Тезисы конференции молодых ученых "Холод в биологии и медицине 2007" 16-17 мая 2007, г. Харьков

Правдюк А.И. Инкапсуляция клеток в альгинатные микроносители ... 193
Абакумова Е.С., Моисеева Н.Н. Противоязвенная активность фракции до 5 кДа, полученной из криогемолизата кордовой крови, на модели субхронической язвы желудка у крыс ... 194
Жегунова Е.Г. Сезонные изменения уровня гликолиза у карася серебряного *Carassius auratus* ... 195
Животова Е.Н. Низкотемпературные фазовые переходы, стеклование и межмолекулярные взаимодействия в водных растворах оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n=25 ... 196
Буряк И.А. Исследование криоповреждений дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* флуоресцентными методами ... 197
Луценко Д.Г. Особенности микрогемоциркуляции после острой общей гипотермии ... 198
Горохова Н.А. Жизнеспособность клеток после экспозиции и быстрого замораживания-отогрева в многокомпонентных витрифицирующих растворах ... 199
Петренко Ю.А., Гурин И.В. Взаимодействие стромальных клеток с углеродными композиционными материалами в условиях культивирования ... 200
Сомова Е.В. Влияние озонированного раствора на восстановительные процессы в коже после криоповреждения ... 201
Сафранчук О.В. Особенности изменения морфофункциональных свойств клеток аденокарциномы Эрлиха после действия факторов криоконсервирования ... 202
Ермакова Н.Ю. Изучение состава тканевых экстрактов ... 203
Дудецкая Г.В., Устиченко В.Д., Алабедалькарим Н.М. Цитофлуориметрическая оценка эффективности криоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят ... 204
Румиех Ю.Х. Особенности криоустойчивости органотипических культур тканей надпочечников крыс в онтогенезе 205
Лаврик О.А. Особливості токсичної та мутагенної дії кріопротекторів на перещеплювані культури клітин ... 206
Абрафикова Л.Г. Влияние условий криоконсервирования на сохранность фибробластов человека ... 207
Калашникова М.Н. Изучение возможностей хранения бактерий *Streptococcus pneumoniae* при положительных и умеренно низких температурах ... 208
Иванов Е.Г., Моисеева Н.Н., Трифонова А.В. Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) криогемолизата крови крупного рогатого скота на содержание оксипролина в коже крыс после ожога ... 209
Чуйкова В.І. Вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові та тканині печінки при експериментальному гіпотиреозі 210
Вязовская О.В., Лысак Ю.С., Мазалов В.К. Влияние острого общего охлаждения на внутричерепное давление в процессе самоотогрева у крыс ... 211
Александрова Д.И. Сравнительное изучение чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к действию различных стрессовых факторов ... 212
Чиж Н.А. Периартериальная денервация и локальная криодеструкция печени при экспериментальном циррозе ... 213

Abstracts of the Conference of Young Scientists "Cold in Biology and Medicine 2007" May, 16-17th, 2007

Pravdyuk A.I. Cell Encapsulation in Alginate Macrocarriers..... 193
Abakumova E.S., Moiseyeva N.N. Antiulcer Activity of Cord Blood Cryohemolysate Fraction Less Than 5 kD in Model of Stomach Chronic Ulcer in Rats..... 194
Zhegunova E.G. Seasonal Changes of Glucolysis Level in *Carassius auratus*..... 195
Zhivotova E.N. Low-Temperature Phase Transitions, Glass Transition and Intermolecular Interactions in Aqueous Solutions of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree of n=25..... 196
Buryak I.A. Fluorescent Studies of *Saccharomyces cerevisiae* Cryodamage..... 197
Lutsenko D.G. Peculiarities of Microhemocirculation after Acute Total Hypothermia..... 198
Gorokhova N.A. Cell Viability After Exposure and Rapid Freeze-Thawing in Polycomponent Vitrifying Solutions..... 199
Petrenko Yu.A., Gurin I.V. Interaction of Stromal Cells with Carbon Composite Materials Under Culture Conditions..... 200
Somova E.V. Effect of Ozonized Solution on Recovery Processes in Skin After Cryodamage..... 201
Safranchuk O.V. Peculiarities of Changes in Morphofunctional Properties of Ehrlich's Carcinoma Cells After Effect of Cryopreservation..... 202
Ermakova N.Yu. Study of Tissue Extract Composition..... 203
Dudetskaya G.V., Ustichenko V.D., Alabedalkarim N.M. Flow Cytometry Estimation of Cryopreservation Efficiency of Whole Suspension and Different Subpopulations of Newborn Piglet Adrenocytes..... 204
Rumiekh Yu. Kh. Cryoresistance Peculiarities of Organotypic Cultures of Rat Adrenal Tissues in Ontogenesis..... 205
Lavrik O.A. Peculiarities of Toxic and Mutagenic Cryoprotective Effect on Re-inoculated Cell Cultures..... 206
Abrafikova A.G. Effect of Cryopreservation Protocols on Integrity of Human Fibroblasts..... 207
Kalashnikova M.N. Study of Storage Possibilities for *Streptococcus Pneumoniae* Bacteria Under Positive and Moderately Low Temperatures..... 208
Ivanov E.G., Moiseyeva N.N., Trifonova A.V. Effect of Low Molecular Fraction (1-5 kDa) of Cattle Blood Cryohemolysate on Hydroxy-Proline Content in Rat's Skin After Burn..... 209
Chujkova V.I. Content of Thyroid Hormones in Blood Serum and Liver Tissue at Experimental Hypothyrosis..... 210
Vyazovskaya O.V., Lysak Yu.S., Mazalov V.K. Effect of Acute General Cooling on Intracranial Pressure During Warming in Rats..... 211
Alexandrova D.I. Comparative Study of Sensitivity of Preliminarily Dehydrated human and Bovine Erythrocytes to the Effect of Different Stress Factors..... 212
Chizh N.A. Liver Periarterial Denervation and Local Cryodestruction at Experimental Cirrhosis..... 213

Инкапсуляция клеток в альгинатные микроносители

А.И. Правдюк
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

Cell Encapsulation in Alginate Macrocarriers

A.I. Pravdyuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В последнее время активно ведутся исследования по применению микроинкапсуляции клеток в различные полимерные носители. Эта технология позволяет изолировать клетки от воздействия иммунной системы реципиента при трансплантации, длительное время поддерживать фенотипические свойства некоторых клеток, например хондроцитов, в системе *in vitro*.

Альгинат, гетерополимер естественного происхождения, является перспективным материалом для инкапсуляции клеток благодаря высокой биосовместимости и способности деградировать в организме без образования токсичных продуктов.

Цель работы – определить оптимальные условия инкапсуляции фибробластоподобных клеток человека и оценить жизнеспособность инкапсулированных клеток в культуре.

Фетальные фибробластоподобные клетки человека 4-8-го пассажа суспендировали в стерильном растворе альгината натрия. Покапельно вносили суспензию клеток в раствор хлорида кальция на 10 мин для полимеризации геля. Полученные микроносители отмывали и переносили в культуральную среду, содержащую сыворотку. Микроносители культивировали в течение 4-х недель в 24-луночных плейтах, среду меняли через каждые 3 дня.

Жизнеспособность клеток в микроносителях определяли по восстановлению Alamar Blue (AB), которое отражает активность окислительно-восстановительных ферментов клетки.

Были подобраны оптимальные условия инкапсуляции, полимеризации, отмывки капсул. В результате инкапсуляция в установленных условиях приводила к образованию стабильных гомогенных капсул округлой или каплевидной формы 500-1000 мкм.

Клетки, инкапсулированные в альгинатные микроносители, в процессе культивирования были способны восстанавливать АВ, уровень восстановления АВ при этом не снижался.

Микроскопические исследования показали, что в ходе культивирования инкапсулированные клетки пролиферировали, и в отдаленные сроки (3 недели) культивирования в микроносителях формировались колонии.

Таким образом, фетальные фибробластоподобные клетки человека, инкапсулированные в альгинатные микроносители в установленных условиях, способны сохранять жизнеспособность и пролиферировать.

Research on applying cell microencapsulation into different polymer carriers has been recently performed. This technique enables to isolate cells against a recipient's immune system effect during transplantation, to maintain *in vitro* the phenotypic properties of certain cells, for example chondrocytes.

Alginate as heteropolymer of natural origin is a perspective material for cell encapsulation due to a high biocompatibility and the capability to degrade in organism with no toxic product formation.

Research aim was to determine the optimal conditions for human fibroblast-like cell encapsulation and to estimate the encapsulated cell viability in culture.

Human fetal fibroblast-like cells of 4-8 passages were suspended in a sterile sodium alginate solution. Cell suspension was dropwise introduced into calcium chloride solution within 10 min for gel polymerization. The obtained microcarriers were washed-out and transferred into a serum-contained culture medium. Microcarriers were cultured for 4 weeks in 24-well straws, medium was changed every 3 days.

Cell viability in microcarriers was determined by Alamar Blue (AB) recovery, reflecting the redox cell enzyme activity.

The optimal conditions of encapsulation, polymerization, capsule washing-out were selected. The encapsulation under established conditions resulted in formation of 590-1000 мм stable homogenous roundish and drop-shaped capsules.

Cells, encapsulated in alginate microcarriers during culturing were able to recover AB, the level of AB recovery was not thereby reduced.

Microscopic studies have demonstrated that during culturing the encapsulated cells proliferated and the colonies were formed in microcarriers in long terms (3 weeks) of culturing.

Thus, human fetal fibroblast-like cells, encapsulated into alginate microcarriers under established conditions are capable for viability preservation and proliferation.

Противоязвенная активность фракции до 5 кДа, полученной из криогемолизата кордовой крови, на модели субхронической язвы желудка у крыс

Е.С. Абакумова, Н.Н. Моисеева
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Antiulcer Activity of Cord Blood Cryohemolysate Fraction Less Than 5 kD in Model of Stomach Subchronic Ulcer in Rats

E.S. Abakumova, N.N. Moiseyeva
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Одним из новых направлений в лечении язвенной болезни является терапия, устраняющая биоэнергетические расстройства и восстанавливающая микроциркуляцию в ткани слизистой оболочки желудка. С этой целью применяют препарат Актовегин – фракцию до 5 кДа из криогемолизата крови молочных телят. Кордовая кровь имеет по сравнению с донорской более высокое содержание антиоксидантов, гемопоэтических и ростовых факторов.

Цель работы – исследовать противоязвенную активность фракции до 5 кДа, полученной из криогемолизата кордовой крови (ФКК), по сравнению с действием препарата Актовегин.

Противоязвенную активность изучали на модели аспириновой язвы желудка у крыс. Фракцию до 5 кДа выделяли методом ультрафильтрации из кордовой крови крупного рогатого скота, подвергнутой криодеструкции. Группам животных после формирования модели в течение 12 суток внутримышечно вводили: первой группе (контрольной) – физиологический раствор; второй – ФКК; третьей – препарат сравнения Актовегин. Четвертую группу составляли интактные крысы. Клинические и биохимические (активность щелочной фосфатазы, содержание ТБК-активных продуктов) показатели крови изучали на 3-, 7- и 12-е сутки. Кроме того, в указанные сроки проводили макроскопическое исследование гистологических срезов ткани из области язвы и желудка.

В результате введения ФКК и Актовегина на 12-е сутки нормализовался повышенный после формирования язвы уровень лейкоцитов (в отличие от контроля). Нормализация сниженного уровня эритроцитов наблюдалась только после введения ФКК на 3-и сутки и общего гемоглобина – на 12-е сутки. Гистологическое исследование ткани из области язвы выявило выраженные процессы регенерации слизистой оболочки желудка после введения ФКК и Актовегина по сравнению с контролем. Однако полноценная регенерация эпителия и соединительной ткани наблюдалась после введения ФКК. Повышенное вследствие язвообразования содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови нормализовалось после введения ФКК на 12-е сутки. Повышенная активность щелочной фосфатазы снижалась на 12-е сутки после введения ФКК до 390,2 Е/л, а Актовегина – до 347,9 Е/л по сравнению с контролем (489,5 Е/л). Макроскопическое исследование слизистой оболочки желудка показало полное отсутствие язвенных дефектов через 12 суток после введения как ФКК, так и Актовегина, а язвенный индекс контрольной группы составил 1,4 балла.

