали апоптотический индекс кардиомиоцитов в миокарде, прилежащем к зоне некроза.

Результаты. Установлено, что криодеструкция сердца приводила к появлению некротической зоны в миокарде без ишемической фазы воспаления, при этом глубина поражения сердечной мышцы напрямую зависела от длительности криовоздействия. Перевязка коронарной артерии способствовала формированию ишемического некроза миокарда в зоне бассейна лигированного сосуда с ярко выраженными дисциркуляторными нарушениями. Очаговое поражение миокарда, возникающее после введения токсических доз адреналина, было сосредоточено вокруг артериальных сосудов, что впоследствии приводило к периартериальной пролиферации фибробластов и формированию грануляционной ткани. Во всех исследуемых группах с 7-х суток эксперимента отмечалась экспрессия антигена p53.

Myocardial infarction (MI) is one of severe complications of ischemic heart disease leading to disability and mortality in population [V.A. Lyusov, 2010]. This dictates the necessity of further study of the mechanisms of this pathology development with the aim of improving the prophylaxis and treatment of MI. Therefore the studies on investigation of pathogenesis and the course of MI should be based on adequate experimental models. The aim was to study morphological peculiarities of necrosis development and heart remodelling after lesion of myocardium in the models of mechanical ligation of left coronary artery, cryonecrosis of cardiac muscle and toxic effect on myocardium with adrenalin.

Materials and methods. The work was performed in 105 breedless white male rats of 200–250g. Surgical interventions were done under inhalation anaesthesia on spontaneous respiration. Ischemic myocardial necrosis (MN) was simulated by ligation of left coronary artery with prolene thread N6.0 [A.G. Babayeva *et al.*, 2012]. Cryoeffect to the wall of left ventricle was performed with nitrogen-cooled instrument with applicator surface operating temperature of –196°C [I.V. Sleta *et al.*, 2011]. Adrenalin was subcutaneously introduced adrenalin in a dose of 0.5 mg/100g of an animal to form a toxic lesion of myocardium [S.L. Bogorodskaya *et al.*, 2006]. Morphological studies of heart were carried-out in histological sections by means of light microscope MT 4000 Series and BioVision ver. 4.0 software. Morphological study involved visual assessment of stroma and cardiomyocytes in histological tissue sections (shape of cardiomyocytes, diameter of vessel lumen, blood filling and state of perivascular interstitial spaces). The expression of antigen p53 was assessed immunohistochemically in cardiomyocytes and apoptotic index of cardiomyocytes was calculated for the myocardium adjacent to a necrosis zone.

Results. It has been established that cryoeffect to heart led to the appearance of necrotic zone in myocardium with no ischemic inflammation phase, herewith the depth of cardiac muscle damage directly depended on cryoeffect duration. The ligation of coronary artery contributed to the formation of ischemic necrosis of myocardium in the zone of ligated vessel circulation with manifested discirculatory disorders. Focus lesion of myocardium resulted from the introduction of toxic adrenalin doses was located around arterial vessels, which later led to periarterial proliferation of fibroblasts and formation of granulation tissue. In all the studied groups starting from the 7th day of experiment the expression of p53 antigen was noted.



Дозозалежний вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі

І.Г. Беспалова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Dose-Related Effect of Extract of Cryopreserved Newborn Piglet Skin Fragments on Metabolic Activity of Skin Fibroblasts in Culture

I.G. Bespalova

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

Дослідження тканинспецифічності та дозозалежності впливу екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕШП) на метаболічну активність фібробластів шкіри дозволяє з'ясувати механізм їх дії і визначити можливості культивування клітин у середовищах з меншим вмістом ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Зниження концентрації сироватки в середовищі культивування зменшує ризик інфікування культури та можливої імунної відповіді при експериментальному або клінічному застосуванні фібробластів.

Мета роботи – вивчити дозозалежний вплив ЕШП на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі.

Екстракт одержували з кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят при їх інкубації в фізіологічному розчині протягом 60 хв. Для видалення високомолекулярних термолабільних білків екстракт прогрівали на киплячій водяній бані та фільтрували. Одержані екстракти стерилізували в автоклаві. Первинну культуру фібробластів шкіри новонароджених шурів отримували шляхом вільного виселення клітин з фрагментів шкіри і подальшого пересівання фібробластів. Одержані фібробласти інкубували в живильному середовищі DMEM/F12 з 10% ЕТС, в дослідні зразки додавали 5 або 2% ЕТС та вносили ЕШП до кінцевої концентрації пептидів 0,1, 0,5, 1,0 і 1,5 мкг/мл, а в контрольні – еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. Метаболічну активність клітин оцінювали по відновленню нетоксичного редокс-індикатора AlamarBlue та за допомогою МТТ-тесту.

Додавання до середовища культивування ЕШП при кінцевій концентрації пептидів 0,1 мкг/мл статистично достовірно збільшило метаболічну активність фібробластів. При зменшенні концентрації ЕТС в середовищі культивування з 5 до 2% та додаванні ЕШП в кінцевій концентрації пептидів 1 і 1,5 мкг/мл метаболічна активність фібробластів зберігалася на рівні, який спостерігався в контрольних пробах з 10% ЕТС. На 5 добу культивування фібробластів їх кількість в середовищі з 2% ЕТС та 1 мкг/мл пептидів більша, ніж в середовищі без ЕШП, але менша, ніж в середовищі з 5% ЕТС. Відмінностей в метаболічній активності клітин при визначенні за допомогою AlamarBlue або МТТ-тесту виявлено не було.

Таким чином, при додаванні ЕШП в культуру фібробластів є можливість знизити концентрацію ЕТС без втрати метаболічної активності фібробластів.

Research of tissue specificity and dose-related effects of the extract of frozen-thawed newborn piglet skin fragments (NPSE) on metabolic activity of skin fibroblasts in culture is interesting both in terms of elucidation of the mechanism of their action and to determine the possibility of culturing cells in media with lower content of fetal bovine serum (FBS). Reducing the concentration of serum in the culture medium decreases the risk of contamination of culture and possible immune response in experimental or clinical application of fibroblasts.

The aim of this research was to establish the dose-related influence of NPSE on metabolic activity of skin fibroblast in culture.

