

Криоконсервирование цельной кордовой крови с ПЭО-1500:

оценка стадий апоптоза ядродержащих клеток

Л.А. БАБИЧУК, П.М. ЗУБОВ, О.Л. ЗУБОВА, В.В. РЯЗАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Whole Cord Blood Cryopreservation with PEO-1500:

Assessment of Apoptotic Stages in Nucleated Cells

L.A. BABYCHUK, P.M. ZUBOV, O.L. ZUBOVA, V.V. RYAZANTSEV

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

В настоящее время кордовая кровь (КК) признана полноценным источником гемопоэтических стволовых клеток. В ряде работ было показано, что максимально выраженный терапевтический эффект КК проявляется при применении ее без фракционирования. Кроме того, выделение гемопоэтических клеток в отдельную фракцию может снизить эффективность приживления образца за счет удаления аксессуарно-регуляторных клеточных популяций, определяющих их функциональную полноценность. Исходя из этого, большой научный и практический интерес представляют разработка безотмывочного метода долгосрочного хранения цельной кордовой крови с сохранением как клеточных компонентов (ядросодержащие клетки и эритроциты), так и плазмы с биологически активными веществами, а также комплексная оценка клеток на всех стадиях криоконсервирования.

Цель работы – оценка эффективности разработанного нами безотмывочного метода криоконсервирования цельной кордовой крови с непроникающим криопротектором полиэтиленоксидом с м.м. 1500 Да (ПЭО-1500) по определению количества жизнеспособных ядродержащих клеток, а также клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза после размораживания.

Для оценки стадий апоптоза ядродержащих (CD45⁺) клеток КК был использован цитофлуориметрический метод, основанный на комбинации аннексина V и 7AAD – красителя, который легко проникает в клетки на поздних стадиях апоптоза или некроза, но не может попасть в клетки на начальном этапе апоптоза.

Показано, что криоконсервирование КК по разработанному нами методу обеспечивает сохранность большого количества аннексин V⁻/7AAD⁻-клеток (до 77%), что сопоставимо с результатами общепринятого метода замораживания (3°C/мин).

Наибольший интерес представляет определение аннексин V⁻/7AAD⁻-клеток в каждой из популяций (лимфоциты, моноциты, гранулоциты), так как именно эти клетки в полной мере смогут выполнять свои функции при попадании в организм реципиента. Было показано, что процент аннексин V⁻/7AAD⁻-мононуклеаров (лимфоциты, моноциты) после замораживания меньше на 4% по сравнению с общепринятым способом криоконсервирования ядродержащих клеток (3 град/мин). Следует отметить, что популяция гранулоцитов является наиболее криочувствительной, что подтверждается максимальным количеством этих клеток с признаками апоптоза и некроза.

Nowadays a cord blood (CB) is recognized as an integral source of hemopoietic stem cells. In some researches the maximally pronounced therapeutic effect of CB was shown to be manifested when applying it without fractionation. In addition the isolation of hemopoietic cells into separated fraction may reduce the efficiency of sample's engraftment due to the removal of accessory and regulatory cellular populations, determining their functional integrity. Proceeding from this fact, high scientific and practical interest is for developing non-washing method of long-term storage for the whole cord blood with preserving both cellular components (nucleated cells and erythrocytes) and plasm with biologically active substances, as well as complex cell assessment at each stage of cryopreservation.

The research aim was to estimate the efficiency of designed by us non-washing method for the whole cord blood cryopreservation with non-penetrative cryoprotectant polyethylene oxide with molecular weight of 1500 Da (PEO-1500) by examining the number of viable nucleated cells, as well as those, being at different apoptotic stages after freeze-thawing.

To assess the apoptotic stages in nucleated (CD45⁺) CB cells we used the cytofluorimetric method, based on combining Annexin V and 7AAD dye, which penetrates easily into cells at later stages of apoptosis or necrosis, but can not enter into cells at initial stage of apoptosis.

The CB cryopreservation according developed by us method was shown to provide the preservation of a high number of Annexin V⁻/7AAD⁻ cells (up to 77%), that was comparable with the results of the standard freezing method (3°C/min).

Of most interest is the estimation of Annexin V⁻/7AAD⁻ cell content in each population (lymphocytes, monocytes, granulocytes), since namely these cells may fully accomplish their functions when appearing in a recipient's organism. The percentage of annexin V⁻/7AAD⁻ mononuclears (lymphocytes, monocytes) after freeze-thawing was shown to be lower by 4% compared to the standard way of nucleated cell cryopreservation (3 deg/min). Of note is the fact, that the granulocyte population is the most cryosensitive, that is confirmed by the maximum content of these cells with signs of apoptosis and necrosis.

Фазовые переходы в автоклавированных экстрактах плаценты и суспензиях клеток при температурах ниже 0°C

Е.Н. БОБРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО, М.И. ШЕТИНСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Phase Transitions in Autoclaved Placental Extracts and Cell Suspensions at Temperatures below 0°C

E.N. BOBROVA, A.V. ZINCHENKO, M.I. SCHETINSKY

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

В настоящее время экстракты плаценты используют для получения препаратов, характеризующихся высокой биологической активностью. Они находят применение в биологии и медицине. Автоклавирование – один из перспективных методов, позволяющих при определенных условиях частично сохранить биологическую активность экстрактов плаценты, снизить риск контаминации и увеличить срок хранения препаратов. Изменение биологической активности экстрактов после автоклавирования по отношению к клеткам может быть обусловлено особенностями межмолекулярных взаимодействий компонентов системы.

В данной работе исследованы фазовые переходы в водно-солевых экстрактах плаценты человека и клеточных суспензиях в присутствии экстрактов в температурном диапазоне –100...0°C и определено количество связанной воды в образцах.