В результате проведенных исследований отмечено, что фракция до 5 кДа кордовой крови оказывает противоязвенное действие, стимулирует кроветворение, нормализует содержание эритроцитов и общего гемоглобина в более ранние сроки по сравнению с актовегином.

One of the new directions in gastric ulcer treatment is the therapy, eliminating bioenergetic disorders and recovering microcirculation in stomach mucous coat tissues. For this purpose one applies Actovegin preparation: less than 5 kDa fraction from veal calf blood cryohemolysate. Cord blood compared to donor one has a higher content of antioxidants, hemopoietic and growth factors.

Research was aimed to investigate an antiulcer activity of less than 5 kDa fraction, obtained from cord blood cryohemolysate (CBF) compared to Actovegin effect.

Antiulcer activity was studied in the model of aspirin gastric ulcer in rats. Less than 5 kDa fraction was isolated using the method of ultrafiltration from cattle cord blood, subjected to cryodestruction. Within 12 days after model formation we injected to the groups of animals the following preparations: physiological solution for the first group (control), CBF for the second and Actovegin comparative agent for the third one. The fourth group comprised the intact rats. Clinical and biochemical blood indices (alkyl phosphotase activity, content of TBA-active products) were studied to the 3rd, 7th and 12th days. In addition, within the mentioned terms we macroscopically studied histological sections of tissue from ulcer and stomach areas.

As a result of CBF and Actovegin administrations to the 12th day there was normalised the leukocyte level, increased after ulcer formation (in contrast to the control). The normalisation of reduced erythrocyte level was observed only after CBF introduction to the 3rd day and to the 12th day for total hemoglobin. Histological study of tissue in ulcer area revealed the manifested regenerative processes of stomach mucous coat after CBF and Actovegin introduction compared to the control. However an integral regeneration of epithelium and connective tissue was noted after CBF introduction. An increased content of TBA-active products in blood serum due to the ulcer formation was normalised after CBF injection to the 12th day. An increased activity of alkyl phosphatase and Actovegin reduced to the 12th day after CBF introduction down to 390.2 and 347.9 Unit/l correspondingly, compared to the control (489.5 Unit/l). Macroscopic study of stomach mucous coat demonstrated a complete absence of ulcer defects 12 days after introducing either CBF or actovegin and an ulcer index in the control group made 1.4 points.

As a result of the research performed the cord blood fraction less than 5 kDa was noted to cause an antiulcer effect, stimulate hemopoiesis, normalise erythrocyte and total hemoglobin content in earlier terms compared to actovegin.

Сезонные изменения уровня гликолиза у карася серебряного *Carassius auratus gibelio*

Е.Г. Жегунова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Seasonal Changes of Glucolysis Level in *Carassius auratus gibelio*

E.G. Zhegunova

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

Одним из механизмов приспособления к выживанию при низких температурах для многих видов животных, в частности карася серебряного *Carassius auratus gibelio,* является состояние оцепенения.

Цель работы – исследование роли гликолиза у карася при холодовой адаптации. Определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в направлении глюконеогенеза и гликолиза, содержание лактата и пирувата в белых и красных мышцах и печени.

Установлено, что глюконеогенетическая активность ЛДГ в красных и белых мышцах, а также печени была снижена у рыб, адаптированных к низкой температуре. Гликолитическая активность ЛДГ повышалась в зимний период по сравнению с летним во всех тканях карасей.

Не обнаружено достоверных различий между красными и белыми мышцами в глюконеогенетической активности ЛДГ у карасей, содержащихся при комнатной температуре, хотя гликолитическая активность ЛДГ в данных условиях содержания выше в белых мышцах.

Было показано, что зимой содержание лактата возрастает в белых и красных мышцах в 1,9 и 3,1 раза соответственно, а в печени в 2 раза. В то же время количество пирувата в мышцах достоверно не меняется в летний и зимний периоды, тогда как в печени уровень пирувата у холодоадаптированных рыб существенно снижается. Рассматривалось соотношение лактат/пируват, которое увеличивается при снижении температуры для всех тканей.

Полученные данные свидетельствуют о том, что энергообеспечение у карася при низких температурах осуществляется в основном за счет гликолиза. Поскольку потребность в кислороде при этом значительно снижена, энергетические потребности организма можно удовлетворить, используя анаэробный путь.

One of the mechanisms of adaptation to survival under low temperatures for many animal species especially wild type of gold fish *Carassius auratus gibelio* is torpor.

The research aim is study of the glycolysis role of the gold fish under adaptation to low temperatures. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in direction of gluconeogenesis and glycolysis, content of lactate and pyruvate in white and red muscles, as well as liver were determined.

It was established that LDH gluconeogenetic activity in red and white muscles, as well as in liver was reduced in fish adapted to low temperature. LDH glycolytic activity increased during winter period if compared with summer one in all tissues of *C. a. gibelio*.

No statistically significant differences were found between red and white muscles in gluconeogenetic activity of LDH of *C. a. gibelio* maintaining at room temperature, though LDH glycolytic activity under existing conditions were higher in white muscles.

It has been shown that under low temperature the amount of lactate increases in white and red muscles in 1.9 and 3.1 times, correspondingly and in 2 times in liver. At the same time pyruvate amount in muscles does not statistically and significanly change during summer and winter periods, while in liver the pyruvate level in cold-adapted fish significanly reduces. Lactate/pyruvate ratio was considered, which increased when temperature reduced for all the tissues.

The obtained data testify to the fact that energy providing in *C. a. gibelio* under low temperature is performed mainly due to glycolysis. Since the oxygen consumption considerably decreased and energetic demands of organism may be satisfied with use of anaerobic pathway.

Низкотемпературные фазовые переходы, стеклование и межмолекулярные взаимодействия в водных растворах оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n = 25

Е.Н. Животова
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Low-Temperature Phase Transitions, Glass Transition and Intermolecular Interactions in Aqueous Solutions of Oxyethylated Glycerol with Polymerization Degree of n = 25

E.N. Zhivotova
National Phrarmaceutical University, Kharkov

Оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации n=25 ($ОЭГ_{n=25}$) – эффективный непроникающий криопротектор для криоконсервирования эритроцитов. Исследование фазовых переходов и физических состояний сред, содержащих криопротекторы, а также межмолекулярных взаимодействий между криопротекторами и водой является важным этапом изучения механизма действия криопротекторов и внедрения их в практику. В данной работе исследованы фазовые переходы и стеклование водных растворов $ОЭГ_{n=25}$ при температурах ниже 273 К методами ДСК и световой криомикроскопии, а также с помощью указанных методов оценена степень гидратации молекул $ОЭГ_{n=25}$.

Термограммы водных растворов $ОЭГ_{n=25}$ получены при нагреве со скоростью 0,5 К/мин. Средняя скорость охлаждения составляла 200 К/мин. Построена диаграмма физических состояний водных растворов $ОЭГ_{n=25}$ в концентрационном (0÷100% масс) и температурном (123÷273 К) диапазонах. Результаты криомикроскопических исследований водных растворов $ОЭГ_{n=25}$ фиксировали фотографически при скорости охлаждения 30 К/мин и скорости нагрева 5 К/мин. Показано, что при концентрациях $ОЭГ_{n=25}$ ниже 47% система затвердевает в гетерофазном состоянии, т.е. включает кристаллическую (мелкие кристаллы льда) и аморфную (стеклообразные включения концентрированного 70%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$) фазы. При концентрациях $ОЭГ_{n=25}$ выше 48 % система затвердевает в гомофазном аморфном состоянии. Дальнейший нагрев растворов 48÷65% вызывает кристаллизацию льда в виде дендритов различных порядков и приводит к формированию аморфных включений 65%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$. Растворы $ОЭГ_{n=25}$ (66÷76%) остаются аморфными. В растворах с диапазоном концентрации $ОЭГ_{n=25}$ (77÷100%) отмечается кристаллизация $ОЭГ_{n=25}$ с формированием аморфных включений 77%-го раствора $ОЭГ_{n=25}$. По данным криомикроскопии при концентрации 77÷100% наблюдается образование упорядоченной структуры на этапе охлаждения. В целом данные ДСК соответствуют данным криомикроскопии.

На основании анализа диаграммы состояния определено, что одна молекула $ОЭГ_{n=25}$ может связать 71-72 молекулы воды, из которых 35-36 прочно связанные. Методом ИК-спектроскопии обнаружено, что с увеличением концентрации воды наблюдается частотный сдвиг максимума полосы поглощения, связанной с колебаниями С–О–С групп, что свидетельствует о взаимодействии воды с атомом кислорода. Максимальный частотный сдвиг достигается при соотношении около 75 молекул воды на молекулу $ОЭГ_{n=25}$. Полученные результаты согласуются с данными метода ДСК.

Oxyethylated glycerol with polymerization index n=25 ($OEG_{n=25}$) is quite effective non-penetrating cryoprotectant for cryopreservation of erythrocytes. The studies of phase transitions and physical states of the media containing the cryoprotectants as well as the interactions between molecules of cryoprotectants and water form the main stage of investigating the mechanisms of the effect of cryoprotectants and their introduction into practice. In this research the phase transitions and vitrification of aqueous solutions of $OEG_{n=25}$ at temperatures lower than 273 K with the DSC methods and light cryomicroscopy as well as using the mentioned hydration rate of $OEG_{n=25}$ molecules were studied.

Thermograms of aqueous solutions of $OEG_{n=25}$ were obtained during heating with the rate of 0.5 K/min. An average cooling rate made 200 K/min. The graphing of physical states of $OEG_{n=25}$ aqueous solutions within the ranges of 0÷100% w/w concentrations and 123÷273 K temperatures was performed. The results of cryomicroscopic studies of aqueous solutions of $OEG_{n=25}$ were photographically fixed at 30 K/min cooling rate and 5 K/min heating one. It has been shown that under $OEG_{n=25}$ concentrations below 47% the system solidifies in a heterophase state, i.e. comprises crystalline (small ice crystals) and amorphous (vitreous inclusions of concentrated 70% $OEG_{n=25}$ solution) phases. Under $OEG_{n=25}$ concentrations above 48% the system solidifies in homophase amorphous state. The following heating of the solutions within the range of 48÷65% results in ice crystallization as dendrites of various orders and leads to the formation of amorphous inclusions of 65% $OEG_{n=25}$ solution. The solutions of $OEG_{n=25}$ (66÷76%) remain amorphous. In $OEG_{n=25}$ solutions with concentration range (77÷100%) there is found a crystallization of $OEG_{n=25}$ with the formation of amorphous inclusions of 77% $OEG_{n=25}$ solution. According to cryomicroscopy within the concentration of 77÷100% there is observed the formation of an ordered structure at the stage of cooling. In a whole the DSC and cryomicroscopy data are in conformity.

With basing on the analysis of diagram of the state there was found that one molecule of $OEG_{n=25}$ may bind 71-72 water molecules among those 35-36 are tightly bound. By means of IR spectroscopy there was found that with a rise in water concentration there is observed a frequency shift of absorption band maximum connected to the deviations of C-O-C groups that testifies to water interaction with oxygen atom. Maximum frequency shift is achieved at the ratio of about 75 water molecules per $OEG_{n=25}$ one. The obtained results are confirmed with the data obtained with DSC method.

Исследование криоповреждений дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* флуоресцентными методами

И.А. Буряк
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Fluorescent Studies of *Saccharomyces cerevisiae* Cryodamage

I.A. Buryak
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Развитие техники флуоресцентного анализа и появление новых флуоресцентных зондов расширяют возможности применения флуоресцентных методов в биологии.

Цель данной работы – исследование возможностей применения флуоресцентного красителя К8-3010, синтезированного в ГНУ "Институт монокристаллов", для выявления повреждений клеток после холодовых воздействий.