The extract was derived from frozen-thawed fragments of piglet skin by their incubation with physiological solution for 60 min. The extract was warmed up in a boiling water bath and filtered for removal of high molecular and thermolabile proteins. The obtained extracts were sterilized by autoclaving.

Primary culture of neonatal rat skin fibroblasts was obtained by free cell transfer from skin fragments and the following reseeding. The obtained fibroblasts were incubated in DMEM/F12 culture medium supplemented with 10% FBS, the test samples were supplemented with 5 or 2% FBS, and NPSE up to the final peptide concentration 0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, into the control ones the equivalent volume of physiological solution was introduced. Metabolic activity was assessed by the reduction of nontoxic Alamar Blue redox indicator and by MTT test.

The cell metabolic activity of fibroblasts was statistically significantly increased after addition of NPSE to the culture medium up to the final peptide concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Decreasing of FBS concentration in the culture medium from 5% down to 2% and the addition of NPSE up to the final peptide concentration of 1 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resulted in the preservation of the metabolic activity of fibroblasts at the level observed in the control samples with 10% FBS. On the 5th day of culturing the number of fibroblasts in medium with 2% FBS and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptides was higher than in the medium without NPSE, but less than in medium with 5% FBS. No differences in cell metabolic activity in AlamarBlue or MTT tests were found.

Thus, the addition of NPSE allowed to reduce the concentration of FBS without loss of metabolic activity of fibroblasts.



Культивирование и дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток в составе скаффолдов на основе скелетов морских губок *Ianthella basta*

В.В. Муценко, Е.Ю. Рогульская, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cultivation and Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells within the Scaffolds Based on Skeletons Derived from the Marine Sponge *Ianthella basta*

V.V. Mutsenko, O.Yu. Rogulska, Yu.A. Petrenko

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

Одним из ключевых аспектов при создании тканеинженерных конструкций является подбор скаффолдов, обеспечивающих образование биоэквивалента соответствующей ткани *in vitro* и биосовместимость, а также терапевтический потенциал *in vivo*. В качестве клеточной составляющей тканеинженерных конструкций наиболее перспективными являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие высоким пролиферативным потенциалом и уникальной способностью к мультилинейной дифференцировке.

Недавно впервые была показана возможность получения скаффолдов на основе альфа-хитина из морских губок *Ianthella basta* отряда *Verongida*. Однако до настоящего времени перспективность применения скелетов морских губок на основе альфа-хитина в тканевой инженерии исследована не была.

Цель исследования – оценка *in vitro* морфологических и функциональных свойств МСК в условиях долгосрочного культивирования в составе скаффолдов на основе скелетов морской губки *I. basta*.

Скаффолды из скелетов морских губок *I. basta* получали путем кислотно-щелочного гидролиза и заселяли МСК с помощью перфузионного метода. Морфологию и распределение клеток в составе скаффолдов оценивали окрашиванием азур-эозином. Метаболическую активность клеток определяли по МТТ-тесту, а также анализировали дифференцировочный потенциал клеток после индукции в остеогенном и адипогенном направлениях окрашиванием Fast Blue и масляным красным соответственно.

После очистки скелетов *I. basta* были получены плоские скаффолды с макропористой структурой, состоящие из хитиновых поперечносплетенных фибрилл. В условиях трехмерного культивирования клетки распластывались на поверхности хитиновых тяжей, пролиферировали, сохраняли метаболическую активность и фибробластоподобную морфологию. Через 3 недели культивирования на поверхности скаффолдов формировался непрерывный слой клеток, которые под действием соответствующих индукторов дифференцировались в остеогенном и адипогенном направлениях.

Таким образом, скелеты морской губки *I. basta* представляют собой новый перспективный источник скаффолдов, которые могут найти применение в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

One of the key aspects in the process of tissue-engineered construct designing is a selection of scaffolds providing formation of corresponding tissue bioequivalents *in vitro* and biocompatibility as well as a therapeutic potential *in vivo*. As the most perspective cell constituents of tissue-engineered constructions the mesenchymal stromal cells (MSC) which have a high proliferative potential and the unique multilineage differentiation capability can be considered.

Recently the feasibility of obtaining scaffolds based on alpha-chitin from the sea sponges *Ianthella basta* of the order *Verongida* has been shown for the first time. However, to date the application prospect of sea sponges skeletons based on alpha-chitin in tissue engineering has not been investigated.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the morphological and functional properties of MSC during long-term culturing within the scaffolds based on the skeletons derived from the marine sponge *I. basta*.

Scaffolds from sea sponges *I. basta* skeletons were obtained by acid-base hydrolysis and seeded with MSC by the perfusion method. Cell morphology and distribution within the scaffolds was assessed by azure-eosin staining. Metabolic activity of MSC was estimated by MTT-test. Differentiation potential of cells was assessed after induction into osteogenic and adipogenic directions by alkaline phosphatase expression and Oil Red staining of intracellular lipids, respectively.

After purification procedure plane scaffolds with macroporous structure consisting of chitinous cross-linked fibrils were produced. Under 3D culture conditions the cells spreaded on the surfaces of chitinous fibers, proliferated, maintained metabolic activity and fibroblast-like morphology. After 3 weeks of culture cell sheet was formed on the surface of the scaffolds. Under influence of corresponding inductors cells differentiated into osteogenic and adipogenic directions.

Thus, skeletons derived from the marine sponge *I. basta* represent the new perspective source of scaffolds, which can find application in tissue engineering and regenerative medicine.



Влияние экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят на уровень цитолиза и выраженность воспалительного процесса при экспериментальном некрозе миокарда

А.Г. Бабаева

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Piglet Heart Extract on Indices of Cytolysis and Severity of Inflammation in Experimental Myocardial Necrosis

A.G. Babaieva

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

Проблема профилактики и лечения острых патологических состояний, связанных с ишемией и некрозом сердечной мышцы, остается одной из наиболее актуальных в медицине. Показано, что экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят тканеспецифично стимулируют репаративную регенерацию при различных экспериментальных патологических состояниях.

Цель работы – изучить влияние экстракта криоконсервированных фрагментов сердца поросят (ЭСЦП) на активность маркерных ферментов в сыворотке крови и выраженность воспалительного процесса при экспериментальном некрозе миокарда (НМ).