Автоклавирование водно-солевых экстрактов плаценты человека проводили при температуре 120...122°C, давлении 1,8–2,0 атмосфер в течение 10–20 мин. Клетки *Candida albicans*, перевиваемой культуры эпителия почки свиньи (СПЭВ) и отмытые физиологическим раствором эритроциты осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 800 g и смешивали с экстрактом плаценты в соотношении 1:1. Низкотемпературные фазовые переходы исследовали на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК). Образцы охлаждали погружением в жидкий азот, средняя скорость охлаждения составляла 3,3(3) град/с. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью $8,3(3) \times 10^{-3}$ град/с. Для определения количества связанной воды использовали спектрометр ЯМР высокого разрешения «TESLA BS 567 А».

Исследования показали, что автоклавирование экстракта приводит к инверсии в экстракте плаценты человека при –73°C. Смешение экстракта с клеточными суспензиями повышает температуру инверсии на 3–7 градуса, что обусловлено связыванием молекул, участвующих в процессе инверсии, с клеточными мембранами и затруднением развития процесса инверсии. Кристаллизация льда при нагреве после автоклавирования экстракта отсутствует, что свидетельствует о полной кристаллизации льда при охлаждении. При этом количество связанной воды составляло 0,1–0,3% относительно всей воды в системе. Показано, что автоклавирование способствует процессу кристаллизации эвтектических составов при охлаждении, что подтверждается увеличением пика плавления эвтектических составов, наблюдаемом на этапе нагрева.

Таким образом, автоклавирование экстракта приводит к трансформации межмолекулярных взаимодействий в нем, в следствие чего изменяются протекающие фазовые переходы при температурном влиянии.

Nowadays, placental extracts are used to produce the preparations characterized by a high biological activity. They are used in biology and medicine. Autoclaving is one of the perspective methods allowing, under certain conditions, partial preservation of biological activity of placental extracts, reduction of the risk of contamination and increase of storage term of preparations. Change of biological activity of extracts after autoclaving as for cells may be stipulated by peculiarities of molecule-molecule interactions of system components.

In this research the phase transitions in aqueous-saline extracts of human placenta and cell suspensions with extracts within the temperature range –100...0°C were studied and amount of bound water in the samples was examined.

Autoclaving aqueous-saline extracts of human placenta was performed at 120–122°C, 1.8–2.0 atm pressure for 10–20 min. Cells of *Candida albicans*, the cells of pig kidney epithelium passaged culture (SPEV), and erythrocytes washed with physiological solution were sedimented by centrifugation for 5 min at 800 g and mixed with placental extract in 1:1 ratio. Low-temperature phase transitions were investigated with differential scanning calorimeter (DSC). The samples were cooled by plunging into liquid nitrogen, average cooling rate was 3.3(3) deg/s. Thermograms were recorded when heating at the rate of $8.3(3) \times 10^{-3}$ deg/s. There was used high-resolution NMR spectrometer TESLA BS 567 A to examine the amount of bound water.

The studies have shown that the extract autoclaving results in inversion in human placental extract at –73°C. The mixing of extract with cell suspensions rises temperature of inversion by 3–7°C, that is stipulated by binding of the molecules, involved into inversion, with cell membranes and making difficult this process. Ice crystallization at heating after autoclaving the extract is absent, indicating a complete ice crystallization during cooling. Herewith the amount of bound water was 0.1–0.3% relative to all the water in a system. It is shown that autoclaving contributes to crystallization of eu-tectic compositions during cooling, confirmed by increase of eutectic compositions in melting peak, observed during heating.

Thus, extract autoclaving leads in transformation of intermolecular interactions in it, resulting in a change of proceeding phase transitions at temperature effect.

Использование каталазы для стимуляции роста мицелиальных и дрожжевых грибов после криоконсервации

И.С. ВАЖИНСКАЯ, А.В. КАНТЕРОВА, Г.И. НОВИК, И.В. МОРОЗ

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Use of Catalase to Stimulate Growth of Mycelial and Yeast Fungi after Cryopreservation

I.S. VAZHINSKAYA, A.V. KANTEROVA, G.I. NOVIK, I.V. MOROZ

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

В Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов одним из обязательных методов хранения культур различной таксономической принадлежности является криоконсервация. Для сохранения максимальной выживаемости клеток и их способности к активному росту нами изучались и оптимизировались условия, от которых зависели эти показатели. Однако у отдельных штаммов грибов, хранившихся при -70°C , после отогрева (как после медленного, так и быстрого) отмечалась низкая скорость роста колоний по сравнению с субкультивированием. В научной литературе представлены многочисленные данные об использовании антиоксидантного металлофермента каталазы (КФ 1.11.1.6) как индуктора, способного быстро вернуть микроорганизмы в активное культивируемое состояние. Однако нам не удалось в доступной литературе найти сведения об изучении участия каталазы в процессах активизации восстановления грибов после нахождения в стрессовом состоянии.

В настоящей работе представлены результаты использования разработанного в лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси ферментного препарата «Каталаза» (продукт – штамм *Penicillium piceum* БИМ F-371) с активностью 15000 ед/мл в качестве агента, стимулирующего возврат к активному росту грибов, длительно находившихся в условиях стресса, прекращающего процессы, связанные с ростом и размножением.

Объектами исследований служили промышленно-ценные культуры вида *Pleurotus ostreatus* (5 штаммов), *Ganoderma lucidum* (3 штамма), *Metchnikowia krissii* (1 штамм) и *Bulleromyces albus* (2 штамма) после 4-х лет хранения при -70°C (протектор – обезжиренное молоко). После отогрева при 37°C мицелиальные и дрожжевые грибы культивировали 4 суток на сусло-агаре. Ферментный препарат (500, 1000 и 1500 ед на чашку Петри) вводили в питательные среды перед посевом тестируемых микроорганизмов. Контроль выращивали на среде без добавления фермента.