Объектом исследования являлись грибы *Saccharomyces cerevisiae*. Штамм получали в ГНИИ "Генетика" (Москва). Дрожжи для исследований выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 48 ч при 30°С и смывали с питательной среды физиологическим раствором. Суспензии клеток замораживали в криопробирках фирмы Corning двумя способами: быстрое замораживание (погружение в жидкий азот) и медленное (помещение пробирок в морозильную камеру при температуре –20°С). Образцы отогревали на водяной бане при 30°С. После замораживания-отогревания в суспензию клеток дрожжей вводили краситель К8-3010 и исследовали на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur и на флуоресцентном микроскопе Olympus IX - 70. Оценивали жизнеспособность клеток после замораживания-отогревания чашечным методом Коха по количеству образовавшихся макроколоний, используя для контроля показатели жизнеспособности для незамороженных клеток. Аналогичные исследования проводили на клетках, обработанных различными дозами озона. Зонд К8-3010 окрашивает оболочки неповрежденных клеток в ярко-зеленый цвет и имеет ограниченную проницаемость внутрь них, о чем свидетельствует менее яркое свечение цитоплазмы. Нарушение проницаемости оболочки клеток для красителя проявляется в окрашивании цитоплазмы и внутриклеточных органелл в ярко-зеленый цвет. Было установлено, что по степени повреждения клеток замораживанием выявляются две субпопуляции с разной интенсивностью окрашивания клеток красителем К8-3010, причем данный метод позволяет выявить влияние способа замораживания на степень повреждения. Результаты исследования повреждений клеток флуоресцентными методами коррелируют с результатами оценки жизнеспособности клеток методом Коха.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования красителя К8-3010 в криобиологии для выявления повреждений клеток после криоконсервирования, однако разработка конкретных протоколов его использования для обнаружения повреждений клеток различных видов является предметом дальнейших исследований.

Development of fluorescent analysis techniques and appearance of new fluorescent probes have extended the possibilities for fluorescent method application in biology.

This research was aimed to investigate the possibilities for K8-3010 fluorescent dye application, synthesised at the Scientific and Technological Corporation "Institute for Single Crystals" in order to reveal cell damages after cold effects.

Saccharomyces cerevisiae fungi served as the research object. Strain was obtained at the State R&D Institute "Genetics" (Moscow). Yeast for research was grown at a slant wort agar-agar within 48 hours at 30°C and washed-out from nutrient medium with physiological solution. Cell suspensions were frozen in Corning cryovials using two ways: rapid freezing (immersion into liquid nitrogen) and a slow one (vial placing into freezing chamber at –20°C). Samples were thawed on water bath at 30°C. After freeze-thawing the K8-3010 dye was added into yeast cell suspension, studied with BD FACS Calibur flow cytometer and with Olympus IX-70 fluorescent microscope. Cell viability was estimated after freeze-thawing with dish Koch method by the number of formed macrocolonies using the viability indices for unfrozen cells as the control. The same research was carried-out in the cells, treated with different ozone doses. K8-3010 probe stains the membranes of undamaged cells in a bright green colour and has a limited permeability inside of them, that is testified by a less bright cytoplasm fluorescence. Disorder in cell membrane permeability for a dye is manifested in cytoplasm and intracellular organelle staining in bright green colour. There was established that according to the cell damage extent by freezing the two subpopulations with various intensity rates of K8-3010 cell staining were revealed, moreover this method enabled to reveal the freezing effect on a damage extent. Results of cell damage study using fluorescence methods correlate with those of cell viability estimation using Koch method.

The results obtained testify to the perceptiveness of K8-3010 dye use in cryobiology in order to reveal cell damages after cryopreservation, however the elaboration of detailed protocols for the probe usage to find-out damages for different cells is the subject of further research.

Особенности микрогемоциркуляции после острой общей гипотермии

Д.Г. Луценко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Microhemocirculation after Acute Total Hypothermia

D.G. Lutsenko

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

В конструкции микроциркуляторного русла каждого органа отражаются его специфические функции и общие системные закономерности. На микроциркуляторном уровне проявляются ответные реакции организма как на внешнее, так и внутреннее воздействие. Гипотермическое воздействие вызывает комплекс адаптационно-компенсаторных реакций организма, ярко проявляющихся на микроциркуляторном уровне. Происходящие сложные динамические процессы не могут быть однозначно описаны традиционными методами. Применение фрактального анализа позволяет интегрально охарактеризовать структурно-функциональное состояние системы микрогемоциркуляции.

Цель исследования – изучение ранних микрогемоциркуляторных ответов кожи, мышц, печени крыс на гипотермическое воздействие.

На крысах-самцах методом прижизненной биомикроскопии проводилась видео- и фоторегистрация микрососудов тканей, исследовалась реакция микрогемоциркуляторного русла кожи, мышц и печени при остром общем охлаждении. Для анализа полученных результатов применялись традиционные методы морфометрии и расчеты фрактальной размерности D.

Показано, что гипотермия в ранние сроки приводит к изменениям в системе микроциркуляции. В подкожной клетчатке отмечено резкое сокращение количества функционирующих сосудов. Все видимые микрососуды спазмированы, кровоток замедлен. В поле зрения наблюдались сосуды, не содержащие форменных элементов и заполненные только плазмой крови, а также спавшиеся микрососуды. В икроножных мышцах крыс отмечалось сокращение числа функционирующих сосудов и спазм всех элементов микроциркуляторного русла; кровоток быстрый струйный. Исследование печени показало его полнокровие. Терминальные печеночные венулы значительно увеличены, синусоиды расширены.

При фрактальном анализе было обнаружено, что значения фрактальной размерности D после гипотермии отличаются от контрольных: D повышаются как в периферических тканях (кожа, мышцы), так и в “ядре” (печень), хотя и в разной степени, при этом все значения остаются в зоне персистентности, функциональная система становится более лабильной и стремится к восстановлению. Таким образом, фрактальный анализ микроангиоархитектоники позволяет выявить особенности реагирования системы микроциркуляции, не выявляемые другими методами.

In microcirculatory channel construction of each organ there is reflected its specific functions and general system regularities. In a microcirculatory level the organism responses are manifested both on external and internal effects. Hypothermic effect causes the complex of organism adaptation-compensatory responses, highly manifesting on microcirculatory level. The occurring complicated dynamic processes can not be uniformly described using the traditional methods. Application of fractal analysis enables making the integral characteristics of structural and functional state of microhemocirculation system.

Research was aimed to study the early microhemocirculatory responses of rat’s skin, muscle and liver to hypothermic effect.

In male rats using the method of supravital biomicroscopy the tissue microvessels were video- and photorecorded, the response of microhemocirculatory channel of skin, muscles and liver at acute general cooling was studied. The standard morphometric methods and calculations of fractal dimension, D, were applied to analyze the results obtained.

Hypothermia in early terms was shown to result in microcirculation system changes. In subcutaneous fat there was noted a sharp reduction of a number of functioning vessels. All visible microvessels are cramped, blood flow is slowed down. The vessels free of formed elements and filled only with blood plasm as well as collapsed microvessels were observed in a visual field. In rat’s *musclulus gastrocnemius* there was noted a contraction of functioning vessels and a spasm in all microcirculatory channel elements; blood flow was rapid and stream. Liver examination showed its plethora. There were significantly increased terminal liver venules and extended sinusoids.

During fractal analysis the fractal dimension, D, values after hypothermia were found-out as different from the control: D increased in both peripheric (skin, muscles) tissues and “nucleus” (liver) although in a different extent, at the same time all values remained in persistence area, the functional system became more labile and approached to recovery. Thus, the fractal analysis of microangioarchitecture enables to reveal the peculiarities of response of microcirculation system impossibly to found-out using other ways.

Жизнеспособность клеток после экспозиции и быстрого замораживания-отогрева в многокомпонентных витрифицирующих растворах

Н.А. Горохова
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cell Viability After Exposure and Rapid Freeze-Thawing in Polycomponent Vitrifying Solutions

N.A. Gorokhova
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Ранее были определены растворы, включающие ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозу, которые при быстром замораживании и отогреве не образовывали кристаллов льда (Горохова Н.А., 2006). Применение этих растворов для криоконсервирования клеточных суспензий методом витрификации требует изучения их влияния на жизнеспособность клеток.

Цель работы – определить жизнеспособность эмбриональных фибробластоподобных клеток после экспозиции в витрифицирующих растворах и последующего быстрого замораживания-отогрева.

В работе использовали растворы ДЭПС-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% 1,2-ПД и 0,5 М сахарозы) и ДЭПС-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% 1,2-ПД и 1М сахарозы). Витрифицирующий раствор добавляли к суспензии эмбриональных фибробластоподобных клеток при комнатной температуре в два этапа. Замораживание-отогрев образцов объемом 0,5 мл проводили в стандартных криопробирках Corning, которые помещали в жидкий азот и хранили в течение 24 ч, после чего отогревали на водяной бане при 40°С. Для удаления криозащитной среды использовали двухэтапное (способ 1) или одноэтапное (способ 2) отмывание. Сохранность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим, жизнеспособность – по эффективности прикрепления клеток к поверхности пластика и характеру поведения в условиях культивирования.

В контрольной группе сохранность эмбриональных фибробластоподобных клеток составляла 90,3±2,9%, а эффективность прикрепления в течение 24 ч культивирования – 96,9±1,2%. После экспозиции клеток в растворе ДЭПС-1 и удаления криозащитной среды их сохранность составляла 71,7±2,1% при первом способе отмывания и 78,3±2,5% - при втором, а эффективность прикрепления – 75,6±6,5 и 72,9±6,2% соответственно. После экспозиции клеток в растворе ДЭПС-2 сохранность составляла 71,8±2,6 и 78,4±3,5%, а эффективность прикрепления – 80,2±2,1и 69,5±7,6% соответственно. После замораживания-отогрева в среде ДЭПС-1 сохранность клеток не изменялась, а в ДЭПС-2 снижалась в 1,7 раза при использовании обоих способов отмывания. Эффективность прикрепления после замораживания-отогрева под защитой ДЭПС-1 снижалась на 20%, а ДЭПС-2 – на 35% по отношению к данному показателю после экспозиции. Клетки, криоконсервированные под защитой ДЭПС-1, проявляли большую способность к распластыванию и пролиферации.

We have previously determined the DMSO, EG, 1,2-PD and sucrose-containing solutions without forming ice crystals under rapid freeze-thawing (N.A. Gorokhova, 2006). Applying these solutions for cell suspension cryo-preservation using the vitrification method requires studying their effect on cell viability.

This research was aimed to determine the viability of embryonic fibroblast-like cells after exposure in vitrifying solutions and following rapid freeze-thawing.

The DEPS-1 (10% DMSO, 20% EG, 20% 1,2-PD and 0.5 M sucrose) and DEPS-2 (10% DMSO, 15% EG, 15% 1,2-PD and 1 M sucrose) solutions have been used in this research. Vitrifying solution was added into an embryonic fibroblast-like cell suspension in two-step at room temperature. Samples with 0.5 ml volume were frozen-thawed in Corning standard cryovials, placed into liquid nitrogen and stored for 24 hrs, then thawed on water bath at 40°C. Either two-step (way 1) or one-step washing-out procedures were applied for cryoprotective medium removal. Cell integrity was assessed by trypane blue staining and the viability was done by cell attachment efficiency to a plastic surface and behaviour character under culturing.

In the control group the integrity of embryonic fibroblast-like cells made 90.3±2.9%, and the attachment efficiency within 24 hrs of culturing was 96.9±1.2%. After cell exposure in DEPS-1 solution and cryoprotective medium removal using the first and second washing-out ways the cell integrity was 71.7±2.1 and 78.3±2.5%, correspondingly, but the attachment efficiency was 75.6±6.5 and 72.9±6.2%, correspondingly. After cell exposure in DEPS-2 solution the integrity was 71.8±2.6 and 78.4±3.5% and the attachment efficiency was 80.2±2.1 and 69.5±7.6%, respectively. After freeze-thawing in DEPS–1 solution the cell integrity was unchanged but reduced in 1.7 times in DEPS-2 when using both washing-out ways. The attachment efficiency after freeze-thawing under DEPS-1 and DEPS-2 protections reduced by 20 and 35%, correspondingly, in respect to this index after exposure. The cells cryopreserved under DEPS-1 protection manifested higher flattening and proliferative ability.