Материалы и методы. Крионекроз миокарда моделировали путем воздействия на стенку левого желудочка криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности -195°C в течение 15 с. Животные были распределены на пять групп по 6 крыс в каждой: 1 – интактные животные (норма); 2 – животные после торакотомии; 3 – животные с НМ; 4 – крысы с НМ, которым вводили препарат сравнения «Неотон» в дозе 20 мг на 100 г; 5 – крысы с НМ, которым вводили в брюшную полость на протяжении всего эксперимента ЭСЦП из расчета 50 мкг пептидов на 100 г массы животного. У животных определяли активность АлАТ, АсАТ и ЛДГ в сыворотке крови и проводили анализ лейкоцитарной формулы крови.

Результаты. Через 7 суток после начала эксперимента активность АсАТ в сыворотке крови наиболее выражено снижалась у животных, которым вводили «Неотон» или ЭСЦП. На 30 сутки активность аминотрансфераз во всех группах статистически достоверно не отличалась от нормы. На 1-е сутки после моделирования НМ у животных, не получавших лечения, увеличивалась ЛДГ активность в 3 раза, у крыс, которым вводили «Неотон», – в 2,4 раза, а у животных, которым вводили ЭСЦП, – в 2 раза. К 7-м суткам в последней группе активность фермента возвращалась к показателям группы нормы. По клиническому анализу крови животных выявлено, что в группе с НМ на протяжении всего периода эксперимента наблюдался сдвиг лейкоцитарной формулы влево. Введение животным с крионекрозом миокарда ЭСЦП способствовало более раннему восстановлению лейкоцитарной формулы крови и снижению эндогенной интоксикации организма. Введение «Неотона» оказывало несколько менее выраженный эффект.

Issue of prevention and treatment of acute pathological states associated with ischemia and necrosis of the heart muscle is one of the most important in medicine. It is shown that cryopreserved pig and piglet heart extracts render tissue-specific stimulation on the reparative regeneration under various experimental pathological conditions.

Research aim was to study the influence of frozen-thawed piglet heart fragments extract (PHE) on the activity of marker enzymes in blood serum and expression of the inflammatory process at experimental myocardial necrosis (MN).

Materials and methods. Myocardial cryonecrosis was simulated by treatment of the left ventricular wall by the cryoinstrument with applicator of 3 mm diameter with the operating surface temperature of -195°C during 15 seconds. Animals were divided into five groups comprising six rats each: the 1st group included intact animals (norm), the 2nd was the animals after thoracotomy, the 3rd group consisted of animals with MN, the 4th group was the rats with MN and administered reference preparation Neoton (20 mg per 100 g of animal weight), and 5th group was the rats with MN and administered PHE into the abdominal cavity during the entire experiment in dose of 50 μg peptides per 100 g body weight of animal. Assessment of AlAT, AsAT and LDG in blood serum and blood leukogram was made in rats.

Results. In 7 days from the start of the experiment AsAT activity in blood serum decreased most significantly in animals treated with Neoton and PHE. On the 30th day the activity of transaminases in all groups did not differ significantly from the norm. At the first day after simulated MN in animals without any other treatment there was observed 3 times increasing in LDG content, 2.4 times in rats with Neoton introduction, and 2 times in animals treated with PHE. By the 7th day in the last group the enzymatic activity returned to level of the norm group. Blood count in the animals revealed that in the group with MN a shift of leukocyte formula to the left was present during the entire experiment. Administration of EPH to animals with myocardial cryonecrosis contributed to an earlier recovery of blood leukocyte formula and reduced the endogenous intoxication. Injection of Neoton provided less pronounced effect.



Корекція показників ЕКГ щурів із ішемією міокарда екстрактом кріоконсервованих фрагментів серця поросят

Л.А. Рогоза

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Correction of ECG Indices in Rats with Myocardial Ischemia Using Extract of Frozen-Thawed Piglet Heart Fragments

L.A. Rohoza

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

Високий рівень інвалідності та смертності при ішемічній хворобі серця зумовлює необхідність пошуку нових шляхів підвищення ефективності лікування цієї патології. На даний час значна увага приділяється дослідженням в галузі регенеративної біології та медицини. Одним з найбільш інформативних методів, який дозволяє якісно та кількісно дослідити стан регуляції серцевої діяльності, є варіабельність ритму серця.

Метою роботи було встановити вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів серця поросят (ЕСцП) на електрофізіологічні показники роботи серцевого м'язу у тварин з ішемією міокарда.

Дослідження проведено на 17 безпородних білих статевозрілих щурах-самцях, вік яких на початок експерименту становив 10 та 16 місяців. До групи 1 ввійшли 8 щурів із ішемією серцевого м'язу різного ступеня вираженості, до групи 2 – 4 щура з трансмуральним інфарктом міокарда. Для одержання ЕСцП кріоконсервовані фрагменти серця інкубували в фізіологічному розчині 60 хв, звільняли від термолабільних білків та стерилізували. Екстракт вводили в черевну порожнину усім тваринам зі змінами в роботі серця впродовж всього експерименту один раз на добу по 1 мл. Доза пептидів становила 50 мкг на 100 г маси тварини. Електрокардіограми (ЕКГ) тварин реєстрували на апаратно-програмному комплексі «Полі-Спектр» («Нейрософт», Росія). За даними ЕКГ визначали показники варіабельності ритму серця.

У тварин з ішемією міокарда на ЕКГ спостерігалися елевация сегмента *ST* і збільшення амплітуди зубця *T*, зниження амплітуди зубця *R* в відведеннях *I* і *avL*. У цій групі тварин після введення ЕСцП на протязі 2 місяців реєструвалося відновлення амплітуди зубця *R*. Елевация сегмента *ST* змінилася – з'явився куполоподібний зубець *T*, що свідчило про нормалізацію кровопостачання серцевого м'язу.