Стимулирующий эффект препарата (500 ед на чашку Петри) отмечен у культуры вида *G. lucidum*, диаметр колоний опытных образцов в 2,0–2,5 раза превышал контрольные показатели. Не отмечено какого-либо увеличения скорости роста колоний на средах со всеми вариантами концентрации ферментного препарата у штаммов вида *P. ostreatus*, *M. krissii* и *B. albus*.

Таким образом, переход грибов *G. lucidum* в активное культивируемое состояние после замораживания стимулируется наличием в питательной среде антиоксидантного фермента каталазы. Что касается других культур, то для успешного возврата к интенсивному росту для каждой из них необходим подбор специфических компонентов сред.

In Byelorussian collection of non-pathogenic microorganisms one of mandatory methods to store the cultures of different taxonomic belonging is cryopreservation. To preserve maximum survival rate of cells and their ability to active growth we have studied and optimized the conditions on which these indices were dependent. However, in certain strains of fungi, stored at -70°C , after thawing (both after slow and rapid ones) there was found a low rate of colony growth if compared with subculturing. In scientific literature there are presented numerous data about using antioxidant enzyme catalase (EC 1.11.1.6) as an inducer capable to turn the microorganisms rapidly into an active culturing state. However, in an available literature we did not manage to find the data on investigating the involvement of catalase into the processes of activation of fungi recovery after being in a stress state.

In this work there are presented the results of using the designed at laboratory of enzymes of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus of enzyme preparation ‘catalase’ (producer – strain *Penicillium piceum* BIM F-371) with the activity of 1500 units/ml as an agent stimulating the coming back to active growth of fungi, being during long time under stress conditions, ceasing the processes related to the growth and reproduction.

The research objects were industrially valuable cultures of *Pleurotus ostreatus* species (5 strains), *Ganoderma lucidum* (3 strains), *Metchnikowia krissii* (1 strain) and *Bulleromyces albus* (2 strains) after 4 year-long storage at -70°C (skimmed milk as a protectant). After thawing at 37°C mycelial and yeast fungi were cultured for 4 days with wort agar. Enzyme preparation (500, 1000 and 1500 units per Petri dish) was introduced into nutritive media prior to seeding of the microorganisms to be tested. The control was grown on the medium with no enzyme adding.

Stimulating effect of the preparation (500 units per Petri dish) was noted in the culture of *G. lucidum* species, diameter of colonies of the experimental samples in 2–2.5 times exceeded the control indices. No increase in the growth rate of colonies on the media with all the concentration variants of enzyme preparation in the strains of *P. ostreatus*, *M. krissii* and *B. albus* was found.

Thus the recovery of *G. lucidum* fungi for active culture state after freezing is stimulated by the presence in nutritive medium of antioxidant enzyme catalase. As for other cultures then for successful coming back to intensive growth for each of them the selection of specific components of the media is necessary.

Выживаемость бактериофагов фитопатогенных бактерий при криоконсервации и лиофилизации

А.Д. ГЕРАСИМОВИЧ, Г.И. НОВИК

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Survival Rate of Bacteriophages of Phytopathogenic Bacteria after Cryopreservation and Freeze-Drying

A.D. GERASIMOVICH, G.I. NOVIK

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

В промышленности и сельском хозяйстве интерес к бактериофагам обусловлен их использованием для контроля популяций бактерий, приносящих вред на производствах и поражающих сельскохозяйственные растения. Использование различных биопрепаратов для контроля таких бактерий является одним из перспективных методов биологической защиты растений от инфекционных заболеваний. Для успешной разработки биопрепаратов необходимо поддержание данных микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени. В связи с этим важна разработка эффективных методов консервирования бактериофагов.

Для изучения выживаемости фагов BV-50, BV-51, BV-52 и BV-53 (из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси) при криоконсервировании исследовали влияние различных скоростей охлаждения (4, 100 и 400 град/мин) и криопротекторов (10%-й глицерол и 5%-й диметилсульфоксид) на жизнеспособность бактериофагов. При исследовании влияния лиофилизации на жизнеспособность бактериофагов лизаты смешивали с обезжиренным молоком в конечной концентрации 10% и помещали в ампулы в количестве 200 мкл. Лиофилизацию осуществляли в установке для сублимационного высушивания «Modulyo 4K» («Edwards»). Исследовали выживаемость бактериальных вирусов при длительном хранении в лиофилизированном и замороженном состоянии.

В результате исследований показано, что наибольший уровень выживаемости достигается при замораживании фагов со скоростью охлаждения 400 град/мин и составляет 61–76%. В других вариантах опыта титр вирусов снижался на 1 порядок. Наиболее выраженными криозащитными свойствами обладает глицерол. Выживаемость бактериофагов в данных условиях увеличивается на 8–17%.

Лиофилизация обеспечивает выживаемость исследуемых фагов на уровне 70%. В среднем количество жизнеспособных вирионов составляет 10^8 – 10^9 БОЕ/мл. Титр наиболее чувствительных фагов снижается на 1–2 порядка. При длительном хранении фагов (в течение 6 месяцев) установлено, что оптимальным для фагов Pf-1, Pf-2, Pf-3 является хранение при -70°C , а для фага Pf-4 – -20°C . Наибольшей устойчивостью при хранении в лиофилизированном состоянии обладают бактериофаги Pf-1, Pf-2 и Pf-4.

Таким образом, оптимальным режимом длительного хранения бактериофагов является замораживание со сверхбыстрой скоростью охлаждения с последующим хранением фагов Pf-1, Pf-2 и Pf-3 при температуре -70°C , а фага Pf-4 – при -20°C . Лиофилизация обеспечивает меньшую выживаемость фагов, но также может использоваться.