Взаимодействие стромальных клеток с углеродными композиционными материалами в условиях культивирования

Ю.А. Петренко[1], И.В. Гурин[2]
[1]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
[2]Национальный научный центр "Харьковский физико-технический институт"

Interaction of Stromal Cells with Carbon Composite Materials Under Culture Conditions

Yu.A. Petrenko[1], I.V. Gurin[2]
[1]Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov
[2]Kharkov Physical and Technical Institute

Углеродные композиционные материалы (УКМ) используются в медицине для остеосинтеза при переломах костей; из них изготавливают эндопротезы костей конечностей, а также имплантаты для пластики связок и свода черепа. В настоящее время большое внимание уделяется клеточной терапии, основанной на способности стволовых клеток замещать поврежденные клетки и ткани реципиента при трансплантации. При этом чаще всего клетки культивируются *ex vivo*, а затем уже вводятся пациенту. Использование углеродных композиций как носителей для выращивания клеток может послужить основой для создания трехмерных структур на основе стволовых клеток для замещения поврежденных тканей организма после трансплантации. Однако вопрос о биосовместимости данных композиционных материалов с клетками остается малоизученным.

В работе исследовали взаимодействие стромальных клеток человека с углеродными композиционными материалами в условиях культивирования *in vitro*.

Стромальные клетки (СК) культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 15% эмбриональной сыворотки, L-глутамин, пенициллин и стрептомицин при наличии или отсутствии углеродных материалов. УКМ вносили в лунки пластиковых планшетов в виде отдельных нитей или сотканных из них плоских однослойных пластинок. Метаболическую и пролиферативную активность клеток определяли с использованием индикатора Alamar Blue (AB). Уровень восстановленности AB определяли флуориметрически. Микроскопические исследования проводили с использованием инвертированного микроскопа CETI, снабженного цифровой камерой Nikon CoolPix 4500. В некоторых случаях клетки фиксировали нейтральным формалином и окрашивали азур-эозином или гемотоксилин-эозином.

Совместное культивирование СК и углеродными материалами в течение одной недели не приводило к изменениям метаболической или пролиферативной активности СК по сравнению с клетками, культивированными при отсутствии УКМ. Выявлена способность клеток адгезировать на УКМ. После 2-х недель культивирования происходило выселение клеток на УКМ, клетки пролиферировали и образовывали тяжи среди углеродных нитей. При последующем культивировании клетки были способны заполнять пространства между нитями УКМ.

Таким образом, углеродные композиционные материалы являются не токсичными для стромальных клеток и могут быть использованы в качестве носителей клеток для последующего создания 3-мерных структур.

Carbon composite materials (CCM) are used in medicine for the osteosynthesis after bone fractures, as the bone prosthetic devices. CCM are also used as implants for the tendon and skull plastics. Nowadays much attention is made to cell therapy, which is based on the ability of stem cells to replace damaged cells and tissues after transplantation. In this case cells are often cultured *ex vivo* and then infused to patient. The application of carbon materials as carriers for cells during culture could be the basis for the development of three-dimensional structures, contained stem cells for the replacement of damaged tissues after transplantation. However the question about biocompatibility of such composite materials with cells is still out of the way.

This study describes the interaction between human stromal cells with carbon composite materials during *in vitro* culture.

Stromal cells (SC) were cultured in DMEM, supplemented with 15% fetal serum, L-glutamine, penicillin and streptomycin in the presence or absence of carbon materials. CCM were added to multi-well plates as separate strings or flat, single-layered fabrics. Metabolic and proliferative activity of cells was determined by Alamar Blue (AB). The level of AB reduction was assessed by fluorescent measurements. Microscopic investigations were made with the application of inverted microscope CETI, supplied with digital camera Nikon CoolPix 4500. In several cases cells were fixed in neutral formalin and stained by azur-eosine or hematoxylin-eosine.

The co-culture of SC with carbon materials during one week did not cause changes in metabolic and proliferative activity of SC, compared to cells, cultured in the absence of CCM. Cell had the ability to adhere to CCM. After 2 weeks of culture, the migration of cells on the CCM was observed. Cell proliferated and formed cords between carbon fibres. During followed culture cells could fill the space between CCM strings.

Therefore, carbon composite materials are non-toxic to stromal cells and could be used as a carrier for the development of three-dimensional structures.

Влияние озонированного раствора на восстановительные процессы в коже после криоповреждения

Е.В. Сомова
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Ozonized Solution on Recovery Processes in Skin After Cryodamage

E.V. Somova
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Кислородно-озоновая терапия широко применяется в клинической практике. Представляет интерес исследовать возможности использования озонированных растворов для лечения холодовых травм.

Цель работы – изучение динамики заживления криоповреждений кожи под влиянием озонотерапии.

Работа выполнена на белых крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985). Для моделирования холодовых травм использовали медный аппликатор диаметром 10 мм, охлажденный жидким азотом до температуры –196°С. Время аппликации 60 с. Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали на установке с генератором озона безбарьерного типа, сконструированной в ИПКиК НАН Украины. Для измерения площади криоповреждений использовали планиметрический метод. Регистрацию излучения кожи в инфракрасном диапазоне (длина волны 8-14 мкм) осуществляли портативным тепловизором (патент 23521. Україна). Проводили гистологическое исследование фрагментов кожи в области холодовых травм. Срезы толщиной 6-8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Оценивали антиоксидантную активность сыворотки крови методом индуцированной хемилюминесценции на спектрофлуориметре “Hitachi” F4010.

Животные были разделены на две группы: первая (контроль) – животные после криоповреждения; вторая– животные, которым подкожно в область криодеструкций ежедневно, начиная со 2-х суток, подкожно вводили ОФР с концентрацией озона 1 мг/л после криоповреждения. Динамику заживления кожи после холодового повреждения и влияния ОФР изучали на 1, 3, 7 и 14-е сутки.

Использование при лечении озонированных растворов с концентрацией озона (1 мг/л) улучшает регенераторные процессы в коже после холодовых воздействий: достоверное уменьшение площади повреждений у животных второй группы по сравнению с контролем, а также полная эпителизация холодовых деструкций на 14-е сутки. Новообразованная рубцовая ткань состоит из тонких коллагеновых волокон и имеет нежную структуру. Показатели инфракрасного излучения поверхности травм к 14-м суткам достигают исходных значений. Результаты исследований подтверждают позитивное влияние озона на активизацию процессов антиокислительной защиты организма.

Oxygen-ozone therapy has been widely applied in clinical practice. Of interest is to investigate the possibilities of ozonized solutions in treating cold traumas.

The research was targeted to study the dynamics of skin cryodamage healing under ozone therapy effect.

Research was carried-out in 250-300 g Wistar white male rats with meeting the international principles of “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985). In order to model cold traumas we used a copper applicator with 10 mm diameter cooled with liquid nitrogen down to –196°C. Application time was 60 sec. Ozonized physiological solution (OPS) was obtained using the device with barrier type ozone generator, designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Skin irradiation within an infrared range (8-14 мм wavelength) was recorded using a portable thermovision camera (Patent 23521. Ukraine). Histological study of skin fragments in cold trauma site was carried-out. Sections of 6-8 microns depth were hematoxylin and eosin stained. Antioxidant activity (AOA) of blood serum was evaluated using the method of induced chemiluminescence with “Hitachi” F4010 spectrofluorimeter.

Animals were divided into two groups: the first one (control) comprised the animals after cryodamage; in the second one there were animals with daily introduced OPS under 1 mg/l ozone concentration into cryodestruction area starting from the 2nd day. Dynamics of skin healing after cold damage and OPS effect was studied to the 1st, 3rd, 7th and 14th days.

Usage of ozonized solutions with 1 mg/l ozone concentration improves the regenerative processes in skin after cold effects: a statistically significant reduction of damage area in animals in the second group compared to the control, as well as a complete epithelialization of cold destructions to the 14th day were observed. The indices of infrared irradiation of trauma surface approach to the initial values by the 14th day. Newly formed sicatricial tissue consists of thin collagenous fibers and has a soft structure. Research results confirm a positive ozone effect on activation processes of antioxidant protection of organism.

Особенности изменения морфофункциональных свойств клеток аденокарциномы Эрлиха после действия факторов криоконсервирования

О.В. Сафранчук
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of Changes in Morphofunctional Properties of Ehrlich's Carcinoma Cells After Effect of Cryopreservation

O.V. Safranchuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Исследования основных принципов поведения стволовых клеток (СК) различного происхождения позволяют понять общебиологические характеристики клеточных популяций в норме и патологии. Установлено, что характерная для СК иерархическая организация имеет место и в популяции раковых клеток, стволовой компартмент которых, проявляя определенные "автономные" признаки, тем не менее находится под строгим контролем своего микроокружения. Воздействуя теми или иными факторами на общий пул клеток с такими гистогенетическими характеристиками, можно проследить особенности изменения состояния каждой из его составляющих. Одним из факторов, способных существенно изменить свойства биообъекта в зависимости от его исходного морфофункционального состояния, является криоконсервирование.

Аденокарцинома Эрлиха (АКЭ) с фиксированными по времени фазами развития и гетерогенным, детерминированным соотношением субпопуляций клеток – удобная модель для изучения изменений, зависящих от различий в исходном состоянии клеток.

Цель работы – изучить морфофункциональные свойства клеток АКЭ на разных фазах ее развития после воздействия факторов криоконсервирования.

Эксперименты выполнены на 7-месячных самках мышей (BALB/c). Клетки АКЭ вводили животным внутрибрюшинно в дозе 3×10^6 в 0,3 мл физиологического раствора, затем их получали у животных на 7 и 14-е сутки развития, криоконсервировали в асцитической жидкости (скорость 1°С/мин до –80°С; 300-400°С/мин – от –80 до –196°С). Жизнеспособность клеток оценивали пропидий йодидом (PI). Методом проточной цитофлуориметрии определяли количество CD-29^+ клеток, в клеточной суспензии – количество апоптотических клеток и профиль клеточного цикла.

Жизнеспособность криоконсервированных клеток, полученных на 7-е сутки развития, составила 80,04 (натив 95,02%), на 14-е – 70,05% (натив 90,10%). После криоконсервирования количество $CD29^+$ клеток в 7-суточной популяции было 95,29 (натив 83,27%), в 14-суточной – 1,08% (натив 3,63%). Таким образом, на логарифмической фазе развития АКЭ (7-е сутки) субпопуляции CD-29^+ клеток присуща значительная криоустойчивость, связанная, очевидно, с их акцессорными функциями.

На 7-е сутки развития АКЭ количество клеток в апоптозе не превышало 4,66%, к 14-м суткам увеличивалось до 6,90%. Криоконсервирование увеличило данный показатель к 7-м суткам до 17,12, а к 14-м – до 21,07%. Существенно изменялся и пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Так, после криоконсервирования количество клеток в S-фазе клеточного цикла на 7-е сутки развития составило 13,01 (натив 15,20%), а на 14-е сутки – 4,13 (натив 10,21%).

Криоконсервирование ингибирует функциональный статус клеток АКЭ, при чем в большей степени, в отношении клеток с высоким пролиферативным потенциалом.

The studies of main principles of behavior of stem cells (SCs) of various origins enable the understanding of general biological characteristics of cell populations in the norm and pathology. It has been established that characteristic for SCs hierarchical organization has the place in the population of cancer cells as well. Their stem compartment when manifesting the certain "autonomous" signs nevertheless there is under strict control of its micro-environment. By affecting with some factors on general pool of cells with such histogenetic characteristics one may trace the peculiarities of the state of each of its components. One of the factors able to change the properties of biological object depending on its initial morphofunctional state is cryopreservation.

