

## Перспективы применения трансплантации криоконсервированной ткани эндокринных желез для коррекции гормональной недостаточности

Т.П. БОНДАРЕНКО, Г.А. БОЖОК, Е.И. ЛЕГАЧ

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

## Prospects of Transplantation of Cryopreserved Endocrine Gland Tissue for Correction of Hormonal Deficiency

T.P. BONDARENKO, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH

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

В настоящее время основным способом сохранения фертильности людей препубертатного возраста, которые должны подвергнуться противоопухолевой терапии, является криоконсервирование тестикулярной или овариальной ткани. Также в последние десятилетия возросла роль интраоперационной гетеротопической ауотрансплантации щитовидной и паращитовидной желез в терапии постоперационных гипотиреоза и гипокальцемии. Хроническая надпочечниковая недостаточность может быть компенсирована при трансплантации гормонально-активных клеток адренокортекса. Трансплантация криоконсервированной ткани эндокринных желез является современным методом коррекции гормональной недостаточности, который становится все более востребованным в комплексном лечении заболеваний эндокринной системы и сопутствующих патологий.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины на протяжении многих лет проводятся исследования, посвященные клинической и экспериментальной трансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы, надпочечников, тестикулярной и овариальной ткани. Были разработаны способы криоконсервирования ткани, органотипических и клеточных культур эндокринных желез, а также изучены их гормонопродуцирующий потенциал *in vitro* и эффективность при коррекции гормональной недостаточности методом ауто-, алло- и ксенотрансплантации.

Анализ параметров активации и ингибирования секреторной функции вышеперечисленных эндокринных желез при культивировании и криоконсервировании позволил разработать оптимальные условия получения биоматериала для трансплантации, что, в конечном итоге, позволило улучшить «качество» трансплантата и продлить срок его выживаемости в организме реципиента. На основе проведенной оценки результатов экспериментальной трансплантации доказано, что трансплантация позитивно влияет на гормональный статус реципиента, так как трансплантированная ткань эндокринных желез, кроме синтеза и секреции соответствующих гормонов, способна продуцировать биологически активные медиаторы в основном пептидной природы, которые выполняют функции как паракринных, так и аутокринных физиологических регуляторов.

Currently the main method for fertility preservation of prepubertal people who have to undergo cancer therapy is the cryopreservation of testicular or ovarian tissue. Also in the last decades the role of intraoperative heterotopic autotransplantation of thyroid and parathyroid glands in the therapy of postoperative hypothyroidism and hypocalcemia has increased. Chronic adrenal insufficiency can be compensated during transplantation of adrenocortex hormonally active cells. Transplantation of endocrine glands cryopreserved tissue is a modern method for correction of hormone deficiency which becomes more popular in complex treatment of endocrine system diseases and related pathologies.

Researches devoted to clinical and experimental transplantation of cryopreserved thyroid glands, adrenal, ovarian and testicular tissue have been carried-out at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine for many years. The methods for cryopreservation of tissue, organotypic and cell cultures of endocrine glands have been developed, and their hormone producing potential *in vitro* and efficiency of correcting hormonal deficiency by auto-, allo- and xenotransplantation have been studied.

Analysis of activation and inhibition parameters of endocrine gland secretory function during culturing and cryopreservation allowed to develop optimal conditions for obtaining biological material for transplantation that finally allowed to improve the 'quality' of graft and prolong its survival term in a recipient's organism. On the base of the performed assessment of results on experimental transplantation we have demonstrated that transplantation positively affects the recipient's hormonal status. This occurs due to transplanted tissue of endocrine glands, except the synthesis and secretion of corresponding hormones, is capable to produce biologically active mediators mainly of peptide nature which function as paracrine and autocrine physiological regulators.

## Обоснование применения препаратов криоконсервированной плаценты для коррекции почечной недостаточности

И.И. КОНДАКОВ, Т.Н. ЮРЧЕНКО, Л.Н. МАРЧЕНКО, Т.П. ГОВОРУХА,

Т.М. ШАРЛАЙ, Е.П. ЖУЛИКОВА, В.И. СТРОНА

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

## Substantiation for Application of Cryopreserved Placental Preparations for Correction of Nephritic Insufficiency

I.I. KONDAKOV, T.N. YURCHENKO, L.N. MARCHENKO, T.P. GOVORUKHA,

T.M. SHARLAY, E.P. ZHULIKOVA, V.I. STRONA

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

Целью исследования явилась разработка способа коррекции нарушения функции почек препаратами криоконсервированной плаценты.

Исследовали состояние почек и внутренних органов у крыс с глицериновой моделью почечной недостаточности. Эксперимент проводили на 50 половозрелых крысах-самцах линии Вистар при однократном введении 50% раствора глицерина в дозе 1 мл/100 г. В сыворотке крови и суточной моче определяли уровень креатинина. На гистологических препаратах почек, окрашенных гематоксилином и эозином, измеряли площадь клубочков, размеры капсулы Шумлянського, площадь петель гломерулярных капилляров, диаметр почечных канальцев.