In industry and agriculture the interest to bacteriophages is stipulated by their application in controlling the populations of bacteria, making harm in industries and injuring the agricultural plants. Application of different biopreparations to control these bacteria is one of the most perspective methods of biological protection of plants from infection diseases. For successful developing of biopreparations it is necessary to maintain these microorganisms in viable state for a long time period. In this connection the developing of effective methods of bacteriophages' cryopreservation is important.

To study the survival rate of phages BV-50, BV-51, BV-52 and BV-53 (from the Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms at the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus) during cryopreservation there was studied the effect of different cooling rates (4, 100 and 400 deg/min) as well as the effect of cryoprotectants (10% glycerol and 5% dimethyl sulfoxide) on viability of bacteriophages. When investigating the effect of freeze-drying on viability of bacteriophages the lysates were mixed with skimmed milk in final concentration of 10% and placed into the ampoules in the amount of 200 ml. Lyophilization was performed by means of the Modulyo 4K freeze-dryer (Edwards, UK). The survival rate of bacterial viruses after long-term storage in frozen-dried and frozen states was studied.

As a result of the investigations it has been shown that the highest survival rate is achieved when freezing the phages with cooling rate of 400 deg/min and makes 61–76%. In other experimental variants the titre of viruses reduced by 1 order. Glycerol possesses the most manifested cryoprotective properties. Survival rate of bacteriophages under these conditions increases by 8–17%.

Freeze-drying provides the survival rate of the studied phages at the level of 70%. In average the number of viable virions makes 10^8 – 10^9 PFU/ml. The titre of most sensitive phages reduces by 1–2 orders. During long-term storage of phages (for 6 months) it has been established that the optimal for phages Pf-1, Pf-2, Pf-3 is the storage at -70°C and -20°C for the phage Pf-4. The highest survival after storage in frozen-dried state was found in bacteriophages Pf-1, Pf-2 and Pf-4.

Thus an optimal regimen of long-term storage of bacteriophages is freezing with ultra-rapid cooling rate with following storage of the phages Pf-1, Pf-2 and Pf-3 at -70°C and at -20°C for Pf-3 phage. Freeze-drying provides lower survival rate of phages, but also can be used.

Сравнение влияния мезенхимальных стволовых клеток и альфа ИФН на функционирование популяции опухолевых клеток линии MCF-7

Т.С. ГЕРГЕЛЮК, Е.М. ПЕРЕПЕЛИЦЫНА, М.В. СИДОРЕНКО

ГУ «Отделение биотехнических проблем диагностики

Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины», г. Киев

Comparison of Mesenchymal Stem Cells and α IFN Effects on Functioning of MCF-7 Cancer Cell Population

T.S. GERGELYUK, E.M. PEREPELTSYNA, M.V. SIDORENKO

Department of Biotechnical Problems of Diagnostics at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Практическое применение стволовых клеток (СК) и препаратов клеточного происхождения приобрело наибольшее распространение для решения задач иммунологии, онкологии, гематологии и трансфузиологии. При этом используются как пролиферативные и дифференциальные свойства СК, так и их секреторные возможности. В то же время существуют опасения относительно неоднозначной роли мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в опухолевом процессе. Поэтому данная работа посвящена исследованию посредников и механизмов влияния МСК на опухолевую популяцию клеток линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы).

Известно, что МСК продуцируют широкий спектр цитокинов и хемокинов, обеспечивая гуморальное микроокружение клеток. В частности МСК продуцируют фактор некроза опухолей (TNF- α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, альфа ИФН. Нами было проведено сравнение пролиферации, адгезии, выживаемости и антигенного профиля клеток аденокарциномы при культивировании со средой, кондиционированной МСК (К-средой) и альфа ИФН. Клетки линии MCF-7 были получены из Банка клеток и тканей человека и животных ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого, МСК предоставлены Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

MCF-7 культивировали 48 ч перед экспериментом и 48 ч в эксперименте, МСК – 4–6 пассажей. При этом К-среду отбирали при каждом пассаже, центрифугировали и надосадок использовали в последующем эксперименте. К одним образцам монослойной культуры клеток MCF-7 при смене среды добавляли К-среду в соотношении 1:1 со свежей средой. Другие образцы MCF-7 культивировали 48 ч с альфа ИФН в концентрации 10^4 МЕ/мл. Затем выживаемость опухолевых клеток исследовали с помощью МТТ-теста, интенсивность пролиферации и распределение на адгезивную и суспензионную фракции – путем подсчета с использованием трипанового синего. Экспрессию клетками MCF-7 эстрогенового рецептора, рецептора эпидермального фактора роста, цитокератинов А1/А2, 5, 6, 8, 18 и E-кадгерина определяли с помощью иммуноцитохимии.

В результате было выявлено, что К-среда тормозит пролиферативную активность MCF-7, повышает адгезивные свойства клеток, супрессирует способность к миграции, а также снижает экспрессию эстрогенового рецептора и рецептора эпидермального фактора роста. Экспрессия E-кадгерина и цитокератинов, наоборот, повышалась, что является позитивным признаком для опухолевых клеток эпителиального генеза. Аналогичные, но более выраженные тенденции влияния на опухолевую популяцию продемонстрировал альфа ИФН. Это позволяет предположить, что альфа ИФН является одним из посредников противоопухолевого влияния МСК.

The practical application of stem cells (SCs) and preparations of cell origin has become the most widely spread in solving the tasks of immunology, oncology, hematology and transfusiology. Herewith there are used both proliferative, differentiated properties of SCs and their secretory possibilities. At the same time, there are concerns about an ambiguous role of mesenchymal stem cells (MSCs) in tumour process. Therefore, this work is devoted to study the mediators and mechanisms of MSCs effect on MCF-7 cancer cell line population (breast adenocarcinoma).