Ehrlich carcinoma (EC) with fixed in time the developmental stages and heterogenous determined ratio of cell subpopulations is convenient model for investigating the changes dependant on the differences in initial state of the cells.

The research aim is to study morphofunctional properties of EC cells at different phases of EC development after cryopreservation factors' effect.

The experiments are performed in 7 months female mice (BALB/c). EC cells were introduced to the animals intraperitoneally in the dose of 3×10^6 in 0.3 ml of physiological solution, afterwards they were obtained from animals to the 7^{th} and 14^{th} days of development, cryopreserved in ascitic fluid (rate of 1°C/min down to –80°C; 300-400°C/min from –80 down to –196°C). Cell viability was estimated with propidium iodide (PI). The number of $CD29^+$ cells was found with flow cytometry method. In cell suspension the number of apoptotic cells and profile of cell cycle were examined.

Viability of cryopreserved cells derived to the 7^{th} day of development made 80.04% (95.02% for native), to the 14^{th} day it was 70.05% (90.10% for native). After cryopreservation the number of $CD29^+$ cells in the 7^{th}-day population made 95.29% (83.27% for native), in the 14^{th}-day it was 1.08% (3.63% for native). Thus at logarithmic development stage of EC (the 7^{th} day) the subpopulations of $CD29^+$ cells are characterized with significant cryoresistance, likely related to their accessory functions.

To the 7^{th} day of EC development the number of EC cells in apoptosis did not exceed 4.66% to the 14^{th} day it increased up to 6.90. Cryopreservation increased this index to the 7^{th} day up to 17.12% and up to 21.07% to the 14^{th} day. Proliferative potential of tumor cells also significantly altered. So, after cryopreservation the number of cells in S-phase of cell cycle to the 7^{th} day of development made 13.01% (15.20% for native) and to the 14^{th} day it was 4.13 (10.21% for native).

Cryopreservation inhibits the status of EC cells in respect of the ones with a high proliferative potential.

Изучение состава тканевых экстрактов

Н.Ю. Ермакова
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Tissue Extract Composition

N.Yu. Ermakova
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Цель работы – изучение состава водно-солевых экстрактов кожи и селезенки свиньи, а также экстракта, полученного из пчелиного подмора (апиэкстракта).

Методами трехмерной флуоресцентной спектроскопии и хемилюминометрии (Hitachi U3210, Япония) были изучены состав и антиокислительная активность экстрактов. Состав тканевых экстрактов оценивали на автоматическом анализаторе аминокислот AAA-T-339M (Чехия). Проявление биологической активности апиэктрактов определяли по показателям роста криоконсервированной культуры *Saccharomyces cerevisiae*.

Экстракт, полученный из пчелиного подмора, содержит фракции флавоноидов и каротиноидов. В экстрактах тканей свиньи обнаруживается флуоресценция аминокислотных остатков тирозина и триптофана.

Антиокислительную способность экстрактов определяли по изменению скорости гашения хемилюминесценции фенилового эфира акридинийкарбоновой кислоты в присутствии перекиси водорода.

Экстракты из пчел обладают высокой антиоксидантной активностью, сравнимой с таковой для антиоксидантных препаратов (кверцетин, аскорутин и т.п.). Экстракты из кожи свиньи обладают антиокислительной активностью, зависящей от возраста животного. Так, экстракты из тканей новорожденной свиньи имеют более высокую активность, чем из кожи половозрелого животного: для экстрактов кожи эти значения составляют $4{,}16\times10^{-5}$ и $3{,}19\times10^{-5}$ 1/мл×с соответственно.

Апиэкстракт, введенный в среду культивирования криоконсервированных клеток *Saccharomyces cerevisiae*, увеличивает количество колониеобразующих единиц на 30%, что может свидетельствовать о стимулирующем его действии на репарационные процессы в клетках культуры.

Анализ состава изученных экстрактов позволяет оценить перспективы их использования в качестве компонентов регенерирующих комплексов.

The research was aimed to study the composition of pig skin and spleen aqueous-saline extracts, as well as those procured from dead bee bodies (apiextract).

The extract composition and antioxidant activity have been studied using 3D fluorescent spectroscopy and chemiluminometry (Hitachi U3210, Japan). Tissue extract composition was estimated using an automatic aminoacid analyser AAA-T-339M (Czechia). Manifestation of apiextract biological activity was determined by the growth indices of *Saccharomyces cerevisiae* cryopreserved culture.

The extract, procured from dead bees contains flavonoid and carotinoid fractions. Fluorescence of tyrosine and triptophane aminoacid residuals has been revealed in pig tissue extracts.

Anti-oxidative capability of extracts was determined by the change in chemiluminescence extinction rate of acridine-carboxyl acid phenyl ether in peroxide presence. Bee extracts have a high antioxidant activity, compared to that of antioxidant preparations (quercetin, ascorutin etc.). Pig skin extracts have an antioxidant animal age-dependent activity. Thus, extracts from newborn pig tissues are more active than those of mature animal: for skin extracts these values make 4.16×10^{-5} and 3.19×10^{-5} 1/ml×sec, correspondingly.

Apiextract, introduced into the culture medium of *Saccharomyces cerevisiae* cryopreserved cells increases the number of colony-forming units by 30%, that may testify to its stimulating effect on reparative processes in the culture cells.

Analysing the composition of extracts under study enables to estimate the perspectives of their usage as components of regenerating complexes.

Цитофлуориметрическая оценка эффективности криоконсервирования цельной суспензии и различных субпопуляций адреноцитов новорожденных поросят

Г.В. Дудецкая, В.Д. Устиченко, Н.М. Алабедалькарим
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Flow Cytometry Estimation of Cryopreservation Efficiency of Whole Suspension and Different Subpopulations of Newborn Piglet Adrenocytes

G.V. Dudetskaya, V.D. Ustichenko, N.M. Alabedalkarim
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В настоящее время разработаны успешные режимы криоконсервирования органотипических культур надпочечных желез. Однако попытки криоконсервирования суспензии адренокортикальных клеток мышей и новорожденных поросят, особенно с высокими скоростями замораживания-отогрева, были неудачными. При переносе клеток из криозащитной в изотоническую среду культивирования резко снижалась не только жизнеспособность, но и клеточность суспензии адреноцитов, криоконсервированной со скоростью замораживания более 100°С/мин. По результатам криотолерантности адреноцитов, криоконсервированных в виде фрагментов, сделано предположение: ограничение объемных изменений клеток на этапах добавления-удаления криопротектора и при замораживании-отогреве повышает сохранность криоконсервированных клеток надпочечников.

Цель работы – оценка целостности цитоплазматической мембраны и митохондриального потенциала прикрепленных адреноцитов с использованием флуоресцентных красителей (пропидиум йодид (PI), FDA и JC1) после замораживания-отогрева.

Адреноциты новорожденных поросят получали ферментативным способом, различные популяции клеток – разделением в градиенте фиколла. Для выполнения работы адреноциты прекультивировали 18 ч на подложке – фрагменте тонкого кишечника новорожденных поросят (SIS). Замораживание-отогрев осуществляли по методу Гуриной, разработанному для органотипических культур надпочечников новорожденных поросят. Для цитофлуориметрического анализа клетки снимали с подложки трипсинизацией и окрашивали PI, FDA и JC1.

Процент некротических клеток, определенный по включению PI, достоверно не отличался для нативных и криоконсервированных адреноцитов. Установлено, что при окрашивании FDA не сохраняется целостность цитоплазматической мембраны нативных и криоконсервированных клеток. Однако анализ соотношения оранжевой и зеленой флуоресценции при окрашивании JC1 выявил различную криочувствительность дифференцированных субпопуляций адреноцитов. Достоверных изменений в митохондриальной активности после криоконсервирования для неразделенной суспензии адреноцитов и основной популяции клеток, выделенной в градиенте фиколла с плотностью 1,0274 г/см^3, не установлено. Значительная криочувствительность характерна для клеток, локализованных в градиентах фиколла с плотностью 1,044-1,058 г/см^3. Мы полагаем, что данный эффект может быть связан с преактивацией этих субпопуляций адреноцитов в процессе раздельного культивирования, предшествующего криоконсервированию.

Nowadays there have been designed the successful cryopreservation regimens for adrenal organotypic cultures. However the attempts to cryopreserve mice and newborn piglet adrenocortical cell suspensions, especially with high freeze-thawing rates, were unsuccessful. When transferring cells out of cryoprotective medium into that of isotonic culture there was a sharp decrease not only in viability but in cellularity of adrenocyte suspension, cryopreserved with freezing rate higher than 100°C/min as well. Based on the feedback from tolerance in adrenocytes, cryopreserved as fragments there was assumed that a limitation of volume changes in cells at the stages of cryoprotectant adding-removal and under freeze-thawing augmented the cryopreserved adrenal cell integrity.

The research was aimed to estimate the integrity of cytoplasmic membrane and mitochondrial potential of attached adrenocytes using fluorescent dyes (propidium iodide (PI), FDA and JC1) after freeze-thawing.

Newborn piglet adrenocytes were procured using an enzyme way, different cell populations were separated in ficoll gradient. For the research performance the adrenocytes were precultured for 18 hrs on an embedding: small intestine segment (SIS) of newborn piglets. Freeze-thawing was done using the method of Gurina, designed for organotypic cultures of newborn piglet adrenal glands. For the flow cytometry analysis the cells were removed from embedding by trypsinisation and PI, FDA and JC1 staining.

Percentage of necrotic cells, determined by PI inclusion did not statistically and significantly differ for native and cryopreserved adrenocytes. During FDV.N.A staining the integrity of cytoplasmic membrane of native and cryopreserved cells was established as not preserved. However when analysing the ratio of orange and green fluorescence during JC1 staining a different cryosensitivity of differentiated subpopulations of adrenocytes has been revealed. No statistically significant changes in mitochondrial activity after cryopreservation for non-separated adrenocyte suspension and main cell population, isolated in ficoll gradient with 1.0274 g/cm^3 were established. Significant cryosensitivity is typical for cells, localised in ficoll gradient with 1.044-1.058 g/cm^3. We believe that this effect may be related with preactivation of these subpopulations of adrenocytes during separated culturing, preceded cryopreservation.

Особенности криоустойчивости органотипических культур тканей надпочечников крыс в онтогенезе

Ю.Х. Румиех
Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Cryoresistance Peculiarities of Organotypic Cultures of Rat Adrenal Tissues in Ontogenesis

Yu.Kh. Rumiekh
V.N. Karazin Kharkiv National University

С возрастом измененяется гормональная активность тканей надпочечников, а утрата глюкокортикоидной функции надпочечников приводит к летальному исходу. При криоконсервировании культур тканей надпочечников погибает 15% клеток. Предположительно это более старые клетки, имеющие липидный состав мембран и являющиеся первичным звеном действия низких температур.

Цель работы – исследование криоустойчивости культур тканей надпочечников крыс разного возраста (1, 3, 6, 12 и 24 месяцев).

Эндокринные клетки в случае сохранения структурной целостности мембран могут секретировать в культурах гормоны при наличии экзогенных предшественников и потреблять их для синтеза. Показатель структурной целостности мембран – способность исключать трипановый синий. Жизнеспособность клеток культур при использовании данного красителя во всех возрастных группах после 1-х суток культивирования составляла 73-78%. Исследование функциональной характеристики культур (базальная секреция) показало, что профили кривых динамики секреции 11-ОКС культур всех возрастных групп совпадали. Однако у культур тканей старых животных уровень секреции был снижен на 17-20%. При введении стимулятора стероидогенеза (экстракта гипофиза) во всех культурах отмечалось повышение уровня секреции, которое зависело от возраста ткани: у 1-6-месячных животных прирост стимулированной секреции составлял 19-20%, а у 12 и 24-месячных – 9-11%. С возрастом уровень секреции изменяется за счет снижения синтетических процессов либо изменения рецепторных взаимодействий. Разный уровень секреции гормонов культурами тканей в онтогенезе соответствует ответу на действие стимулятора стероидогенеза, что обусловило целесообразность исследования их ответа на стресс при включении адаптационных механизмов. Для этих целей использовали метод двухэтапного замораживания культур: охлаждение до –80°С со скоростью 1°С/мин и последующее погружение в жидкий азот. После отогрева количество жизнеспособных клеток снижалось на 32-48%.