В ходе эксперимента было установлено, что через неделю после введения глицерина возникала острая почечная недостаточность, которая характеризовалась анурией, гиперкреатинемией (до 230 мкмоль/л при норме 30 мкмоль/л). В почках наблюдались гидропическая дистрофия и некроз эпителия канальцев. Слущенный эпителий обтурировал собирательные трубочки, что приводило к растяжению капсулы Шумлянського, уменьшению площади сосудистых петель клубочка, увеличению диаметра проксимальных и дистальных канальцев, а также отеку интерстиция. Дистрофические и некротические процессы обнаруживались во всех внутренних органах. Через 2 недели в почках наблюдались регенерационные процессы с уменьшением некротических, но развивался интерстициальный нефрит, а в легких – интерстициальная пневмония. Уровень креатинина крови нормализовался недостаточно (80 мкмоль/л). Через 8 недель эксперимента патологическая картина в почках и легких не улучшилась. На отдаленных сроках (16 и 32 недели) к воспалительным и некротическим процессам в почках, легких и миокарде присоединялись склеротические. Уровень креатинина крови составлял 76 мкмоль/л.

Введение глицерина крысам приводило к нарушению выделительной функции почек. Токсическое поражение почек, которое проявлялось дистрофией и некрозом, через 2 недели переходило в воспалительное, последнее и явилось в дальнейшем причиной хронической почечной недостаточности. Таким образом, учитывая, что препараты криоконсервированной плаценты способны усиливать регенерацию (на 1 и 2-й неделе эксперимента), а также влиять на фазы воспаления [Грищенко В.В., 2001; Шепитько В.И., 2004], сдвигая эксудативную фазу в пролиферативную, то целесообразно использовать препараты плаценты на ранних сроках почечной недостаточности.

The research aim was the development of the method to correct the impairment of kidneys' function by means of cryopreserved placenta preparations.

The state of kidneys and internal organs in rats in glycerol model of nephritic insufficiency was investigated. The experiment was carried-out in 50 adult Wistar male rats after single introduction of 50 % glycerol solution in a dose of 1 ml/100 g. Creatinine level in blood serum and daily urine was identified. In histological preparations of the kidneys, stained with hematoxylin and eosin, the area of glomeruli, the size of Shumlyansky's capsule, the area of glomerular capillary loops, diameter of uriniferous tubules were measured.

During the experiment it was established that in a week after introduction of glycerol there was an acute nephritic insufficiency which was characterized by anuria, hypercreatinemia (to 230  $\mu\text{mol/l}$  at the norm of 30  $\mu\text{mol/l}$ ). Hydropic degeneration and necrosis of tubulus epithelium were observed in kidneys. Desquamated epithelium obturated the collective tubules that led to stretching of Shumlyansky's capsule, reduction of the area of vascular loops of a glomerulus, increasing in diameter of proximal and distal tubules, and also interstitial oedema. Dystrophic and necrotic processes were found in all viscera. In 2 weeks regeneration processes with reduced necrotic ones were observed in kidneys, but interstitial nephritis developed, and in lungs there was the development of interstitial pneumonia. The creatinine level in blood was slightly normalized (80  $\mu\text{mol/l}$ ). In 8 weeks of the experiment a pathological image in kidneys and lungs did not improve. At distant terms (16 and 32 weeks) the sclerotic processes joined inflammatory and necrotic ones in kidneys, lungs and myocardium. The level of blood creatinine was 76  $\mu\text{mol/l}$ .

Glycerol introduction in rats led to a disordered secretory function of kidneys. Toxic injury of kidneys which was shown by dystrophy and necrosis, in 2 weeks changed to inflammatory one, the latter was the reason of chronic nephritic insufficiency later. Thus, considering the fact that the cryopreserved placental preparations are capable of strengthening the regeneration (to the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> week of experiment), and also the influence on inflammation phases [Grischenko V. V., 2001; Shepitzko V. I., 2004], shifting an exudative phase into proliferative one, it is expedient to use the placenta preparations at early terms of nephritic insufficiency.

## Девитализированные ксеногенные сосудистые графты через 14 месяцев после трансплантации

Д.В. БЫЗОВ, Н.А. ЧИЖ, И.П. МИХАЙЛОВА, Б.П. САНДОМИРСКИЙ

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

## Devitalized Xenogeneic Vascular Grafts in 14 Months Post Transplantation

D.V. BYZOV, N.A. CHIZH, I.P. MIKHAYLOVA, B.P. SANDOMIRSKIY

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

Ограниченное количество подходящих для трансплантации аутологичных сосудистых протезов малого диаметра ( $\leq 6$  мм) и травматичность их выделения обуславливают поиск альтернативных видов сосудистых графтов. Одним из перспективных подходов является использование биологических сосудистых протезов на основе ксеногенных артерий.

Концепция данного исследования основана на использовании двух физических факторов (низких температур и ионизирующего облучения) для разрушения клеточных компонентов сосудистой стенки как основных носителей иммуногенности, а также с целью создания биологических гипоиммуногенных сосудистых протезов.

В работе использовали внутренние грудные артерии половозрелых свиней. После выделения артерии промывали стерильным физиологическим раствором с добавлением антибиотиков и противогрибковых препаратов (100 МЕ/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 6 мг/мл флуконазола) и помещали в криостойкие полимерные пробирки, которые погружали в жидкий азот. После отогрева на водяной бане пробирки с артериями подвергали облучению потоком электронов в дозе 25 кГр. Изучали морфологическую структуру, ультраструктуру девитализированных артерий и их прочностные характеристики. Для оценки биосовместимости и степени иммуногенности участки артерий имплантировали подкожно крысам линии Вистар. Были выполнены экспериментальные сосудистые операции с использованием девитализированных артерий в качестве сосудистых графтов.