У щурів із трансмуральним інфарктом міокарда на ЕКГ реєструвався зубець *Q* в відведеннях *I* і *avL*. На 56-у добу експерименту спостерігалася нормалізація показників ЕКГ, в тому числі зменшення зубця *Q* в відведеннях *I*, *II* та *avL*. Показники варіабельності ритму серця поверталися до норми. В процесі ремодулювання серця відбувалося збільшення показника потужності спектра нейрогуморальної регуляції усіх частотних діапазонів до рівня норми та відновлення балансу вкладів симпатичного і парасимпатичного відділів вегетативної нервової системи.

High level of disability and mortality at the heart ischemic disease necessitates the search for new ways to increase the effectivity of treating this pathology. Nowadays a considerable attention is given to the research in the field of regenerative biology and medicine. One of the most informative methods that allow qualitative and quantitative investigation of the state of cardiac activity regulation is the heart rate variability.

The research aim was to determine the influence of extract of frozen-thawed piglet heart fragments (PHE) on electrophysiological indices of cardiac muscle in the animals with myocardial ischemia.

The study was conducted in 17 mature breedless white male rats of 10 and 16 months at the start of the experiment. The first group consisted of 8 rats with different severity of heart muscle ischemia, the second group included 4 rats with transmural myocardial infarction. For obtaining the PHE the frozen-thawed heart fragments were incubated in physiological solution for 60 min, thereafter purged from thermolabile proteins and sterilized. The extract was injected into abdominal cavity of all animals with the changes in heart function by 1 ml once a day during the entire experiment. The dose of peptide was 50 µg per 100 g of an animal. Electrocardiograms (ECG) of animals were recorded with hardware-software complex Poly-Spectrum (Neurosoft, Russia). Data of ECG were used to calculate heart rate variability indices.

Analysis of ECG in animals with myocardial ischemia revealed the elevation of *ST* segment and increase in the amplitude of *T* wave, reduced amplitude of *R* wave in the *I* and *avL* leads were recorded. After the injection with EPsH during 2 months the recovery of the amplitude of *R* wave there was registered in this group of animals. The elevation of *ST* segment changed with appearance of the dome-like *T* wave, indicating a normalization of blood supply to heart muscle.

In the rats with transmural myocardial infarction in ECG a *Q* wave in the leads *I* and *avL* was recorded. To the day 56 of the experiment there was normalization of the ECG, including the reduction of *Q* wave in *I*, *II* and *avL* leads. The indices of heart rate variability returned to the normal level. During the process of heart remodulation the index of neurohumoral regulation spectrum power for each frequency band was increased up to normal level and recovery in the balance between the contribution of sympathetic and parasympathetic links of the autonomic nervous system was observed.



Влияние низких температур и ионизирующего облучения на физико-механические свойства фиброзной оболочки перикарда и лепестков аортального клапана свиньи

А.А. Горленко, И.П. Михайлова, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low Temperatures and Ionizing Irradiation on Physical-Mechanical Properties of Porcine Pericardium Fibrous Membrane and Aortic Valve Leaflets

A.A. Gorlenko, I.P. Mikhailova, B.P. Sandomirsky

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

Результаты реконструктивных операций с использованием бесклеточного ксеногенного пластического материала зависят от вида и качества имплантатов. Основное влияние на «судьбу» биопротезов оказывает способ их консервирования. Физико-механические параметры биопротезов влияют на физиологические аспекты их функционирования в организме и являются важными общепринятыми характеристиками биоматериала. Данное исследование нацелено на разработку принципиально нового подхода к созданию девитализированных ксенопротезов из ткани перикарда и аортальных створок клапана свиньи с использованием физических факторов (замораживание-отогрев и ионизирующее облучение).

Цель работы – изучить упругопрочностные характеристики ткани перикарда и лепестков аортального клапана свиньи на этапах девитализации при создании бесклеточных ксеногенных материалов. Объектом исследования служили фиброзная оболочка перикарда (ПФ) и лепестки аортального клапана (ЛАК), выделенные у свиней, которые были разделены на 4 группы: нативные (контрольная группа); после замораживания (-196°C) и отогрева; облученные в дозе 25 кГр; после замораживания-отогрева и последующего облучения в дозе 25 кГр. Изучение физико-механических свойств включало определение толщины (h), предела прочности (λ), относительного удлинения (L), запаса деформативной способности (δ) и модуля упругости (E). Деформацию одноосного растяжения ПФ и ЛАК проводили в продольном и поперечном направлениях в зависимости от хода волокон. Статистические данные оценивали по универсальному критерию достоверности Манна-Уитни при помощи программы «SPSS Statistics 17.0».

Результаты исследования показали, что E и λ для ПФ и ЛАК после девитализации во всех направлениях значительно выше, чем у нативных тканей. Уменьшение δ биотканей, подвергнутых девитализации, свидетельствует об увеличении жесткости створок и перикарда. Увеличение жесткости и прочности за счет снижения запаса деформативной способности ксенотканей мы связываем с действием низких температур и ионизирующего облучения, которые инициируют образование cross-linking – связей за счет сшивающей активности фибриллярных белков, которые приводят к более компактному расположению коллагеновых волокон и их структурной стабилизации. Такие изменения при сопоставлении с величиной эксплуатационного напряжения нативных тканей позволяют предположить, что при длительном существовании в организме реципиента данный материал может противостоять физической нагрузке.

The results of reconstructive surgeries using cell-free xenogenic plastic material are in many ways determined by the type and quality of implants. Though, a method of their preservation is of major importance for the fate of biological prostheses. Physical-mechanical parameters of biological prostheses greatly affect physiological aspects of their functioning within an organism, thus being considered as important generally accepted characteristics of biomaterial. The given research is targeted to development of a novel approach to producing devitalized xenoprostheses derived from porcine pericardial tissue and aortic valve leaflets using physical factors (freeze-thawing and ionizing irradiation).

The aim of the research is to investigate stress-strain properties of porcine pericardial tissue and aortic valve leaflets at the stages of devitalization when producing cell-free xenogenic scaffolds. The objects of research were pericardial fibrous membrane (PFM) and aortic valve leaflets (AVL), isolated from pigs, divided into 4 groups: i) native (control group); ii) after freezing (-196°C) and thawing; iii) irradiated with a dose of 25 kGray; iv) after freeze-thawing and subsequent irradiation with a dose of 25 kGray. The study of physical-mechanical properties involved evaluation of the thickness (h), limit strength (λ), relative elongation (L), reserve of deformability (δ) and stretch modulus (E). Deformation of monoaxial extension of PFM and AVL was done in longitudinal and transverse directions depending on the arrangement of fibers. Statistical data were evaluated with Mann-Whitney significance test criterion using an SPSS Statistics 17.0. software.