The MSCs are known to produce a wide range of cytokines and chemokines, by providing a humoral micro-environment of cells. In particular, MSCs produce the tumor necrosis factor (TNF- α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, α IFN. We compared the proliferation, adhesion, survival and antigenic profile of adenocarcinoma cells when cultured with MSCs-conditioned medium (K-medium) and α IFN. The MCF-7 cells were received from the Human and Animal Cell and Tissue Bank at R.E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiology of National Academy of Sciences of Ukraine, the MSCs were kindly provided by the Department of Cryobiochemistry at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The MCF-7 were cultured within 48 hrs prior to and 48 hrs during the experiment, the MSCs were cultured for 4–6 passages. K-medium was collected at each passage, centrifuged and the supernatant was used in following experiment. During changing the culture medium into some samples of MCF-7 cell monolayer culture we added K-medium in 1:1 ratio with fresh medium. Other MCF-7 samples were cultured for 48 hrs with alpha interferon in 10^4 IU/ml concentration. Then the tumor cell survival was studied with the MTT-test, the proliferation intensity and distribution in adhesive and suspended fractions were examined by counting with trypan blue. The expression on MCF-7 cells of estrogen receptor, epidermal growth factor receptor, cytokeratins A1/A2, 5, 6, 8, 18, and E-cadherin was characterized using immunocytochemistry.

As a result, the K-medium was revealed to inhibit the MCF-7 proliferative activity, increase the adhesive properties of cells, to suppress the ability for migration, as well as to reduce the expression of estrogen receptor and that of epidermal growth factor. The expression of E-cadherin and cytokeratins, conversely, increased, that was a positive sign for tumor cells of epithelial origin. Similar but more pronounced tendencies of the effect on tumor population were demonstrated by α IFN. This enables to suggest α IFN to be one of the mediators of MSCs anti-tumoral effect.

Адаптивный ответ и окислительный стресс в криобиологии

И.П. Горячая¹, В.Д. Зинченко¹, И.В. Говор²

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

²НТК "Институт монокристаллов" НАН Украины, г. Харьков

Adaptive Response and Oxidative Stress in Cryobiology

I.P. GORYACHAYA¹, V.D. ZINCHENKO¹, I.V. GOVOR²

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

²Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Способность клеток или организмов противостоять действию повреждающих или токсичных агентов, если предварительно они были подвергнуты экспозиции при низких дозах этих агентов, – широко распространенное явление. Адаптивный потенциал, как сумма возможностей приспособления, заложена в геноме организма.

Нами были изучены эффекты перекрестной адаптации, возникающие при использовании озона как индуктора окислительного стресса, с целью использования их для повышения устойчивости биологических объектов к действию низких температур.

Исследования проводили на клетках *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *E. coli* и на эритроцитах быка и человека. Реакция исследуемых клеток на озон зависит от дозы озона и находится в полном соответствии с предложенной Г. Селье схемой общего адаптационного синдрома стресса: реакция «тревоги», «стадия устойчивости» и «стадия истощения». Мы использовали дозы озона, приводящие к реакциям тревоги и устойчивости.

Для подбора необходимой дозы озона нами был разработан хемилюминесцентный метод оценки степени отклонения параметров гомеостаза за пределы нормального диапазона под действием избыточного оксиданта.

Установлено, что низкие дозы озона способствуют повышению устойчивости эритроцитов к гипертоническому лизису. Мы объясняем наблюдаемые эффекты результатом перекрестной адаптации клеток в ответ на окислительный стресс, что приводит к повышению устойчивости мембран эритроцитов против разрушения в гипертонических условиях.

Клетки *S. cerevisiae*, обработанные после замораживания-отогрева озоном в дозе 0,088 мг/л ростовой среды, имеют показатели роста в 2 раза выше, чем в контрольных образцах, не обработанных озоном. По нашему мнению, обнаруженное повышение жизнеспособности криоконсервированных клеток при добавлении озона в ростовую среду после оттаивания может быть объяснено репарацией нелетальных криоповреждений, эффективность которой увеличивается в результате вызванной окислительным стрессом перекрестной адаптации.

В клетках *C. albicans*, обработанных озоном перед замораживанием, обнаружено повышение жизнеспособности по сравнению с контрольными (не обработанными озоном) клетками при дозах озона в диапазоне 0,16–0,64 мг/л. Следовательно, вызванный озоном окислительный стресс перед замораживанием клеток приводит их в состояние, «подготовленное» к действию факторов криоконсервирования.

Таким образом, экспериментально показано, что окислительный стресс, вызванный в клетках перед замораживанием или после замораживания-отогрева, может повышать эффективность криоконсервирования клеток.

Ability of cells or organisms to resist the effect of damage or toxic agents if preliminarily they were exposed with low doses of these agents is widely spread phenomenon. Adaptive potential as the sum of adaptation possibilities is determined by organism gene pool.

We have studied the effects of cross adaptation appearing when using ozone as inducer of oxidative stress to use them for increasing the resistance of biological objects to the effect of low temperatures.

The investigations were performed in *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *E. coli* cells, bovine and human erythrocytes. Response of the studied cells to ozone depends on its concentration and corresponds to the suggested by H. Selye scheme of general adaptation stress syndrome: 'alarm' reaction, 'resistance stage' and 'exhaustion stage'. We used the concentrations of ozone inducing the reactions of alarm and resistance.

To choose a necessary concentration of ozone we have developed a chemiluminescent method to estimate a degree of homeostasis parameters' deviation beyond the normal range under effect of excessive antioxidant.

We have established that low concentration of ozone contribute to the increase of erythrocyte resistance to hypertonic lysis. We explain the observed effects as a result of cell cross adaptation in response to oxidative stress, that leads to the rise of erythrocyte membrane resistance against the damage in hypertonic conditions.

S. cerevisiae cells treated after freeze-thawing with ozone in 0.088 mg/l concentration in growth medium have growth indices 2 times lower than in the control samples not treated with ozone. We believe the revealed increase of cryopreserved cells viability after thawing if growth medium was supplemented with ozone may be explained by reparation of non-lethal cryodamages. Its efficiency increases due to cross adaptation caused by oxidative stress.