Замораживание приводило к частичной десквамации эндотелия и начальным повреждениям гладкомышечных клеток. Последующее облучение вызывало полное разрушение всех клеточных компонентов при преимущественном сохранении соединительно-тканной структуры сосудистой стенки. Изучаемые физические факторы повышали прочность артерий в продольном и радиальном направлениях, при этом эластичность в области физиологических нагрузок сохранялась в пределах границ варибельности нативных артерий. Ксеноимплантация продемонстрировала отсутствие острых иммуногенных реакций в группе девитализированных артерий. Экспериментальная сосудистая ксенотрансплантация продемонстрировала проходимость девитализированных графтов по меньшей мере в течение 14 месяцев. Острые тромбозы, стенозы, аневризматические дилатации и реакции отторжения отсутствовали на всех сроках наблюдения, при этом структурная целостность графта сохранялась при постепенном его замещении тканями реципиента.

Ксеноартерии, девитализированные изучаемыми физическими факторами, характеризуются гипоиммуногенностью и полноценно функционируют в течение 14 месяцев.

Limited number of suitable for transplantation autologous vascular prostheses of small diameter ( $\leq 6$  mm) and traumatic procedure of their isolation stipulate the search of alternatives for vascular graft types. One of perspective approaches is the use of biological vascular prostheses based on xenogeneic arteries.

This research concept is based on the use of two physical factors (low temperatures and ionizing irradiation) for the destruction of vascular wall cell components as main carriers of immunogenicity as well as with the aim of creation of biological hypoimmunogenic vascular prostheses.

In the work there were used internal thoracic arteries of mature pigs. After isolation the arteries were washed out with sterile physiological solution with adding antibiotics and anti-fungal preparations (100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 6 mg/ml Fluconazole) and placed into cryostable polymer vials, which were plunged into liquid nitrogen. After thawing on water bath the vials with arteries were irradiated by electron flow in a dose of 25 kGy. There were studied morphological structure, ultrastructure of devitalized arteries and their strength characteristics. To estimate biocompatibility and immunogenicity extent the sites of arteries were implanted subcutaneously into Wistar rats. There were carried-out experimental vascular surgeries using devitalized arteries as vascular grafts.

Freezing led to partial desquamation of endothelium and initial damage of smooth muscle cells. The following irradiation caused a complete destruction of all cell components at predominant preservation of connective tissue structure of vascular wall. The studied physical factors increased the strength of arteries in longitudinal and radial directions herewith the elasticity in the region of physiological loadings was kept within the limits of variability of native arteries. Xenotransplantation demonstrated the absence of acute immunogenic reactions in the group of devitalized arteries. Experimental vascular xenotransplantation demonstrated the patency of devitalized grafts at least for 14 months. Acute thromboses, stenoses, aneurism dilatations and rejection reactions were absent at all observation terms, herewith structural integrity of the graft was kept at gradual its substitution with a recipient's tissues.

Xenoarteries devitalized with investigated physical factors are characterized with hypoimmunogenicity and integral function for 14 months.

# Сравнительная оценка роста и развития овариальной ткани различных стадий гистогенеза при гетеротопической трансплантации

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

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

## Comparative Evaluation of Growth and Development of Ovarian Tissue at Different Stages of Histogenesis After Heterotopic Transplantation

Yu.O. TISHCHENKO, V.V. KIROSHKA, T.P. BONDARENKO

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

Одной из стратегий восстановления репродуктивной функции у женщин может быть трансплантация овариальной ткани. Несмотря на многочисленные исследования механизмов фолликулогенеза в яичниках, остаются открытыми вопросы роста и развития трансплантатов овариальной ткани в зависимости от стадии ее гистогенеза, фолликулярного пула, количества стромальной ткани и исходного гормонального статуса реципиентов.

Цель работы – исследовать динамику развития, стероидогенную функцию и фолликулогенез овариальной ткани в зависимости от ее начальной морфологической структуры и исходного гормонального статуса животных-реципиентов. Для решения поставленной цели проводили аллотрансплантацию овариальной ткани различных стадий гистогенеза (половозрелую, а также 1, 3 или 10-го дня постнатального развития) под капсулу левой почки овариоэктомированным животным с различным исходным гормональным статусом. На 30, 60 и 100-е сутки осуществляли гистологический анализ трансплантатов и измеряли концентрацию половых гормонов. Установлено, что половозрелая овариальная ткань при трансплантации сохраняет способность к росту и развитию фолликулов от примордиальной до антральной стадий, обеспечивает восстановление уровней эстрадиола и прогестерона на длительных сроках наблюдения (до 100 дней) у овариоэктомированных животных. При гетеротопической трансплантации неонатальной овариальной ткани 1-х суток постнатального развития происходит ее атипичное развитие на всех сроках после трансплантации. В этом случае на 30-е сутки трансплантаты неонатальной овариальной ткани представляют морфологическую структуру, состоящую из незначительного участка ткани (5–9%), морфологически соответствующего физиологической норме, также наблюдается разрастание стромальных элементов, кистообразование и фиброз. При увеличении сроков наблюдения отмечалось склерозирование ткани трансплантата. Предварительная овариоэктомия животных-реципиентов приводит к увеличению в 2–3 раза площади функционирующей ткани трансплантатов яичников 1-го дня постнатального развития к 60-м суткам наблюдения. Исследование роста и развития трансплантатов овариальной ткани 3 и 10-х суток постнатального развития в организме половозрелого животного-реципиента показало наличие всех стадий фолликулогенеза на длительных сроках после трансплантации (до 100 дней).