Криочувствительность тканей надпочечников обусловлена возрастом: у тканей молодых животных сохранялось 68-69% клеток, у старых – 52-56%. Следовательно, возрастные изменения в тканях надпочечников снижают адаптационные механизмы к действию повреждающих факторов среды, реализующихся в процессе низкотемпературного консервирования.

Hormonal activity of adrenal tissues changes with age and a loss of adrenal glucocorticoid function results in lethal outcome. During cryopreservation of adrenal tissue culture 15% of cells die. These are presumably the older cells with lipid membrane composition and being a primary link of low temperature effect.

This research was targeted to investigate the cryoresistance of adrenal tissue culture of different age rats (1, 3, 6, 12 and 24 months).

Endocrine cells with preserved membrane structural integrity may secrete hormones at the presence of exogenous precursors and consume them for synthesis. The index of membrane structural integrity is the capability of trypane blue exclusion. Culture cell viability when using this dye in all age groups after 1st day of culturing made 73-78%. Studying the functional characteristics of cultures (basal secretion) has demonstrated that the curve profiles of 11-OCS secretion dynamics of cultures coincide in all age groups. However in tissue cultures of old animals the secretion level was reduced by 17-20%. When introducing steroidogenesis stimulator (pituitary gland extract) in all cultures there was noted an increase in secretion level, which depended on tissue age: in 1-6 months' animals the growth of stimulated secretion made 19-20% and 9-11% for 12-24 months. With age the secretion level changes due to either a decrease in synthetic processes or change in receptor interactions. Different level of hormone secretion by tissue cultures in ontogenesis corresponds to the response on steroidogenesis stimulator effect, that stipulated the expediency to study their response to stress under adaptation mechanism triggering. For this purpose we used the method of two-stage freezing: cooling down to –80°C with 1°C/min rate with following immersion into liquid nitrogen. After thawing the number of viable cells reduced by 32-48%. Cryosensitivity of adrenal tissues is age-stipulated: 68-69% of cells were preserved in young animals and 52-56% in old ones. Consequently, age changes in adrenal tissues reduce adaptation mechanisms to the effect of medium damage factors, realizing in the process of low temperature preservation.

Особливості токсичної та мутагенної дії кріопротекторів на перещеплювані культури клітин

О.А. Лаврик
Інститут експериментальної клінічної ветеринарної медицини, м. Харків

Peculiarities of Toxic and Mutagenic Cryoprotective Effect on Re-inoculated Cell Cultures

O.A. Lavrik
Institute of Experimental Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

Більшість кріопротекторів – токсичні для біологічних об'єктів, в тому числі й для перещеплюваних культур клітин, але їх мутагенний вплив на культури клітин мало вивчений і потребує додаткових досліджень.

На моделі перещеплюваних клітин РК-15-IECVM (клітини нирки свині) та ВНК-21 clone 13/04 (клітини нирки сірійського хом'ячка) було вивчено вплив на їх збереження, адгезивні та цитогенетичні порушення наступних кріопротекторів: диметилсульфоксиду (ДМСО), оксиетильованого гліцерину (ОЕГ) зі ступенем полімеризації 5, 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), ацетилетаноламіну, оксиетильованого N-ацетилетаноламіну, ПЕГ-400, диметилацетаміду та ПЕО-1500, які додавались до кріозахисних середовищ у концентрації 10%. Суспензія культур клітин у кріозахисному середовищі була розфасована в скляні ампули з концентрацією 10-12 млн/см^3 та законсервована в рідкому азоті.

Після зберігання біомаси клітин у рідкому азоті 30 діб порушення адгезивних властивостей клітин були більш виражені при використанні кріопротекторів ОЕГ, ПЕГ-400 та диметилацетаміду (близько 15% клітин втрачали адгезивну здатність, а при застосуванні ДМСО – 5%).

Аналіз мітотичного режиму клітин РК-15-IECVM показав значне пригнічення проліферативних властивостей клітин (більш ніж у 2 рази в порівнянні з показниками до кріоконсервування) після їх заморожування з використанням більшості кріопротекторів, окрім ДМСО та ПЕО-1500. Клітини, що були заморожені з більшістю кріопротекторів, після відтавання мали знижену мітотичну активність, але після 2-х пасажів їх проліферативні властивості нормалізувались до рівня перед кріоконсервуванням. При використанні 1,2-ПД та диметилацетаміду нормалізації не спостерігалося. Мітотична активність клітин, заморожених у середовищі з ДМСО, після деконсервування практично не змінювалась. У той же час кількість патологічних мітозів у клітин, кріоконсервованих у присутності ДМСО, на нульовому пасажі на 10-20% перевищувала аналогічний показник у клітин, які заморожувались з іншими кріопротекторами, що свідчить про мутагенні властивості цього кріопротектора.

За хромосомним аналізом клітин після заморожування-відтавання не встановлено достовірних розбіжностей щодо їх показників у клітин на нульовому пасажі, але розмах мінливості кількості хромосом у більшості кріопротекторів, окрім ДМСО, збільшився в бік гіподиплоїдії.

Отримані результати потребують проведення дослідів щодо пошуку оптимального складу кріозахисних середовищ для перещеплюваних культур клітин, які на фоні високих кріозахисних властивостей не будуть мати мутагенний вплив на хромосомний апарат цих клітин.

The majority of cryoprotectants are toxic for biological objects, including re-inoculated cell cultures, but their mutagenic effect on cell cultures is poorly studied and needs to be additionally investigated.

In the model of re-inoculated PK-15-IECVM cells (pig kidney cells) and BHK-21 clone 13/04 (Syrian hamster kidney cells) we have studied the effect on their integrity, adhesive and cytogenic disorders of following cryoprotectants: dimethyl sulfoxide (DMSO), oxyethylated glycerol (OEG) with 5 polymerisation grade, 1,2-propanediol (PD), acetyl ethanolamine, oxyethylated N-acetyl ethanolamine, PEG-400, dimethyl acetamide and PEO-1500, added into cryoprotective media in 10% concentration. Cell culture suspension in a cryoprotective medium was packed into glass vials with 10-12 mln/cm^3 concentration and preserved into liquid nitrogen.

Following 30 days after cell biomass storage in liquid nitrogen the disorders in cell adhesive properties were mostly manifested when using OEG, PEG-400 and dimethyl acetamide cryoprotectants (near 15% cells lost their adhesive ability versus 5% for DMSO).

Analysis of PK-15-IECVM cell mitotic regimen has demonstrated a significant suppression of cell proliferative properties (more than twice compared to the indices prior to cryopreservation) and after their freezing when the majority of cryoprotectants except DMSO and PEO-1500) was used. Cells frozen with the majority of cryoprotectants after thawing had a decreased mitotic activity but after 3 passages their proliferative properties normalised up to the level prior to cryopreservation. When using 1,2-PD and dimethyl acetamide no normalisation was observed. Mitotic activity of cells, frozen in the media with DMSO after freeze-thawing was practically unchanged. At the same time the number of pathological mitosis in cells, cryopreserved in DMSO presence at 0 passage exceeded by 10-20% the same index in cells, frozen with other cryoprotectants that testified to mutagenic properties of this cryoprotectant.

When using chromosome cell analysis after freeze-thawing no statistically significant differences as for their indices in cells at 0 passage were established but the variation range of chromosome number in the majority of cryoprotectants, except DMSO augmented towards hypoploidy.

The results obtained require the further investigations, directed to search for an optimal composition of cryoprotective media for re-inoculated cell cultures, that will not have a mutagenic effect on chromosome apparatus of these cells at the background of high cryoprotective properties.

Влияние условий криоконсервирования на сохранность фибробластов человека

Л.Г. Абрафикова
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation Protocols on Integrity of Human Fibroblasts

L.G. Abrafikova
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Клетки соединительной ткани (фибробласты) в настоящее время широко используются в различных областях медицины при многих патологиях.

Криоконсервирование – обязательный этап технологии получения фибробластов для дальнейшего клинического применения. Безальтернативным способом длительного хранения фибробластов является хранение при температуре жидкого азота.

Цель работы – изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующей среды на сохранность фибробластов человека.

Объектом исследования были фибробласты человека, полученные путем культивирования кожных биоптатов в питательной среде 199 с добавлением эмбриональной сыворотки. Образцы замораживали по двум режимам охлаждения: со скоростью 1°С/мин до –30°С с последующим погружением в жидкий азот; со скоростью 1°С/мин до –70°С с последующим погружением в жидкий азот.

Установлено, что на сохранность фибробластов при криоконсервировании и дальнейшем хранении при температуре –196°С с выбранными режимами охлаждения достоверное влияние оказывает присутствие криопротектора в среде криоконсервирования. Сохранность клеток, суспендированных в ростовой среде 199 без добавления криопротектора, замороженных по первому режиму, составила 7,3, а по второму – 9,1%.

При замораживании сохранность клеток, суспендированных в среде 199 с добавлением 10%-го ДМСО (по объему), составляла при первом режиме охлаждения 73,1, при втором – 78,1%.

Показатели по повышенной сохранности клеток, замороженных с и без ДМСО, коррелировали с результатами изучения конформационного состояния мембранных белков клеток после замораживания-отогрева методом дифференцирующей спектрофотометрии в УФ-области.

Cells of connective tissue (fibroblasts) now are widely used in different fields of medicine under various pathologies.

Cryopreservation is a mandatory technological stage for further clinical application. Storage at liquid nitrogen temperature is the way having no alternative for long-term storage of fibroblasts.

The research aim is to study the effect of cooling regimens and composition of preserving medium on the integrity of human fibroblasts.

Human fibroblasts obtained by culturing skin bioptates in nutritive medium 199 with adding embryonic serum served as research object. The samples were frozen according to two cooling regimens: with the rate of 1°C/min down to –30°C with following plunging into liquid nitrogen; with the rate of 1°C/min down to –70°C with following plunging into liquid nitrogen.

It has been found out that statistical effect on fibroblast integrity during cryopreservation and further storage at –196°C with chosen cooling regimens was caused by the presence of cryoprotectant in cryopreservation medium. Integrity of cells suspended in growth medium with no adding of cryoprotectant frozen according to the first regimen made 7.3 and 9.1% on the second one.

During freezing the integrity of cells suspended in medium 199 with adding 10% DMSO (v/v) made at first cooling regimen 73.1 and 78.1% at the second one.

Indices of increased integrity of the cells frozen with and with no DMSO were in correlation with the results of studying the conformational state of membrane proteins of cells after freeze-thawing by differentiating spectrophotometry in UV-region.

Изучение возможностей хранения бактерий *Streptococcus pneumoniae* при положительных и умеренно низких температурах

М.Н. Калашникова
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Storage Possibilities for *Streptococcus Pneumoniae* Bacteria Under Positive and Moderately Low Temperatures

M.N. Kalashnikova
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Одной из актуальных проблем медицинской микробиологии является создание коллекций клинических изолятов бактерий *Streptococcus pneumoniae* из различных географических зон. Эта коллекция необходима для современных диагностикумов и поливалентных вакцин, разработки схем рациональной этиотропной терапии. Выделение, идентификация изолятов, транспортировка их из медицинских учреждений в коллекции микроорганизмов осложняются тем, что пневмококки быстро погибают во внешней среде вследствие аутолиза, вызванного высокой активностью внутриклеточных ферментов. Публикации по криоконсервированию пневмококков отсутствуют, а работы, посвященные хранению этих бактерий при умеренно низких температурах, единичны и фрагментарны.

Цель исследования – изучение возможностей хранения бактерий *S. pneumoniae* при субнулевых и умеренно низких температурах.