The obtained results showed that the λ and E values in PFM and AVL following devitalization in all the directions were much higher as compared with native tissues. A reduction in the δ value of devitalized biological tissues indicated a rise in rigidity of aortic leaflets and pericardium. We believe an increase in rigidity and strength owing to a certain reduction in the deformability reserve of xenotissues to be related to the effect of low temperatures and ionizing irradiation, initiating the formation of intra- and intermolecular cross-links due to cross-linking ability of fibrous proteins, thus resulting in a denser arrangement of collagenic fibers in biological tissues and their respective structural stabilization. The availability of these changes when compared with the values of the working stress in native tissues suggested the given material to be capable of successfully withstanding physical loads during long-term existence in the recipient organism.



Влияние ионизирующего облучения и низких температур на морфологическое состояние изолированных артерий свиней

Е.В. Шевченко, Л.Н. Тыныныка, И.П. Михайлова, Б.П. Сандомирский
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Ionizing Irradiation and Low Temperatures on Morphological State of Pig Isolated Arteries

E.V. Shevchenko, L.N. Tynynyka, I.P. Mykhailova, B.P. Sandomirsky
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Проблема создания адекватных сосудистых протезов при протезировании сосудов малого диаметра остается актуальной. Был предложен принципиально новый подход к созданию девитализированных сосудистых ксенопротезов малого диаметра, включающий предимплантационную обработку биоматериала с использованием физических факторов (замораживание-отогрев и ионизирующее облучение). Цель работы – изучение морфологической структуры изолированных артерий свиней после воздействия ионизирующего облучения и глубокого замораживания.

Для исследования использовали внутригрудные артерии беспородных половозрелых свиней, которые были разделены на 4 группы: I – контроль (нативные артерии); II – внутригрудные артерии после воздействия низких температур; III – облученные артерии; IV – внутригрудные артерии после воздействия низких температур и облучения. Очищенные артерии погружали в жидкий азот (-196°C) и хранили до момента их использования. Образцы артерий отогревали при 37°C . На базе ННЦ ХФТИ НАН Украины с помощью линейного ускорителя электронов ЛУЭ-10 их облучали в дозе 25 кГр. Для общей оценки состояния исследуемых тканей артерий применяли окрашивание гематоксилином и эозином. Для выявления и дифференцировки соединительнотканых структур использовали окрашивание препаратов фуксилином на эластические волокна по Вейгерту с докрасиванием пикрофусином по методу Ван Гизон. Для оценки функциональной активности тканей артерий использовали комплекс гистохимических методик. Дезоксинуклеопротеиды (ДНП) выявляли реакцией по Фельгену-Россенбеку (контроль – гидролиз с HCl), рибонуклеопротеиды (РНП) – окраской по методу Браше (контроль кристаллической рибонуклеазой).

Было показано, что после криовоздействия и влияния ионизирующего облучения в клеточных элементах всех слоев стенки артерии развиваются преимущественно деструктивные изменения в виде некробиоза и некроза гладких мышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов с частичной деэндотелизацией ее интимы и *vasa vasorum*, вызванные криоповреждением. В соединительнотканном компоненте стенки артерии эластические и коллагеновые волокна, внутренняя эластическая мембрана в целом сохраняют свое пространственное расположение и структурную целостность, несмотря на очаговую деформацию. Реакция на ДНП в ядрах эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после криовоздействия и облучения отрицательная. Реакция на РНП в цитоплазме эндотелиоцитов и гладких мышечных клетках артерий свиней после криовоздействия и облучения отрицательная. Использование низких температур и ионизирующего облучения является перспективным в комплексе мероприятий по девитализации сосудистых ксенопротезов.

The development of adequate vascular prostheses for prosthesis of small diameter vessels is relevant today. We have suggested principally new approach to the development of devitalized vascular xenoprostheses of small diameter including pre-implantation treatment of biomaterial using physical factors (freeze-thawing and ionizing irradiation). The research aim was to study the morphological structure of pig isolated arteries under effect of ionizing irradiation and deep freezing.

For the investigation we used thoracic arteries of adult breedless rats which were divided into 4 groups: i) the control (native arteries); ii) thoracic arteries after low temperature exposure; iii) irradiated arteries; iv) thoracic arteries after low temperature exposure and irradiation. Cleaned arteries were plunged into liquid nitrogen (-196°C) where they were stored till required. Arteries were thawed at 37°C . Then their irradiation with a dose of 25 kGy was carried out using linear electron accelerator LUE-10 at the National Science Center of Kharkov Institute of Physics and Technology of the National Academy of Sciences of Ukraine. To assess general state of the studied arterial tissue we used staining with hematoxylin and eosin. To reveal and differentiate connective-tissue structures we used staining of preparations according Weigert with fuchsin for elastic fibers and counterstaining with picrofuchsin according Van Gieson. To assess the functional activity of arterial tissue we used histochemical methods. Desoxynucleoproteins (DNP) were revealed by Feulgen-Rossenbeck reaction (the control was hydrolysis with HCl). Ribonucleoproteins (RNP) were found by Brachet staining (control with crystalline ribonuclease).

The results of histological and histochemical studies have shown that after cryoexposure and the effect of ionizing irradiation the cells of all artery wall layers had mainly destructive changes such as necrobiosis and necrosis of smooth-muscle cells, fibroblasts, endotheliocytes with a partial deendothelization of its intima and *vasa vasorum* caused by cryodamage. In connective tissues of arterial wall the elastic and collagen fibers, inner elastic membrane generally preserved spatial location and structural integrity despite of focal deformation. Reaction to DNP in endotheliocytes and pig smooth-muscle artery cells after cryoexposure and irradiation was negative. Reaction to RNP in endotheliocyte cytoplasm and pig smooth-muscle artery cells after cryoexposure and irradiation was negative. Thus, the application of low temperatures and ionizing irradiation is perspective in the complex of procedures on devitalization of vascular xenoprostheses.