Таким образом, развитие и эндокринная функция трансплантатов неонатальной овариальной ткани определяются стадией ее гистогенеза. Получены данные о заместительной гормональной функции неонатальной овариальной ткани 3 и 10-х суток постнатального развития у животных-реципиентов с двухсторонней овариоэктомией.

One of the strategies of restoring the reproductive function in women can be transplantation of ovarian tissue. Despite numerous studies of the mechanisms of folliculogenesis in the ovaries, the questions of growth and development of transplants of ovarian tissue, depending on the stage of its histogenesis, follicular pool, amount of stromal tissue and recipients' initial hormonal status have remained open.

The research aim is to examine the dynamics of development, steroidogenic function and folliculogenesis of ovarian tissue depending on its initial morphological structure and initial hormonal status of the recipient animals. To reach the aim the allotransplantation of ovarian tissue of various histogenesis stages (sexually mature, and also 1, 3 or the 10<sup>th</sup> day of postnatal development) was performed under the capsule of left kidney into ovariectomized animals with different initial hormonal status. In 30, 60 and 100 day the transplants were histologically analyzed and the concentration of sex hormones was measured. It has been established that mature ovarian tissue during transplantation preserves the ability to the growth and development of follicles from primordial to antral stages, provides restoration of estradiol and progesterone levels at long periods of observation (100 days) in ovariectomized animals. During heterotopic transplantation of neonatal ovarian tissue of 1 day postnatal development, its atypical development at all the stages after transplantation occurs. In this case to the 30<sup>th</sup> day the neonatal ovarian tissue the transplants have morphological structure consisting of a small site of tissue (5–9%), morphologically corresponding to the physiological norm, the growth of stromal elements, cyst formation and fibrosis were also observed. While increasing the observation time the sclerotization of transplant tissue was noted. Preliminary ovariectomy of recipient animals leads to 2–3 times increasing the area of functioning tissue of ovarian transplants of 1 day postnatal development to the 60<sup>th</sup> day of observation. Study of the growth and development of ovarian tissue transplants of the 3 and 10 days of postnatal development in the organism of mature recipient animal revealed the presence of all the stages of folliculogenesis at long terms after transplantation (to 100 days).

Thus, the development and endocrine function of neonatal ovarian tissue transplants are determined by the stage of its histogenesis. The facts about substitutive hormone function of neonatal ovarian tissue of the 3 and 10 day postnatal development in recipient animals with bilateral ovariectomy were obtained.

## Изучение выхода пептидов сердца поросят из альгинатных гидрогелей в жидкую фазу

Т.В. ШКАНД<sup>1</sup>, Н.А. ЧИЖ<sup>1</sup>, А.Д. РОШАЛЬ<sup>2</sup>, Б.П. САНДОМИРСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>НИИ химии при Харьковском национальном университете им. В.Н. Каразина

## Ejection of Piglet Heart Peptides From Alginate Hydrogels Into Liquid Phase

T.V. SHKAND<sup>1</sup>, N.A. CHIZH<sup>1</sup>, A.D. ROSHAL<sup>2</sup>, B.P. SANDOMIRSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

<sup>2</sup>R&D Institute of Chemistry at V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

Сердечная недостаточность является естественным исходом многих заболеваний сердца и сосудов, в том числе ишемической болезни сердца и инфаркт миокарда. В экспериментальных и клинических работах показана эффективность применения при острых и хронических поражениях сердца цитокинов и регуляторных пептидов с целью усиления репаративной регенерации миокарда. В качестве основы для подведения действующего вещества в зону локального повреждения сердца используют коллаген, фибрин, соли альгиновой кислоты, а также сложные комбинированные синтетические материалы.

Цель работы – изучение динамики выхода пептидов экстрактов сердца новорожденных поросят из альгинатных гелей в жидкую фазу.

Для исследования готовили плотные и жидкие формы альгината натрия на основе экстрактов сердца новорожденных поросят (100 мкг пептидов/1 мл). Образцы стерилизовали методом автоклавирования с помощью парового стерилизатора при температуре 112°C в течение 20 мин. Скорость выхода пептидов определяли спектрофотометрически на длине волн 220–450 нм. В качестве жидкой фазы для экстракции использовали 0,9%-й раствор NaCl.