In *C. albicans* cells treated with ozone prior to freezing was found the viability increase if compared to the control (not treated with ozone) cells in the case if ozone concentrations were within the range of 0.16–0.64 mg/l. Consequently, an oxidative stress induced by ozone prior to cell freezing gets them into a state 'prepared' to the effect of cryopreservation factors.

Thus we have experimentally shown that oxidative stress induced in cells prior to freezing or after freeze-thawing may increase the efficiency of cell cryopreservation.

**Разработка технологии получения диетических добавок
«Аминатон» и «Липотон» с использованием криогенных технологий**

В.Е. ГРЕБЕНЩИКОВ, Н.Ф. КУРИЛО, А.С. СНУРНИКОВ

ООО «ЗВЦ», г. Харьков

**Development of Technology for Producing Dietary Supplements
Aminaton and Lipoton using Cryogenic Technology**

V.E. GREBENSCHIKOV, N.F. KURILO, A.S. SNURNIKOV

Zooveterinary Center Ltd, Kharkov, Ukraine

Нашей задачей было создание доступных, рентабельных и в то же время максимально биологически полноценных диетических добавок с сохранением комплекса основных веществ плаценты – аминокислот, полисахаридов и микроэлементов. Эта задача была решена благодаря использованию криогенных технологий, которые позволяют остановить процессы деградации исходного сырья (замораживание жидким азотом). Процессы фракционирования гидрофильного и липофильного разделения компонентов ткани плаценты также удалось проводить в диапазоне температур от –80 до 30°C, что, несомненно, уменьшает повреждающее действие на структуры белков. Были сохранены такие компоненты плаценты, как липиды (триглицериды, фосфолипиды), микроэлементы (цинк, медь, марганец) и аминокислоты.

Доклинические исследования показали, что «Аминатон» (гидрофильная фракция плаценты) и «Липотон» (липофильная фракция плаценты) относятся к малотоксичным продуктам (IV класс токсичности), не обладают кумулятивными и аллергическими свойствами. «Аминатон» (ТУУ24.4-31293151-048:2006) и «Липотон» (ТУУ24.4-31293151-047:2006) представляют интерес как иммуномодуляторы, стимулирующие первичную иммунную реакцию (образование антителообразующих клеток) и клеточный иммунитет (тест реакции гиперчувствительности свободного типа, сенсibilизированный Т-лимфоцитами, которые участвуют в инактивации и разрушении чужеродных антигенов); обладают противовоспалительной и репаративной активностью на формирование антител у белых мышей, противоэвентным эффектом слизистой желудка у крыс, гепатопротекторным действием на алкогольной модели и гепатите, вызванном четыреххлористым углеродом печени крыс, ранозаживляющей активностью.

Клинические испытания капсул «Аминатона» и «Липотона» как диетических добавок проводились на кафедре эндокринологии Украинской медицинской стоматологической академии. Изучение диетических добавок «Аминатона» и «Липотона» в виде капсул для перорального приема показало, что их фармакологическое действие направлено на биокоррекцию обменных процессов, они могут применяться одновременно с медикаментозным лечением, так как нарушение обмена веществ в организме человека является первопричиной многих острых и хронических заболеваний: патологии органов мочеполовой сферы (воспаление придатков и яичников, простатиты); импотенции, фригидности; диабета; гипертонической болезни; снижение сопротивляемости организма инфекционным заболеваниям и физическим нагрузкам, в том числе и в послеоперационный период.

Our task was to design affordable, cost-effective and simultaneously the most biologically valuable dietary supplements, i.e. preserving a complex of main placental substances: amino acids, polysaccharides and minerals. This problem was solved by the use of cryogenic technologies, enabling the ceasing of initial raw material degradation (freezing with liquid nitrogen). Fractionation processes of hydrophilic and lipophilic separation of the components of placental tissue was also managed to be performed within the temperature range from –80 to 30°C, which obviously reduced the damaging effects on protein structure. Following placental substances were preserved: lipids (triglycerides, phospholipids), microelements (zinc, copper, manganese) and amino acids.

Preclinical studies have shown that Aminaton being hydrophilic placental fraction and Lipoton being lipophilic placental fraction are low-toxic products (4th toxicity class) do not have a cumulative and allergic properties. Aminaton (TS24.4-31293151-048:2006) and Lipoton (TS24.4-31293151-047:2006) are of interest as immune modulating agents to stimulate the primary immune response (appearance of antibody-forming cells) and cellular immunity (free type hypersensitivity test sensitized with T lymphocytes, which are involved in the inactivation and destruction of foreign antigens) have anti-inflammatory and reparative activity for the formation of antibodies in white mice, anti-ulcer effect of the gastric mucosa in rats, hepatoprotective action in alcohol and hepatitis model induced by carbon tetrachloride in rat's liver; wound healing activity.

Clinical trials of capsules Aminaton and Lipoton as dietary supplements were conducted at the Department of Endocrinology, the Ukrainian Medical Dental Academy. The study of dietary supplements and Aminaton and Lipoton as capsules for oral administration showed that their pharmacological action is directed to biocorrection of metabolism and may be recommended along with medication regimen as a metabolic disorder in human body is the primary cause of many acute and chronic diseases: urogenital pathology (inflammation of the ovaries and, prostatitis); impotence, frigidity; diabetes; hypertension; organism reduced resistance to infectious diseases and physical activity, including those during postoperative period.