Влияние экстрактов тканей мозга и печени на гипотермическое хранение нервных клеток новорожденных крыс

М.В. Шевченко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Brain and Liver Tissue Extracts on Hypothermic Storage of Newborn Rat Neural Cells

M.V. Shevchenko

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

Целью работы явилось изучение роли микроокружения на поведение в культуре изолированных нервных клеток головного мозга новорожденных крыс до и после гипотермического хранения (ГХ).

Нервные клетки (НК), полученные из ткани мозга новорожденных крыс, культивировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10% сыворотки крови крыс. Клетки хранили в течение 1, 2, 3 и 4 суток при температуре 8°C в DMEM/F12 и сахарозо-солевом растворе (ССР). Среду хранения обогащали 10% сыворотки крови крыс, экстрактами мозга (ЭМ) и печени (ЭП) новорожденных крыс.

В культуре свежвыделенные НК формировали агрегаты, которые после прикрепления формировали монослой, состоящий из клеток глии и нейронов. На монослой впоследствии появлялись колонии стволовых/прогениторных клеток. Независимо от используемой среды и присутствия экстрактов, ГХ приводило к снижению как общего количества клеток, так и количества клеток, которые не прокрашивались трипановым синим. Присутствие сыворотки не влияло на изменение концентрации НК в процессе ГХ и оказывало небольшое положительное влияние на сохранность интактных клеток. Хранение на протяжении 1-х суток в среде DMEM/F12 с сывороткой и без нее, а также в ССР без сыворотки не влияло на поведение НК в культуре по сравнению с контролем. В присутствии как ЭМ, так и ЭП в среде DMEM/F12 происходили более позднее прикрепление агрегатов к подложке и более позднее появление на монослойе нейробластов. В присутствии ЭП в ССР нейробласты и колонии НК не появлялись. В течение 2-х суток ГХ в среде DMEM/F12 в присутствии как сыворотки, так и ЭП или ЭМ практически не влияло на поведение клеток в культуре. При отсутствии сыворотки и экстрактов в DMEM/F12 НК в культуре формировали лишь небольшие участки монослоя. Культивирование НК после хранения в ССР без сыворотки или в присутствии ЭМ приводило к формированию небольшого количества нейробластов и колоний, которые появлялись в более поздние сроки по сравнению с контролем. При культивировании НК, хранившихся в ССР с сывороткой, формировались мелкие агрегаты, не прикреплявшиеся к подложке. Добавление ЭП в ССР способствовало прикреплению части агрегатов и формированию небольших участков монослоя. Культивирование НК после 3-х суток ГХ независимо от используемой среды характеризовалось формированием мелких рыхлых агрегатов, которые не прикреплялись к подложке и в дальнейшем погибали.

Таким образом, добавление сыворотки или экстрактов в среду DMEM/F12 позволяет сохранять популяции стволовых/прогениторных и дифференцированных НК на протяжении 2-х суток ГХ. Присутствие сыворотки или ЭП в ССР оказывает отрицательное влияние на сохранность НК новорожденных крыс независимо от срока их ГХ.

The aim of the work was to study the influence of the microenvironment on isolated newborn rat neural cells (NC) behaviour in culture before and after their hypothermic storage (HS).

NC were isolated from the brain tissue of newborn rats and cultured of 2 mln cells per ml concentration in DMEM/F12 medium supplemented with 10% rat blood serum. Cells were stored for 1, 2, 3 and 4 days at 8°C in DMEM/F12 medium and sucrose-based solution (SBS). The medium was supplemented with 10% rat blood serum and brain (BE) or liver extracts (LE).

In culture the freshly isolated NC formed aggregates. After attachment to the substrate they formed a monolayer that consisted of glial cells and neurons. Stem/progenitor cell colonies appeared on the monolayer by further culturing. Regardless of medium or the presence of extracts HS caused the reduction of the NC concentration and the number of cells that excluded the trypan blue. The presence of serum did not influence the change of NC concentration during the HS and had a little positive effect on the preservation of intact cells. One day of HS in DMEM/F12, with or without serum, and in SBS without serum, did not influence the behavior of NC in culture if compared to the control. The presence of BE and LE in DMEM/F12 caused the later attachment of aggregates to the substrate and the later appearance of neuroblasts on the monolayer. In the presence of LE in SBS the appearance of neuroblasts and forming of colonies were not observed. Two days of HS in DMEM/F12 in the presence of serum or extracts almost did not affect the behavior of cells in culture. Being in serum-free and extract-free DMEM/F12 the cells only formed small areas of monolayer. Cultivation of NC that were stored in SBS without serum or supplemented with BE, resulted in formation of a small amount of neuroblasts and colonies, moreover they appeared later if compared to the control. Culturing of NC that were stored in SBS with serum led to appearance of small loosely-packed aggregates, not attached to the substrate. Supplementing the SBS with LE resulted in attachment of the part of aggregates to the substrate and formation of small areas of monolayer. The cultivation of NC after 3 days of HS, regardless of medium used, was characterized by forming of small-sized loosely packed aggregates that did not attach to the substrate and died during further cultivation.

Thus, the supplementing of DMEM/F12 medium with serum or extracts allowed to preserve the populations of stem/progenitor and differentiated NC within two days of HS. The presence of serum or LE in SBS had a suppressive effect on preservation of newborn rat NC regardless of HS duration.



Осмотическая резистентность эритроцитов барана в условиях гипотермического хранения и воздействия озона

К.Н. Головина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Osmotic Resistance of Ovine Erythrocytes Under Hypothermic Storage and Ozone Exposure

K.N. Golovina

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

В практике лабораторного медицинского анализа востребованы методы, в которых используются эритроциты барана как визуальной метки Т-лимфоцитов человека. Однако существующие консерванты-стабилизаторы не обеспечивают хранения эритроцитов больше 2 месяцев. Таким образом, существует практический интерес к поиску и усовершенствованию среды для длительного гипотермического хранения эритроцитов барана.