Для формирования «заплаты» в миокарде жидкую форму геля, который можно вводить инъекционно, готовили при 2%-й концентрации альгината. Плотный гидрогель для аппликации на поврежденную поверхность сердца образовывался при 10%-й концентрации альгината натрия. Кроме того, плотный гель альгината натрия получали в таблеточной форме путем помещения гидрогеля в блистер. На 1, 3 и 7-е сутки после посева стерилизованных гелей роста бактерий и грибов выявлено не было. При сравнении оптических плотностей водных экстрактов спектрофотометрически установлено, что в растворах после стерилизации продукты карамелизации гидрогеля отсутствовали, это свидетельствовало о целостности полимерных цепей альгинатов. Выявлено, что на начальном этапе (3–6 мин) скорость выхода пептидов одинакова как для плотного, так и для жидкого гидрогеля. Это подтверждает одинаковую динамику процессов регистрируемой диффузии пептидов экстракта в геле. При использовании таблеток плотного геля пептидные компоненты экстракта полностью извлекались за 4–5 мин экстракции.

Стерилизация гидрогелей не приводит к разрушению полимерных цепей альгинатов. Выход компонентов экстракта сердца поросят происходит одинаково эффективно как из жидкого, так и из плотного геля. Наибольшую эффективность извлечения наблюдали в первые 3–6 мин контакта геля с жидкой фазой.

Cardiac insufficiency is a natural outcome of many cardiovascular diseases, including ischemic heart disease and myocardial infarction. In experimental and clinical works there was shown an efficiency of application of cytokines and regulatory peptides with the aim of strengthening reparative regeneration of myocardium at acute and chronic lesions of heart. As the base for delivery of acting agent into the zone of local lesion of heart there are used collagen, fibrin, salts of alginic acid, as well as composite synthetic materials.

The research aim was to study the dynamics of ejection of peptides of newborn piglet heart extracts from alginate gels into liquid phase.

For this research there were prepared dense and liquid forms of sodium alginate based on the extracts of newborn piglet hearts (100 µg peptides/1 ml). The samples were sterilized by autoclaving with vapour sterilizer at 112°C for 20 min. The ejection rate of peptides was found spectrophotometrically at 220–450 nm. As a liquid phase for extraction there was used 0.9% NaCl solution.

To form the 'patch' on myocardium a liquid form of gel which can be injected was prepared with 2% alginate concentration. Dense hydrogel for application onto injured surface of heart was formed at 10% concentration of sodium alginate. In addition, dense gel of sodium alginate was obtained in a tablet form by placing hydrogel into blister. To the 1, 3 and 7<sup>th</sup> days after seeding of sterilized gels no growth of bacteria and fungi was found. When comparing optical densities of aqueous extracts there was spectrophotometrically established that in the solutions after sterilization the products of hydrogel caramelization were absent, this testified to the integrity of polymer chains of alginates. It has been revealed that at initial stage (3–6 min) the ejection rate of peptides is similar both for a dense and liquid hydrogels. This confirms the similar dynamics of the processes of the recorded diffusion of extract peptides in gel. When using tablets of a dense gel the peptide components of extract were completely withdrawn for 4–5 minutes of extraction.

Sterilization of hydrogels does not lead to the destruction of polymer chains of alginates. The ejection of components of newborn piglets' heart extracts occurs the same effectively both from liquid and dense gels. The highest efficiency of ejection was observed in the first 3–6 min of gel contact with liquid phase.

## Тканинноспецифічний вплив пептидних комплексів серця

М.О. ЧИЖ, Л.А. РОГОЗА, Г.Г. БАБАЄВА, С.Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б.П. САНДОМИРСЬКИЙ  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

## Tissue-Specific Effect of Peptide Complexes of Heart

M.O. CHIZH, L.A. ROGOZA, G.G. BABAEVA, S.YE. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Гострий інфаркт міокарда продовжує залишатися однією з основних причин смертності та втрати працездатності в усьому світі, це обумовлює необхідність пошуку нових підходів до лікування даної патології. Перспективним в цьому плані може бути використання препаратів, які містять тканинноспецифічні пептидні комплекси.

Пептидні комплекси серця свиней (ПКСЦС) та новонароджених поросят (ПКСЦП) отримували з кріоконсервованих фрагментів сердець шляхом 60-хвилинної інкубації у фізіологічному розчині та видалення термолабільних білків. При дослідженні впливу пептидних комплексів на здорових тварин їх вводили протягом 28 діб в черевну порожнину безпородним білим щурам, вік яких на початок експерименту становив 1 та 4 місяці, з розрахунку 50 мкг пептидів на 100 г маси. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин.

Некроз міокарда (НМ) моделювали шляхом впливу на стінку лівого шлуночка щурів азотним кріоінструментом з діаметром аплікатора 3 мм протягом 15 с. Тваринам I групи (контроль) проводили тільки кріовплив. Щурам II групи на фоні експериментального НМ вводили кардіопротекторний препарат порівняння «Неотон» в дозі 20 мг/100 г тварини. До III групи увійшли тварини після кріонекрозу міокарда з введенням у черевну порожнину ПКСЦП один раз на добу. Доза пептидів становила 50 мкг/100 г маси тварини.

При морфометричних дослідженнях гістологічних препаратів встановлено, що щільність ядер клітин в серцях контрольних і дослідних 4-місячних тварин на 14 та 28-му добу статистично достовірно не відрізнялася ( $p > 0,05$ ). При введенні ПКСЦС або ПКСЦП місячним тваринам на 14-ту добу експерименту цей показник також статистично достовірно не відрізнявся від контрольного. Але на 28-му добу у дослідних тварин щільність була достовірно більшою, ніж у контрольних ( $p < 0,05$ ).