Объектами исследования служили клинические изоляты бактерий *S. pneumoniae,* которые хранили в мясопептонном бульоне (МПБ), с добавлением 10% одного из защитных веществ: эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (КРС), сахарозы, глицерина. Образцы хранили при 37° (контроль), 4, –25, –70°С. Жизнеспособность определяли чашечным методом Коха по колониеобразованию на кровяном агаре.

Показано, что при 37°С бактерии *S. pneumoniae*, суспендированные в МПБ с добавлением сахарозы, глицерина, эмбриональной сыворотки КРС и в чистом МПБ, погибали соответственно через 2, 3, 4 и 4 суток. В процессе хранения при 4°С бактерии сохраняли жизнеспособность в МПБ 46 суток, в МПБ с добавлением эмбриональной сыворотки КРС – в течение 60 суток (срок наблюдения), МПБ с добавлением сахарозы – 25 суток и в МПБ с добавлением глицерина – 40 суток. При –25°С бактерии оставались жизнеспособными не менее 2-х месяцев (срок наблюдения) во всех средах, а при –70°С – не менее одного года (срок наблюдения).

Представленные результаты свидетельствуют о возможности хранения *S. pneumoniae* при положительных и умеренно низких температурах и могут быть использованы в работе клинических лабораторий.

Creating collections of clinical isolates of *Streptococcus Pneumoniae* bacteria from various geographic areas is one of the actual problems in medical microbiology. These collections are necessary for current diagnostiocums and polyvalent vaccines, to elaborate protocols for rational etiotropic therapy. Isolation and identification of isolates, their transporting from medical institutions to the microorganism collections is complicated because of a rapid death of pneumococci in the environment due to autolysis, caused by a high activity of intracellular enzymes. There are no published reports on pneumococci cryopreservation and the research devoted to these bacteria storage under moderately low temperatures are single and fragmentary.

This research was targeted to study the possibilities for *S. pneumoniae* bacteria storage under subzero and moderately low temperatures.

Clinical isolates of *S. pneumoniae* bacteria, stored into meat-peptone broth (MPB) with adding 10% of one of protective substances such as: calf embryonic serum, sucrose, glycerol served as the investigation object. Samples were stored at 37 (control), 4, –25, –70°C. The viability was determined using the Koch dish method by colony-formation on blood agar.

At 37°C *S. pneumoniae* bacteria, suspended in MPB with sucrose, glycerol, cattle embryonic serum and in pure MPB were shown to die in 2, 3, 4, and 4 days, correspondingly. During storage at 4°C bacteria preserved the viability in MPB within 46 days, in MPB with cattle embryonic serum within 60 days (observation term), in MPB with sucrose for 25 days and 40 days in MPB with glycerol. At –25°C bacteria remained viable not less than 2 months (observation term) in all media, but not longer than 1 year (observation term) at –70°C.

The results presented testify to the possibility of *S. pneumoniae* storage under positive and moderately low temperatures and may be used in clinical laboratories.

Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) криогемолизата крови крупного рогатого скота на содержание оксипролина в коже крыс после ожога

Е.Г. Иванов[1], Н.Н. Моисеева[2], А.В. Трифонова[2]

[1]Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Effect of Low Molecular Fraction (1-5 kDa) of Cattle Blood Cryohemolysate on Hydroxy-Proline Content in Rat's Skin After Burn

E.G. Ivanov[1], N.N. Moiseyeva[2], A.V. Trifonova[2]

[1]V.N. Karazin Kharkiv National University

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

Регенерация кожи после ожога во многом определяется синтезом коллагена. Содержание оксипролина отражает уровень биосинтеза коллагена. Известно, что в низкомолекулярной фракции крови молочных телят содержатся компоненты, способствующие регенерации кожи после ожогов. На основе этой фракции фирмы Solco и Nicomed изготавливают препараты Актовегин и Солкосерил. Особенности выделения субстанции – ноу-хау указанных фирм.

Цель работы – выделение низкомолекулярной фракции из крови телят и изучение ее ранозаживляющей активности в сравнительном аспекте с Актовегином, фракцией, полученной из крови коров, и введением физиологического раствора. Биологическую активность фракций оценивали по динамике содержания оксипролина в ожоговой ране животных. В норме концентрация оксипролина в коже крыс составляет 7,5±0,2 мкг/л. К исходу 3-х суток после инъекции физиологического раствора содержание оксипролина в регенерате кожи экспериментальных крыс составляло 2,7±0,06 мкг/л, более высокая концентрация данного показателя наблюдалась после введения фракции из крови коров 4,1±0,01 мкг/л. Содержание оксипролина в регенерате кожи после инъекции фракции из крови телят и Актовегина повышалось до 4,4±0,08 и 5,1±0,14 мкг/л соответственно. На 14-е сутки концентрация оксипролина в коже возрастала во всех экспериментальных группах, однако нормализация данного показателя была отмечена только после введения Актовегина (7,3±0,1 мкг/л) и фракции из крови телят (6,9±0,09 мкг/л). Содержание оксипролина в регенерате кожи контрольных животных в данный период времени составляло 4,6 ±0,2 мкг/л, а введение фракции из крови коров способствовало повышению данного показателя до 6,4 ±0,09 мкг/л.

Таким образом, введение низкомолекулярной фракции из крови коров и особенно телят оказало положительное воздействие на биосинтез оксипролина в регенерате кожи экспериментальных животных. Полученные данные подтверждают эффективность разработанного в отделе биохимии холодовой адаптации ИПКиК НАН Украины метода выделения низкомолекулярной фракции из крови крупного рогатого скота.

Skin regeneration after burn is mostly determined by collagen synthesis. Hydroxy-proline content reflects the collagen biosynthesis level. Low molecular fraction of veal calf blood is known to comprise the components, contributing to skin regeneration after burns. The Solco and Nicomed Companies produce Actovegin and Solcoseryl preparations, based on this fraction. The substance isolation peculiarities are the know-how of the mentioned companies.

The research was aimed to isolate the low molecular fractions from calf blood and study its wound-healing activity compared with Actovegin, cow blood-procured fraction and physiological solution introduction. Fraction biological activity was estimated by hydroxyproline content dynamics in animal burn wound. Hydroxyproline concentration in rat's skin makes 7.5±0.2 μg/l in the norm. To the end of 3 days after physiological solution injection the hydroxyproline content in skin regenerate of experimental rats made 2.7±0.06 μg/l, this index higher concentration was observed after introducing cow blood fraction 4.1±0.01 μg/l. Hydroxyproline content in skin regenerate after calf blood fraction and actovegin injections increased up to 4.4±0.08 and 5.1±0.14 μg/l, correspondingly. To the 14th day the hydroxyproline concentration in skin increased in all experimental groups but this index normalisation was observed only after Actovegin (7.3±0.1 μg/l) and calf blood fraction (6.9±0.09 μg/l) introduction. Hydroxyproline content in skin regenerate of control animals within this time period made 4.6±0.2 μg/l, but the cow blood fraction introduction contributed to this index augmentation up to 6.4±0.09 μg/l.

Thus, the low molecular fraction introduction of cow and, especially, calf blood positively affected the hydroxyproline biosynthesis in skin regenerate of experimental animals. The data obtained confirm the efficiency of the method for low molecular fraction isolation from cattle blood, designed at the Department of Biochemistry of Cold Adaptation at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові та тканині печінки при експериментальному гіпотиреозі

В.І. Чуйкова
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Content of Thyroid Hormones in Blood Serum and Liver Tissue at Experimental Hypothyrosis

V.I. Chujkova
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Численні експериментальні та клінічні дослідження показали, що лікування гіпотиреозу введенням алогенного або ксеногенного фрагмента фетальної тканини більш ефективне, ніж традиційні медикаментозні методи, оскільки останні не викликають непереносимості та звикання.

Мета роботи – вивчити вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові та тканині печінки експериментальних тварин при введенні фрагмента ксеногенної фетальної щитовидної залози (ЩЗ) та в комбінації з алогенною плацентою (Пл) на фоні введення препарата "Мерказоліл" (МК).

Гіпотиреоз моделювали введенням 0,05%-го розчину препарата „Мерказоліл" в питній воді протягом 2-х місяців. На фоні прийому тиреостатика в підшкірний карман під легким ефірним наркозом вводили фрагмент ксеногенної фетальної щитовидної залози людини окремо та в комбінації з алогенною плацентою. На 3-ю добу після введення біологічного матеріалу проводили декапітацію тварин під легким ефірним наркозом. Отримані дані наведені в таблиці.

Отримані дані свідчать про те, що на фоні введення „Мерказолілу" функціональна активність щитовидної залози зменшилась майже у 5 разів, проте недостатність T_4 викликала адаптивне підвищення активності ферментів периферичного дейодування, що виражається в збільшенні концентрації вільного T_3 у сироватці крові. Введення фрагменту щитовидної залози супроводжується підвищенням рівня загального T_4 у сироватці, але найбільш це виражено при комбінованому введенні разом із плацентою. Застосування біологічного матеріалу в обох випадках не супроводжувалось зміною вмісту вільного T_3 у сироватці та тиреоїдних гормонів у печінці.

Numerous experimental and clinical researches have demonstrated that hypothyrosis treatment with introducing either allogenic or xenogenic fragments of fetal tissue is more efficient than the traditional medicamental methods, since they do not cause the intolerance and habituation.

The research aim was to study the content of thyroid hormones in blood serum and liver tissue of experimental animals when introducing the fragment of xenogenous fetal thyroid gland (TG) and combining with allogenic placenta (Pl) at the background of "Merkazolil" (MK) introduction.

Hypothyrosis was modelled by introducing 0.05% "Merkazolil" solution in potable water within 2 months. At the background of thyreostatic uptake the fragment of human xenogenic fetal thyroid gland was placed into a subcutaneous pocket under light ether narcosis separately and together with allogenic placenta. To the 3rd day after biological material introduction the animals were decapitated under light ether narcosis. The data obtained are presented in the Table.

The data obtained testify to the fact, that at the background of "Merkazolil" introduction the functional activity of thyroid gland reduced even in 5 times, but T_4 lack caused an adaptive increase in enzyme activity of peripheral deiodination, that was manifested in free T_3 concentration increase in blood serum. Introduction of thyroid gland fragment is accompanied with an increase in general T_4 level in serum, but it is mostly manifested during combined introduction with placenta. Biological material application in both cases is not accompanied by a change in free T_3 content in serum and thyroid hormones in liver.

Вміст тиреоїдних гормонів в сироватці крові та тканині печінки експериментальних тварин

Content of thyroid hormones in blood serum and liver tissue of experimental animals

Показники Indices	Інтактні Intact	МК MK	ЩЗ TG	ЩЗ + Пл TG + Pl
Сироватка крові Blood serum				
T_4 загальний,нмоль/л T_3 total, nmol/l	75,0±5,3	16,7±4,4*	29,7±0,9*	34,6±10,0
T_3 вільний, пмоль/л T_3 free, pmol/l	9,25±1,00	20,2±3,6*	17,00±0,44*	17,00±0,05
Печінка Liver				
T_4 загальний, пмоль/г тканини T_4 total, fmol/g of tissue	170±16	119±17*	100±8*	105±5,5*
T_3 вільний,фмоль/г тканини T_3 free, fmol/g of tissue	422±15	462±1,8*	456±2*	455±6*

* – розходження достовірні, цифрою позначені групи тварин, відносно яких розходження достовірні.
*– differences are statistically significant, the numbered groups of animals in respect to which the differences are statistically significant.

Влияние острого общего охлаждения на внутричерепное давление в процессе самоотогрева у крыс

О.В. Вязовская, Ю.С. Лысак, В.К. Мазалов
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Acute General Cooling on Intracranial Pressure During Self-Warming in Rats

O.V. Vyazovskaya, Yu.S. Lysak, V.K. Mazalov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Температурную зависимость внутричерепного давления (ВЧД) изучали на белых беспородных крысах-самцах массой 190-210 г после охлаждения погружением в водяную баню с температурой 5,5°С на 2 мин (группа А), 0,5°С на 2 мин (группа В) и 0,5°С на 6 мин (группа С). После охлаждения животных помещали в нормальные физиологические условия. Внутричерепное давление измеряли методом дурэтензиометрии (мм рт. ст.) до охлаждения (контроль) и через 5, 10, 20, 30 мин и 1; 1,3; 2; 3; 4; 5 ч после охлаждения в процессе самоотогрева.