Влияние низких температур на биологическую активность и некоторые биохимические характеристики фолликулярной жидкости яичника человека

В.И. ГРИШЕНКО, Е.А. ЯКОВЛЕВА, Н.Н. ЧУБ, В.В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low Temperatures on Biological Activity and Some Biochemical Characteristics of Human Ovarian Follicular Fluid

V.I. GRISCHENKO, E.A. YAKOVLEVA, N.N. CHUB, V.V. CHEREPANOV

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

В последнее время в связи с развитием метода оплодотворения *in vitro* (IVF) стало возможным получение фолликулярной жидкости (ФЖ) яичника человека для исследования и применения в биотехнологии. Известно, что биологические свойства ФЖ могут зависеть от стимуляции суперовуляции, степени зрелости фолликулов и других факторов.

Цель работы – изучение влияния низких температур на биологическую активность и некоторые биохимические характеристики ФЖ яичника человека, выделенной из фолликулов различного диаметра.

Фолликулярную жидкость аспирировали из малых (диаметром 13–15 мм) и больших (16–22 мм) фолликулов у женщин во время проведения программы IVF. После выделения ооцит-кумуляного комплекса ФЖ центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин для осаждения клеток крови и дебриса, расфасовывали по 1 мл в пластиковые ампулы, герметизировали и криоконсервировали погружением в жидкий азот (300–400 град/мин). Ампулы размораживали на водяной бане при температуре 40°C. Методом гель-хроматографии изучали белковый состав ФЖ. Состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса ФЖ яичника человека определяли по содержанию гидроперекиси липидов методом Асакава. Содержание стероидных гормонов в ФЖ исследовали модифицированным методом твердофазного иммуноферментного анализа.

В результате исследования было показано, что быстрый способ охлаждения и хранение в течение одного года при –196°C статистически достоверно не влияют на содержание стероидных гормонов в ФЖ и состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в ФЖ. Вместе с тем было установлено, что размер фолликулов, из которых выделяли ФЖ, достоверно влияет на состав некоторых белков, гормонов и цитокинов.

Деконсервированная 10%-я ФЖ, введенная в среду инкубации спермиев, повышает кинетические свойства спермиев человека на 10–40%, в зависимости от нормы или астенозооспермии.

Таким образом, технологически простой и эффективный способ криоконсервирования позволяет сохранить биологическую активность ФЖ и успешно использовать ее в клинической практике и биотехнологии.

Recently, with the development of the method of fertilization *in vitro* (IVF) the obtaining of human ovarian follicular fluid (FF) has become possible for studying and application in biotechnology. It is known that biological properties of FF may depend on stimulation of superovulation, follicle maturity rate and other factors.

The research aim was to study the effect of low temperatures on biological activity and some biochemical characteristics of human ovarian FF isolated from the follicles of different diameters.

Follicular fluid was aspirated from small (of 13–15 mm diameter) and large (16–22 mm) follicles in women during IVF. Once isolated, the oocyte-cumulus complexes the FF was centrifuged at 1500 g for 20 min to pellet the blood cells and debris, packed into 1 ml plastic vials, sealed and cryopreserved by immersion into liquid nitrogen (300–400 deg/min). Ampoules were thawed on water bath at 40°C. The protein composition of FF was studied by gel chromatography. State of prooxidant-antioxidant balance of human ovarian FF was examined by the content of lipid hydroperoxide by Asakawa method. The content of steroid hormones in FF was investigated with modified method of solid-phase enzyme immunoassay.

The study showed that the rapid cooling and storage for one year at –196°C did not significantly affect the content of steroid hormones in FF and the state of prooxidant-antioxidant balance in the FF. In addition, it has been found that the size of the follicles from which the FF was isolated significantly and statistically affect the composition of some proteins, hormones and cytokines.

Frozen-thawed 10% FF introduced into incubation medium of spermatozoa increases kinetic properties of human sperm by 10–40%, depending on the rate or asthenozoospermia.

Thus technologically simple and effective way of cryopreservation allows the preservation of biological activity of FF and its successful use in clinical practice and biotechnology.

Перспективы использования низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из сердец новорожденных поросят для регенерации миокарда

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, Е.С. АБАКУМОВА, Н.Н. МОИСЕЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Perspectives of Application of Low-Molecular Fraction (up to 5 kDa) from Hearts of Newborn Piglets for Myocardial Regeneration

A.K. GULEVSKY, E.S. ABAKUMOVA, N.N. MOISEYVA

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

В клинической терапии инфаркта миокарда (ИМ) перспективным направлением стала разработка кардиопротекторных и биостимулирующих препаратов, действие которых направлено на поддержание оптимального режима биоэнергетических процессов в условиях гипоксии и ишемии.

Целью работы было выделение низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из сердец новорожденных поросят (ФСНП) на основе криотехнологий и изучение ее влияния на процесс регенерации миокарда.

Фракцию выделяли из сердец новорожденных поросят после криодеструкции и гомогенизации ткани с последующей ультрафильтрацией с помощью мембранного модуля «Sartorius» (Германия). После выделения фракцию лиофилизировали и хранили при -80°C . Репаративное действие ФСНП изучали на модели острого мелкоочагового ИМ у крыс, который моделировали введением эpineфрина. Животным с экспериментальным ИМ на протяжении 7 суток вводили: 1-й группе (контроль) – физиологический раствор; 2-й – ФСНП; 3-я группа состояла из интактных крыс. На 1-е, 2-е и 7-е сутки исследовали гистологические показатели, данные ЭКГ, биохимические маркеры ИМ в сыворотке крови – активность АсАТ, ЛДГ и содержание ТБК-реактивных продуктов.