В нормі частота серцевих скорочень (ЧСС) у місячних щурів складала  $502 \pm 27$ , а у 4-місячних –  $415 \pm 23$  за 1 хв. Введення тваринам пептидних комплексів не впливало на ЧСС та потужність спектра в усіх частотних діапазонах.

Після кріовпливу на стінку серця щурів за даними ЕКГ дослідження в усіх тварин виявлено розвиток субепікардіального НМ. На 14-у добу на ЕКГ в експериментальних групах знижувалася амплітуда зубця *q*. У контрольних тварин і при введенні «Неотону» спостерігався глибокий негативний зубець *T*.

Після формування кріонекрозу міокарда у тварин всіх груп відзначали збільшення індексу де Рітиса до 3 (норма 1,8). На 7-му добу він зменшувався найбільш виражено в групах тварин, яким вводили «Неотон» або ПКСЦП.

В контрольній групі впродовж всього терміну спостереження відмічався зсув лейкоцитарної формули вліво. На 30-ту добу в групі з введенням ПКСЦП індекс зсуву лейкоцитів повертається до норми.

Acute myocardial infarction has remained one of the basic causes of death and disability all over the world, this stipulates the necessity of new approaches searching to the treatment of this disease. Application of preparations, containing tissue-specific peptide complexes, may be perspective.

Peptide complexes of pigs heart (PCPH) and newborn piglets (PCNPH) ones were derived from cryopreserved fragments of hearts by 60-min incubation in physiological solution and removal of thermolabile proteins. In the study of peptide complexes effect on healthy animals they were injected within 28 days to abdominal cavity of breedless white rats, their age at the beginning of the experiment was 1 and 4 months, 50  $\mu$ g peptides per 100 g weight. The control rats were injected with saline.

Myocardial necrosis simulated by affecting the rat left ventricular wall by means of nitrogen cryoinstrument with 3 mm applicator for 15 s. The animals of the 1<sup>st</sup> group (control) were only cryoexposed. The rats of the 2<sup>nd</sup> group on the background of experimental MN were injected with cardioprotective preparation of comparison Neoton of 20 mg per 100 g of animal. The 3<sup>rd</sup> group included the animals after cryonecrosis of myocardium with introduction of PCNPH to peritoneal cavity once a day. Peptide dose was 50  $\mu$ g per 100 g of animal.

During morphometric studies of histological preparations it was revealed that the density of cell nuclei in hearts of control and experimental 4-month-old animals to the 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day was not statistically and significantly differed ( $p > 0.05$ ). When introducing PCPH or PCNPH to 1-month-old animals to the 14<sup>th</sup> day of experiment, this index is also not statistically and significantly differed from the control. But to the 28<sup>th</sup> day in the experimental animals density was significantly higher than in the control ones ( $p < 0.05$ ).

Normally heart rate (HR) in 1-month-old rats was  $502 \pm 27$ , and 4-month-old ones it was  $415 \pm 23$  for 1 min. Introduction of peptide complexes into animals did not affect HR and spectrum power within all the frequency ranges.

After cryoexposure to rat's heart wall according to ECG values of study the development of sub-epicardial MN in all the animals was revealed. To the 14<sup>th</sup> day in ECG in experimental groups amplitude of *q* wave is decreased. In the control animals during introduction of Neoton a deep negative *T* wave was observed.

After formation of myocardium cryonecrosis in animals of all the groups the increase in de Ritis index to 3 (norm 1.8) was revealed. To the 7<sup>th</sup> day the reduction was more expressed in animal groups injected with Neoton or PCNPH.

In the control group during observation period the left shift of leukocyte formula was observed. To the 30<sup>th</sup> day in the group with introduction of PCNPH leukocyte shift index is normal.

# Морфофункциональная сохранность фрагментов плаценты при различных схемах криоконсервирования

О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк

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

## Morphofunctional Integrity of Placental Fragments After Using Different Cryopreservation Protocols

O.S. PROKOPYUK, V.YU. PROKOPYUK

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

Необходимость криоконсервирования фрагментов плаценты с сохранением как клеток, так и межклеточных взаимодействий связана с их востребованностью в клинической практике [Грищенко В.И. и соавт., 2011] как источников стволовых клеток для банкирования [Lee L.K. *et al.*, 2010] и создания моделей для экспериментальных исследований новых фармакологических препаратов [Soorana S.R. *et al.*, 1999]. Имеющиеся методы криоконсервирования фрагментов плаценты [Huppertz B. *et al.*, 2011] основаны на использовании высоких концентраций диметилсульфоксида (ДМСО), который оказывает ингибирующее влияние на цитотрофобласт [Thirkill T.L., Douglas G.C., 1997], и не всегда обеспечивают сохранность ткани.

Цель работы – разработка метода криоконсервирования фрагментов плаценты, позволяющего максимально сохранить морфофункциональные свойства как отдельных клеток, так и ворсин в целом.

В качестве компонентов криозащитных сред использовали ДМСО, пропандиол, диметилформамид, полиэтиленоксид, поливинилпирролидон, декстран, гидроксипропилкрахмал (ГЭК), сахарозу, альбумин. Исследована двухэтапная программа криоконсервирования без и с применением сидинга. Структурную сохранность фрагментов изучали методами световой и электронной микроскопии, функциональные свойства – методами прижизненной окраски, определения уровней секреции альфа-фетопротеина и хорионического гонадотропина человека.