Анализ динамики ВЧД в постхолодовой период показал, что через 5 мин самоотогрева у крыс групп А и В показатели ВЧД составляли 7,38±0,03 и 9,3±0,01 соответственно. Увеличение времени пребывания крыс группы С в водяной бане до 6 минут приводило к более высоким значениям ВЧД (10,56±0,03). К 10-й минуте отогрева наблюдалось достоверное снижение ВЧД во всех исследуемых состояниях до 1,58±0,007, 2,08±0,03 и 8,68±0,15 соответственно. К 20-й минуте ВЧД во всех исследованных группах увеличивалось до 6,86±0,06, 2,67±0,02, 12,17±0,21 и на 30-й минуте наблюдался верхний пик значений (8,28±0,086, 8,7±0,03, 12,41±0,21), после чего они уменьшались. На 60-ю минуту самоотогрева у крыс групп А и В ВЧД снижалось практически до исходных значений (1,84±0,02, 2,2±0,01 соответственно), тогда как у крыс группы С значения ВЧД оставались значительно выше контрольных (11,32 ± 0,51). После 1,3-2 ч самоотогрева наблюдалось стойкое увеличение ВЧД во всех исследуемых состояниях. Вследствие наибольшего охлаждения все животные группы С погибли: 28,6% крыс через час самоотогрева, остальные – после 2-х часов.

Полученные данные могут быть использованы для поиска оптимального способа коррекции последствий холодовой травмы гомойотермных организмов.

Temperature dependence of intracranial pressure (ICP) was studied in 190-210 g' white breedless male rats after cooling by immersion into 5.5°C water bath for 2 min (A group), 0.5°C for 2 min (B group) and 0.5°C for 6 min (C group). After cooling animals were placed under normal physiological conditions. An intracranial pressure was measured with duretensiometry (mm of mercury) prior to cooling (control) and in 5, 10, 20, 30 min and in 1, 1.3, 2, 3, 4, 5 hrs after cooling during self-warming.

Analysis of ICP dynamics in a post-cold period demonstrated that 5 min after self-warming in rats of A and B groups the ICP indices made 7.38±0.03 and 9.3±0.01, correspondingly. Increase in maintaining period for rats of C group in water bath up to 6 min resulted in higher ICP values (10.56±0.03). To the 10th min of warming a statistically significant ICP decrease in all studied states down to 1.58±0.007, 2.08±0.03 and 8.68±0.15, correspondingly was observed. To the 20th min the ICP in all studied groups increased up to 6.86±0.06, 2.67±0.02, 12.17±0.21 and to the 30th min there was observed a higher peak of values (8.28±0.086, 8.7±0.03, 12.41±0.21) afterwards they reduced. To the 60th min of self-warming in rats of A and B groups the ICP decreased practically down to the initial values (1.84±0.02, 2.2±0.01, correspondingly), meanwhile in C group the ICP values remained significantly higher than the control (11.32±0.51). After 1.3-2 hrs of self-warming a stable ICP increase in all studied states was observed. Due to the maximum cooling all animals of C group died: 28.6% of rats in 1 hr after self-warming and after 2 hrs for the rest.

The data obtained may be used to search for an optimal way for correcting the cold trauma consequences in homoiothermal organisms.

Сравнительное изучение чувствительности предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к действию различных стрессовых факторов

Д.И. Александрова

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Comparative Study of Sensitivity of Preliminarily Dehydrated Human and Bovine Erythrocytes to the Effect of Different Stress Factors

D.I. Alexandrova

V.N. Karazin Kharkiv National University

В процессе замораживания эритроцитов повреждающее действие на клетки оказывают высокие концентрации солей, образующиеся при вымораживании свободной воды. Установлено, что предварительная инкубация эритроцитов человека в умеренно гипертонических растворах электролитов повышает устойчивость клеток к гипертоническому шоку.

Цель работы – исследовать чувствительность предварительно обезвоженных эритроцитов человека и быка к гипертоническому шоку (4,0 М NaCl), механическому стрессу и детергентному лизису.

Предварительно эритроциты человека и быка инкубировали в средах, содержащих 0,15-2,4 М NaCl, после чего их переносили в 4,0 М NaCl. Денатурацию спектрина осуществляли инкубированием эритроцитов при 49°С в течение 10 мин. Для детергентного лизиса использовали тритон Х-100 (0,0015%), додецилсульфат натрия (0,003%). Эритроциты подвергали механическому стрессу 10-кратным продавливанием клеточной суспензии через иглу диаметром 0,3 мм. Изменения объема эритроцитов человека и быка в средах предварительной инкубации контролировали измерением гематокрита.

Предварительная инкубация эритроцитов человека и быка в средах умеренной тоничности сопровождается снижением чувствительности этих клеток к гипертоническому шоку в 4,0 М NaCl. Максимальная устойчивость к 4,0 М NaCl наблюдается для эритроцитов человека, перенесенных из 0,4 М NaCl, для клеток быка – из 1,0 М NaCl. В этих условиях механический стресс индуцирует снижение максимальной устойчивости эритроцитов обоих видов (на 10-15 %), а предварительная инкубация клеток при 49°С уменьшает устойчивость эритроцитов человека в отличие от клеток быка. С ростом концентрации соли в среде наблюдаются увеличение количества эхиноцитов и повышение степени кренирования эритроцитов быка и человека. Если тритон Х-100 увеличивает гемолиз частично обезвоженных эритроцитов человека и быка, то додецилсульфат натрия – снижает. В обоих случаях эритроциты быка характеризуются большей устойчивостью к детергентному лизису. В солевых средах, обеспечивающих максимальную устойчивость эритроцитов человека и быка к переносу в 4,0 М NaCl, отмечается максимальное уменьшение объема эритроцитов человека на 25%, быка – на 40%. Выявленные отличия в реакции клеток человека и быка на действие стрессовых факторов могут быть обусловлены особенностями как внутриклеточного состава эритроцитов, так и их плазматических мембран.

During erythrocyte freezing a damaging effect on cells is caused by high concentrations of salts, formed under free water freezing-out. Preliminary incubation of human erythrocytes in moderately hypertonic electrolyte solutions was established to increase a cell resistance to hypertonic stress.

Research was aimed to study the sensitivity of preliminarily dehydrated human and bovine erythrocytes to hypertonic shock (4.0 M NaCl), mechanical stress and detergent lysis.

Human and bovine erythrocytes were preliminarily incubated in 0.15-2.4 M NaCl-containing media with following transfer into 4.0 M NaCl. Spectrin denaturation was realised by erythrocyte incubation at 49°C for 10 min. Triton X-100 (0.0015%), sodium dodecyl sulfate (0.003%) were used for detergent lysis. Erythrocytes were mechanically stressed by a 10-fold cell suspension passing through a needle with 0.3 mm diameter. Changes in human and bovine erythrocyte volume in the media of preliminary incubation were controlled by hematocrit measuring.

Preliminary incubation of human and bovine erythrocytes in the media with moderate tonicity is accompanied with a decrease in these cells sensitivity to hypertonic shock in 4.0 M NaCl. Maximum resistance to 4.0 M NaCl is observed in human erythrocytes, removed from 0.4 M NaCl and from 1.0 M NaCl for bovine cells. Under these conditions a mechanical stress induces a decrease in maximum erythrocyte resistance of both species (by 10-15%), but a preliminary cell incubation at 49°C reduces human erythrocyte resistance in contrast to bovine cells. With salt growth in the medium there are observed an increase in the amount of echinocytes and the extent increase of bovine and human erythrocyte crenation. If triton X-100 increases hemolysis of partially dehydrated human and bovine erythrocytes, sodium dodecyl sulfate decreases it. In both cases bovine erythrocytes are characterised with higher resistance to detergent lysis. In saline media, providing a maximum resistance of human and bovine erythrocytes to the transfer into 4.0 M NaCl there is observed a maximum decrease in human and bovine erythrocyte volume by 25 and 40%, correspondingly. The revealed differences in human and bovine cell response to the effect of stress factors may be stipulated by the peculiarities of both intracellular erythrocyte composition and their plasmatic membranes.

Периартериальная денервация и локальная криодеструкция печени при экспериментальном циррозе

Н.А. Чиж
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Liver Periarterial Denervation and Local Cryodestruction at Experimental Cirrhosis

N.A. Chizh
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Хронические диффузные заболевания печени занимают одно из ведущих мест в патологии гепатобилиарного тракта. Существующие методы лечения не всегда эффективны, поэтому создание новых методов лечения, в том числе хирургических, актуально.

Цель работы – исследование влияния сочетанного использования криоденервации печеночной артерии и локальной криодеструкции печени на регенераторные процессы при циррозе печени.

Работа выполнена с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985). Цирроз печени моделировали с помощью 40%-го масляного раствора CCl_4 на протяжении 2-х месяцев. Животные были разделены на 4 группы (по 10): I – контроль, животные с нелеченым токсическим циррозом печени (К); II– животные с локальной криодеструкцией печени (КП); III – с криоденервацией печеночной артерии (КДПА); IV – сочетанное воздействие КДПА + КП. Группу нормы составили 7 животных. Срок наблюдения после операций – 8 недель.

Состояние печени оценивали биохимическими и гистологическими методами. Исследовали активность АлАТ, щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрацию билирубина. Для характеристики морфологии печени использовали полуколичественную балльную оценку признаков развития и регрессии патологических нарушений, вызванных CCl_4.

В группах с использованием криохирургических методов лечения нормализация активности АлАТ и ЩФ происходит в более ранние сроки по сравнению с контрольной группой.

После криоденервации имеют место выраженное снижение деструктивных проявлений, повышение общего количества клеток с признаками регенераторной гипертрофии и гепатоцитов с нормальной организацией.

Криовоздействие, оказывая восстановительное действие на структуру печени после хронической интоксикации, в большей степени стимулирует репаративные процессы. При этом признаки деструкции остаются более выраженными, чем после денервации.

Сочетанное использование криоденервации и криодеструкции печени оказывает более благоприятное воздействие на течение восстановительного периода, связанное с суммарным действием положительных эффектов (большей стимуляцией репаративных процессов и менее выраженными деструктивными проявлениями).

Liver chronic diffusive diseases take one of the leading places among hepatobiliary tract pathologies. Current treatment methods are not always efficient therefore designing new treatment methods, including surgical ones is still actual.

Th research was aimed to study the effect of combined usage of liver artery denervation and local liver cryodestruction on regenerative processes at liver cirrhosis.

Research is accomplished by meeting international principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985). Liver cirrhosis was modelled using 40% oil CCl_4 solution within 2 months. Animals were divided into 4 groups (by 10 in each): I – the control animals with untreated toxic liver cirrhosis (C); II – animals with local liver cryodestruction (LC), III – those with liver artery cryodenervation (LACD); IV – combined effect of LACD+LC. The norm group consisted of 7 animals. Observation time after operation made 8 weeks.

Liver state was biochemically and histologically estimated. There were studied the ALT, alkaline phosphotase (AP) activities and bilirubin concentration. A semiquantitative score of progress and regress signs for CCl_4-caused pathological disorders was used for liver morphology characteristics.

In groups where we used cryosurgical treatments the normalisation of ALT and AP activities occurred in earlier terms than in the control group.

A manifested decrease in destructive signs, an increased total amount of cells with signs of regenerative hypertrophy and hepatocytes with normal organization occur after cryopreservation.

Cryoeffect by causing a reparative effect on liver structure after chronic intoxication mostly stimulates the reparative processes. At the same time the destruction signs remain more manifested than after denervation.

Combined usage of liver cryodenervation and cryodestruction affects more favorably the recovery period course, related to the total action of positive effects (high stimulation of reparative processes and less manifested destructive signs).