Целью работы было оценить по изменению коэффициента осмотической хрупкости сохранность клеток в различных средах в течение 8 недель при температуре 2...4°C. Сравнивали следующие среды: 1 – 0,9%-й раствор хлорида натрия; 2 – 7%-й раствор сахарозы; 3 – раствор Олсвера (глюкоза 20,5 г/л, цитрат натрия 8 г/л, лимонная кислота 0,552 г/л, хлорид натрия 4,2 г/л); 4 – 5%-й раствор маннита. Степень гемолиза оценивали спектрофотометрическим методом по количеству гемоглобина, вышедшего из лизированных клеток. Также оценивали влияние на сохранность эритроцитов барана инкубации в растворе с концентрацией озона 0,16 мг/л, эффективность которой была ранее показана на человеческих эритроцитах [И.А. Белых и др. 2007].

В результате проведенных экспериментов были получены данные, согласно которым указанные среды можно расположить в порядке убывания по степени гемолиза клеток после хранения: 1 > 3 > 4 > 2, что позволяет говорить о лучшей сохранности эритроцитов в 7%-м растворе сахарозы, по сравнению с другими изоосмотическими средами. После инкубации хранившихся клеток в растворах с озоном на заключительном этапе хранения (8 недель) было показано существенное снижение коэффициента гемолиза клеток для каждой среды, %: 1 – на 1,2; 2 – 18,0; 3 – 14,6; 4 – 8,6. Наблюдаемый эффект, по нашему мнению, может быть обусловлен модифицирующим влиянием озона на аквапорины эритроцитов, показанным ранее [B.L. Smith *et al.*, 1994; V. Travagli *et al.*, 2007]. В результате такой обработки создаются условия для выравнивания осмотических градиентов между внутри- и внеклеточной средой, что приводит к повышению осмотической устойчивости. Обнаруженный эффект может быть использован в дальнейшем при гипотермическом хранении эритроцитов барана для клинических и научных целей.

Medical laboratory tests involve the methods with ovine erythrocytes as a visual label for human T cells. However, the existing stabilizing solutions do not provide storage of erythrocytes longer than 2 months. Thus there is a practical need in research and improvement of a medium for long-term hypothermic storage of ovine erythrocytes.

The research aim was to evaluate cell survival during storage in different media for 8 weeks at 2...4°C using the changes in osmotic fragility coefficient as the index. The following media were compared: 1) 0.9% sodium chloride; 2) 7% sucrose; 3) Alsever's solution (glucose 20.5 g/l; sodium citrate 8 g/l; citric acid 0.552 g/l; sodium chloride 4.2 g/l); 4) 5% mannitol. The hemolysis degree was assessed spectrophotometrically by the amount of hemoglobin released from lysed cells. There was evaluated the effect of treatment with low concentration of ozone (0.16 mg/l) on ovine sheep erythrocyte integrity, that was previously shown as an effective for human erythrocytes [I.A. Belykh *et al.*, 2007].

The obtained data of experiments allowed to arrange the used media by observed hemolysis in such descending order: 1 > 3 > 4 > 2, *i. e.* higher preservation of erythrocytes was found in 7% sucrose solution if compared with other isoosmotic media. Incubation of the cells in low concentration ozone solution in 8 weeks of storage resulted in a significant reduction of cell hemolysis index for each media, as follows: 1) 1.2%, 2) 18.0%, 3) 14.6% 4) 8.6%. The observed effect may be presumably stipulated by modifying effect of ozone on erythrocyte aquaporins, reported previously [B.L. Smith *et al.*, 1994; V. Travagli *et al.*, 2007]. Such a treatment provided the conditions for balancing the osmotic gradients between intra- and extracellular media, resulting in increase of osmotic resistance. The observed effect may be applied in the future for practical use in hypothermic storage of ovine erythrocytes for clinical and research purposes.



Влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на выживаемость мезенхимальных стромальных клеток в процессе хранения при различных положительных температурах

Д.Н. Тарусин¹, В.С. Зайков², В.В. Муценко², Ю.А. Петренко²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Effect of Encapsulation in Alginate Microspheres on Survival of Mesenchymal Stromal Cells During Storage at Different Positive Temperatures

D.N. Tarusin¹, V.S. Zaikov², V.V. Mutsenko², Yu.A. Petrenko²

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

Инкапсуляция мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в альгинатные сферические носители является перспективным направлением клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. В связи с этим важно детально изучить и разработать новые способы хранения биологического материала в составе альгинатных носителей на протяжении длительного времени в неизменном виде.

Целью данной работы было изучить влияние инкапсуляции МСК в альгинатные микросферы на их жизнеспособность и метаболическую активность в процессе хранения при различных положительных температурах.

Для инкапсуляции МСК смешивали с 1,2%-м раствором альгината натрия, затем капельно вносили в раствор CaCl₂ для полимеризации с последующей отмывкой в физиологическом растворе. Полученные альгинатные микросферы переносили в герметичные криоконтейнеры, содержавшие 1 мл среды α-MEM и 10% ЭС, и хранили при температурах 4, 20 и 37°C в течение 7 суток. Жизнеспособность и метаболическую активность МСК оценивали после 1, 2, 3, 4 и 7 суток хранения с использованием МТТ-теста.

Показано, что жизнеспособность суспензий МСК (без инкапсуляции) через 3 суток хранения при температуре 37, 20 и 4°C снижалась более чем в 2 раза по сравнению с исходными показателями. На 4-е сутки хранения жизнеспособность клеток уменьшалась до критического уровня независимо от температуры инкубации. Напротив, жизнеспособность и метаболическая активность инкапсулированных МСК сохранялись на высоком уровне вплоть до 7-х суток хранения во всех температурных режимах и составляли 70–85%.

Таким образом, установлено, что МСК в составе альгинатных сферических носителей способны сохранять высокие показатели жизнеспособности и метаболической активности в течение недели хранения при положительных температурах. В то же время клетки в составе суспензии погибают уже на 4-е сутки хранения. В связи с этим можно утверждать, что инкапсуляция МСК в альгинатные микросферы может быть использована для значительного повышения выживаемости клеток при кратковременном хранении или транспортировке.

Encapsulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) in alginate spherical carriers is promising direction of cell biotechnology, tissue engineering and transplantology. Therefore, it is necessary to pay attention to the detailed study and to the development of new methods for storing biological material in the spherical carriers unchanged for a long time.