Показано, что все изученные вещества обладают криозащитным действием различной степени выраженности в отношении фрагментов плаценты. Наибольшая сохранность клеток плаценты отмечена при использовании ДМСО, однако при этом выявлены отслаивания цитотрофобласта и разрывы стромы ворсин. Сохранности структуры ткани удалось добиться при внесении в криозащитную среду ГЭК. Использование режима сидинга повысило эффективность криопрограммы: получена почти полная сохранность криоконсервированных фрагментов плаценты при минимальной концентрации криопротекторов.

Двухэтапная программа криоконсервирования с применением сидинга, диметилсульфоксида и гидроксипропилкрахмала позволяет достичь высокой степени морфофункциональной сохранности криоконсервированных фрагментов плаценты. Предложенные методы криоконсервирования и низкотемпературного хранения фрагментов плаценты позволяют более эффективно их использовать в исследовательских и клинических целях.

The necessity in cryopreservation of placental fragments with preserving both cells and cell-to-cell interactions is associated to their relevance in clinical practice [Grischenko V.I. *et al.*, 2011] as the source of stem cells for banking [Lee L.K. *et al.*, 2010] and creating the models for experimental studies of novel pharmaceutical preparations [Soorana S.R. *et al.*, 1999]. Available methods for placental fragment cryopreservation [Huppertz B. *et al.*, 2011] are based on the use of high concentrated dimethyl sulfoxide (DMSO), causing an inhibitory effect on cytotrophoblast [Thirkill T.L., Douglas G.C., 1997], and not always providing the tissue integrity.

The research purpose was to design the method for placental fragment cryopreservation, enabling the maximum preservation of morphofunctional properties of both single cells and villi on the whole.

As components of cryoprotective media there were used DMSO, propanediol, dimethylformamide, polyethylene oxide, polyvinylpyrrolidone, dextran, hydroxyethyl starch (HES), sucrose and albumin. The two-stage program of cryopreservation without/with seeding was investigated. Structural integrity of fragments was studied with light and electron microscopy, functional properties were investigated with methods of supravital staining, determination of secretion level of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin.

All the studied substances were demonstrated to possess a cryoprotective effect of different manifestation rates towards placental fragments. The highest integrity of placental cells was noted when using DMSO, but in this case there were revealed the cytotrophoblast exfoliation and villous stroma breaks. We managed to achieve the integrity of tissue structure by introducing HES into cryoprotective media. The use of seeding regimen increased the efficiency of cryoprograms: quite a complete integrity of cryopreserved placental fragments under a minimum concentration of cryoprotectants was obtained.

The two-stage cryopreservation program with application of seeding, dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch enables to achieve a high degree of morphofunctional integrity in cryopreserved placental fragments. The proposed methods for cryopreservation and low temperature storage of placental fragments enable their more efficient application in research and clinical purposes.

## Способ низкотемпературного моделирования деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе

Б.П. ВВЕДЕНСКИЙ<sup>1</sup>, Г.А. КОВАЛЕВ<sup>1</sup>, Н.В. ДЕДУХ<sup>2</sup>, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО<sup>1</sup>, О.П. СЫНЧИКОВА<sup>1</sup>, Б.П. САНДОМИРСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>ГУ «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко АМН Украины», г. Харьков

## Modeling of Destructive and Dystrophic Process in Knee Joint Using Low Temperatures

B.P. VVEDENSKIY<sup>1</sup>, G.A. KOVALEV<sup>1</sup>, N.V. DEDUKH<sup>2</sup>, S.YE. GALCHENKO<sup>1</sup>, O.P. SYNCHIKOVA<sup>1</sup>, B.P. SANDOMIRSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

<sup>2</sup>Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology of the Academy of Medical Sciences, Kharkov, Ukraine

Остеоартроз и артрит коленного сустава – часто встречающиеся заболевания, в основе которых лежат деструктивно-дистрофические (ДД) изменения с медленно прогрессирующим разрушением хрящевой ткани и нарушением функции сустава. Они являются причиной нетрудоспособности [Зазірний І.М. та ін., 2010]. Ввиду частой распространенности ДД изменений суставов сформирован социальный заказ на проведение исследований по разработке и усовершенствованию методов лечения, что в свою очередь требует проведения экспериментов *in vivo*.

Цель исследования – разработать простой в исполнении, малотравматичный и недорогой способ моделирования деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе.

Работу выполняли на 6-месячных крысах в соответствии с этическими принципами экспериментов на животных (Страсбург, 1986). Моделирование осуществляли путем внутрисуставной инъекции хладагентов – водных растворов этанола (96, 70, 48, 35%), охлажденных в парах жидкого азота. Животных разделили на 5 групп по 10 особей в каждой: 1 – контрольная (интактные), 2–5 – экспериментальные (введение в сустав хладагента – 96, 70, 48 и 35% растворов этанола, охлажденных в парах жидкого азота). Из эксперимента животных выводили на 7-е сутки. Оценивали морфологические изменения в коленном суставе.