The aim of this work was to study the effect of MSCs encapsulation into alginate microspheres on cells viability and metabolic activity during storage at different positive temperatures.

Encapsulation was carried-out by mixing MSCs with 1.2% sodium alginate, following drop-wise addition of cell-alginate gels into the CaCl₂ solution for polymerization and washing in saline solution. The resulting alginate microspheres were transferred into hermetic cryovials, containing 1 ml of α-MEM with 10% FS and stored at 4, 20 and 37°C during 7 days. The viability and metabolic activity of MSCs were assessed after 1, 2, 3, 4 and 7 days of storage by the MTT assay.

As a result, the viability of the MSCs suspensions (without encapsulation) after 3 days of storage at 37, 20 and 4°C decreased more than twice, comparing to initial level. After 4 days of storage the critical reduction of cells viability was observed, independently of incubation temperature applied. And *vice versa* the viability and metabolic activity of encapsulated MSCs were preserved at high levels for up to 7 days of storage at all temperature conditions and comprised 70–85%.

Thus, it was shown that MSCs within alginate spherical carriers are able to maintain high viability and metabolic activity during 1 week of storage at positive temperatures. Meanwhile non-encapsulated cells die on the 4th day of storage. The results confirm that the encapsulation of MSCs into alginate microspheres could be applied as perspective approach for significant improvement of cells survival during short-term storage or transportation.



Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа *Cyprinus carpio*

А.Ю. Пуговкин, Е.Ф. Копейка

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Osmotic Resistance of Carp *Cyprinus carpio* Spermatozoa

A.Yu. Pugovkin, E.F. Kopeika

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

Задачей исследования было создание способа определения осмотической устойчивости сперматозоидов карпа с целью выяснения механизмов криоповреждений сперматозоидов и отбора более качественного материала для дальнейшего использования.

Известно, что при попадании в гипотоническую среду непроникающего вещества объем клетки увеличивается за счет притока внеклеточной воды, что определяется разностью между осмотичностью внутриклеточной и внеклеточной среды. Кроме того, величина изменения объема зависит от видовых и индивидуальных особенностей самца, условий обитания и других факторов [Е.Ф. Копейка, 2007].

При низкой осмотичности внеклеточной среды приток воды в клетку, вызванный значительным перепадом осмотического давления, приводит к критическому увеличению объема и разрыву плазматической мембраны сперматозоида. В силу гетерогенности клеток в суспензии повреждение всех сперматозоидов в суспензии происходит не одновременно, а в течение определенного времени, при этом гибель клеток может быть описана зависимостью числа поврежденных клеток от времени.

В работе использовали разработанный нами спектрофотометрический метод [А.Ю. Пуговкин, 2013]. Сперму карпа получали по принятой в рыбоводной практике методике гипофизарных инъекций. Нативную сперму карпа добавляли в кювету спектрофотометра, заполненную дистиллированной водой, погружали в кювету магнитную мешалку, быстро размешивали содержимое встряхиванием, ставили кювету в кюветное отделение и фиксировали динамику оптической плотности. Полученная зависимость является суперпозицией двух процессов – набухания клетки, отражающегося в уменьшении оптической плотности, и уменьшения числа целых клеток, также приводящего к снижению оптической плотности суспензии. В результате преобразований получали кривую, отображающую динамику повреждения клеток.

В проведенном эксперименте время инкубации сперматозоидов карпа, при котором повреждалось 50% клеток, составило 273 ± 21 с ($n = 12$). Нами была исследована зависимость времени, при котором повреждается 50% инкубированных в дистиллированной воде сперматозоидов карпа, от температуры воды. По нашим данным, при инкубации клеток в среде с температурой $24 \dots 25^\circ\text{C}$ повреждение сперматозоидов происходило через 150–160 с после начала инкубации, в то время как в среде с температурой $8 \dots 10^\circ\text{C}$ – через 550–600 с.

На температурную зависимость осмотической резистентности сперматозоидов может оказывать влияние как температура содержания рыб в лабораторных условиях, так и характерная для того или иного вида температура естественного нереста.

The research task was to develop a method for assessing osmotic resistance of carp spermatozoa to elucidate the mechanisms of spermatozoa cryodamage and to select the samples with higher quality for further studies.

Of common knowledge is the fact that when cell appears in a hypotonic solution of non-penetrating substance, cell volume increases due to the influx of extracellular water, which driving force is the difference between osmotic pressure of intra- and extracellular medium. Moreover, the value of the volumetric changes depends on species and individual peculiarities of a male, habitat conditions and other factors [E.F. Kopeika, 2007].

Low osmotic pressure of extracellular medium results in the water influx into a cell caused by significant gradient of osmotic pressure and leads to a critical rise in the volume and rupture of plasma membrane of spermatozoon. Due to heterogeneity of cells in suspensions the injury of all spermatozoa in suspension occurs not simultaneously, but during certain time, herewith the cell death can be described as distribution of the number of damaged cells in time.

This study involved the designed by us spectrophotometric method [A.Yu. Pugovkin, 2013]. Carp sperm was obtained using the methods of pituitary injections traditional in fish breeding. Native carp sperm were added into spectrophotometer cuvette with distilled water, equipped with magnetic stirrer, the content was rapidly mixed with shaking, the cuvette was placed into a holder and the dynamics of optical density was recorded. The resulted dependence was the superposition of two processes: cell swelling reflected in decreased optical density, and decrease in the number of intact cells also leading to a reduction in optical density of the suspension. As the result of transformations we obtained the curve reflecting the dynamics of cell injury.

In the performed experiment the incubation time of carp spermatozoa whereat 50% of cells were damaged was 273 ± 21 s ($n = 12$). We obtained the dependence of time value, when 50% of carp spermatozoa incubated in distilled water became damaged, vs. water temperature. According to our data incubation of cells in the medium of $24 \dots 25^\circ\text{C}$ resulted in the damage of spermatozoa in 150–160 s after incubation start, while in the medium with the temperature of $8 \dots 10^\circ\text{C}$ it was observed in 550–600s.

Thus, both temperature of fish maintenance in laboratory conditions and specific for each species spawning temperature can affect temperature dependence of osmotic resistance of spermatozoa.