Предлагаемый способ позволяет регулировать температуру охлаждения тканей коленного сустава путем подбора хладагента с заданными свойствами. Патоморфологические проявления криоповреждений имеют однотипный характер и хорошую воспроизводимость. Внутрисуставное возникновение фронта образования льда при введении хладагента непосредственно в полость сустава приводит к движению фронта охлаждения из глубины к поверхности, процесс оттаивания элементов сустава проходит в обратной последовательности, что позволяет нивелировать потери хладопродуктивности. Таким образом, достигается максимально возможное для данного температурного диапазона повреждение элементов, образующих суставную полость.

Полученные в работе данные могут быть использованы при планировании и оценке результатов экспериментальных исследований, направленных на изучение влияния различных лечебных воздействий *in vivo*.

Osteoarthritis and arthritis of knee joint are widely spread diseases in the base of those are destructive and dystrophic (DD) changes with slowly progressing destruction of cartilaginous tissue and impairment of joint function. They are the cause of disabilities [Zazirnyy I.M. *et al.*, 2010]. Due to the frequent occurrence of joint DD changes there was specified a social mandate for performing studies on designing and improvement of treating methods that in its turn requires the performance of the experiments *in vivo*.

The research aim was to design a simple, slightly invasive and inexpensive way of modelling destructive and dystrophic process in a knee joint.

The work was performed in 6 month-old rats in accordance with ethical principles of the experiments in animals (Strasbourg, 1986). Simulation was done by means of intra-joint injection of coolants, aqueous solutions of ethanol (96, 70, 48, and 35%), cooled in liquid nitrogen vapours. Animals were divided into 3 groups by 10 individuals in each: 1 – control (intact), 2–5 – experimental (introduction of coolant into a joint – 96, 70, 48 or 35% ethanol solutions, cooled in liquid nitrogen vapours). The animals were withdrawn from the experiment to the 7<sup>th</sup> day. Morphological changes in knee joint were examined.

The proposed way allows the regulation of cooling temperature for tissues of knee joint by selecting the coolant with the set properties. Pathomorphological manifestations of cryolesion are of similar character and well reproduced. Intra-joint appearance of ice formation front when administering the coolant directly in the cavity of joint leads to the moving of cooling front from the depth to a surface, the process of thawing of joint elements occurs in an inverted sequence, enabling the elimination of the losses of cooling productivity. Thus the maximum possible for this temperature range injury of the elements forming the joint cavity is achieved.

The findings can be used when planning and estimating the results of experimental researches, directed to investigation of the impact of different therapeutic effects *in vivo*.

## Клеточная терапия в лечении заболеваний переднего отрезка глаза

Ю.А. ДЕМИН, А.В. ПИВНЕНКО, М.Ю. ДЕМИНА

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

## Cell Therapy in Treatment of Diseases of Eye Anterior Segment

YU.A. DEMIN, A.V. PIVNENKO, M.YU. DEMINA

*Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine*

Достижения современной криобиологии и криомедицины обусловили развитие новых технологий в лечении заболеваний переднего отрезка глазного яблока. Получены и осмыслены принципиально новые экспериментальные данные, свидетельствующие о значительном сохранении метаболической активности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) после криоконсервирования. Кроме того, известно, что пластичность переднего отрезка глаза поддерживается благодаря пулу стволовых клеток лимба.

Рассматривая эту проблему, можно выделить два направления: замещение поврежденных структур роговой оболочки и стимуляция её репаративной регенерации путем продукции различных нейротрофических факторов и биологически активных веществ, выделяемых криоконсервированными мезенхимальными стромальными клетками (кМСК).

Нами предложена оригинальная методика введения кМСК для терапии травматических повреждений и дистрофических заболеваний роговицы, а именно клеточных биологических покрытий с кМСК на внутренней поверхности мягкой контактной линзы, и метод гидрирования кМСК в лимбальную зону роговой оболочки.

Результаты экспериментальных исследований показали, что применение кМСК оказало выраженное положительное влияние на репаративные процессы в роговой оболочке и позволило добиться восстановления целостности структуры её эпителия и стромы.

Положительные результаты применения клеточных технологий в лечении дистрофических изменений и травматических повреждений роговицы позволят использовать клеточную терапию в клинической практике врача офтальмолога.

The achievements of current cryobiology and cryomedicine have enabled the development of new technologies when treating the diseases of eye anterior segment. Principally new experimental data testifying to a significant preservation of metabolic activity of mesenchymal stromal cells (MSCs) after cryopreservation have been obtained and interpreted. In addition, it is known that the plasticity of anterior segment is maintained due to the pool of limb stem cells.

When considering this issue, there are two possible directions: replacing of damaged structures of cornea and stimulation of reparative regeneration through the production of various neurotrophic factors and biologically active substances released by cryopreserved mesenchymal stromal cells (cMSCs).

We have proposed an original method of introducing cMSCs for the therapy of the cornea traumatic injuries and degenerative diseases, namely cell biological coatings with cMSCs on inner surface of soft contact lens and the method of cMSCs hydrogenation into cornea limbal area.

The results of experimental studies have shown that the use of cMSCs rendered manifested positive effect on reparative processes in cornea and allowed the restoration of its epithelium and stroma structural integrity.

Positive results of the cell technology application in treatment of cornea degenerative and traumatic changes suggest that cell therapy will take its place in clinical practice of an ophthalmologist.