Мелкоочаговый ИМ после введения эpineфрина идентифицировали по элевации ST-сегмента и T-зубца на ЭКГ. На 1-е сутки после формирования ИМ активность АсАТ повышалась в 5,8 раз по сравнению с нормой. На 7-е сутки после применения ФСНП отмечалось достоверное ($P < 0,05$) снижение показателя относительно контроля. Повышенная вследствие ИМ активность ЛДГ на 7-е сутки после введения ФСНП снижалась в 1,4 раза по сравнению с контролем. После применения ФСНП достоверное ($P < 0,05$) снижение по сравнению с контролем (повышенного вследствие ИМ) содержания ТБК-реактивных продуктов отмечалось на протяжении всего эксперимента. При гистологическом исследовании миокарда крыс с экспериментальным ИМ наблюдались изменения, которые характеризовались острыми расстройствами кровообращения и мелкоочаговыми повреждениями кардиомиоцитов. После применения ФСНП на 7-е сутки, в отличие от контроля, отмечались восстановление процессов кровообращения в зонах ишемии и образование грануляционной ткани.

Таким образом, низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) из сердец новорожденных поросят обладает репаративным действием и является перспективной для разработки кардиопротекторного препарата на ее основе.

Development of cardioprotective and bio-stimulating preparations targeted to maintain optimal regimen of bioenergetic processes under hypoxia and ischemia is a perspective direction in clinical therapy of myocardial infarction (MI).

The research aim is to derive a low molecular fraction (up to 5 kDa) from hearts of newborn piglets (FHNP) based on cryotechnologies and the studying of its effect on myocardium regeneration.

Fraction was derived from the hearts of newborn piglets after cryodestruction and homogenization of tissue with following ultrafiltration with membrane module Sartorius (Germany). After derivation the fraction was lyophilized and stored at -80°C . Reparative effect of FHNP was studied in rats in the model of acute small focal MI, simulated with epinephrine administration. The animals with experimental MI within 7 days were injected: the first group (control) – physiological solution, the second – FHNP, the third group consisted of intact rats. To the 1st, 2nd and 7th days there were studied histological indices, ECG values, biochemical markers of MI in blood serum: the activity of AsAT, LDH and content of TBA-reactive products.

Small focal infarction after administration of epinephrine was identified by ST-segment elevation and T-wave in ECG. To the 1st day after formation of MI AsAT activity increased by 5.8 times if compared with the norm. To the 7th day after application of FHNP there was observed a significant reduction ($P < 0.05$) of index relative to the control. To the 7th day after administration of FHNP the increased LDH activity due to MI decreased by 1.4 times if compared to the control. After the use of FHNP during the whole experiment there was observed a significant reduction ($P < 0.05$) of TBA-reactive products content if compared with the control (due to increased MI). During histological examination of rat myocardium with experimental MI there were observed the changes, characterized by acute circulatory disorders and small focal lesions of cardiomyocytes. After the use of FHNP to the 7th day contrary to the control the restoration of circulation processes in ischemia areas and formation of granulation tissue was observed.

Thus, the low molecular fraction (up to 5 kDa) from hearts of newborn piglets renders a reparative effect and is perspective for development of cardioprotective preparation on its base.

Влияние низкомолекулярной фракции, полученной из криогемолизата кордовой крови крупного рогатого скота, на структурно-функциональные свойства клеточных культур различного происхождения и лейкоцитов донорской крови *in vitro*

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, А.В. ТРИФОНОВА, О.Л. ГОРИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low Molecular Fraction Derived from Cryohemolysate of Bovine Cord Blood on Structural and Functional Properties of Different Cell Cultures and Donor Blood Leukocytes *In Vitro*

A.K. GULEVSKY, A.V. TRIFONOVA, O.L. GORINA

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

Снижение функциональной активности клеток после низкотемпературного хранения является неблагоприятным фактором для их последующего использования в медицине и биотехнологии. Было показано, что низкомолекулярная фракция кордовой крови крупного рогатого скота *in vivo* обладает выраженным репаративным и иммуномодулирующим действием. Это явилось предпосылкой для изучения ее действия *in vitro* с целью восстановления функциональной активности клеток различного происхождения после действия низких температур.

Фракцию кордовой крови (ФКК) (до 5 кДа) получали из криогемолизата цельной кордовой крови крупного рогатого скота путем тангенциальной мембранной ультрафильтрации. Ее влияние на функциональное состояние культур клеток оценивали по показателям адгезии, пролиферации и митотического режима, на лейкоциты донорской крови человека – по показателям фагоцитоза.

При изучении влияния ФКК на клеточные культуры использовали фибробласты человека и перевиваемой линий ВНК-21 clone 13/04. Показано, что ФКК как до, так и после криоконсервирования стимулирует пролиферацию клеточных культур, активируя митотическую активность клеток и не оказывает влияния на количество патологических делений клеток. ФКК не оказывает влияния на способность фибробластов человека прикрепляться к подложке как до, так и после криоконсервирования, но значительно повышает скорость их расплывания. В деконсервированной линии ВНК-21 clone 13/04 ФКК способствует сохранению количества клеток, способных прикрепляться к подложке, на уровне нативной культуры и нормализует их морфологию.

При исследовании влияния ФКК на лейкоциты донорской крови человека установлено, что она оказывает стимулирующий дозозависимый эффект на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов. В частности, при исследовании поглотительной и переваривающей функции фагоцитов после инкубации концентрата лейкоцитов с ФКК было отмечено достоверное увеличение фагоцитарного числа и коэффициента завершенности фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов по сравнению с контролем. Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов после гипотермического хранения и криоконсервирования также выявило стимулирующее действие ФКК на их поглотительную и переваривающую способности.

Таким образом, показана перспективность использования фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота для восстановления функциональной активности клеток как различных клеточных культур, так и донорской крови после гипотермического или низкотемпературного хранения.

Reduction of cell functional activity after low-temperature storage is an unfavorable factor for their following use in medicine and biotechnology. It was shown that low molecular fraction of bovine cord blood (FBCB) *in vivo* was of strong reparative and immunomodulating effect. It was a supposition for study of its effect *in vitro* to recover cell functional activity of different origin after effect of low temperatures.

Fraction (up to 5 kDa) was derived from cryohemolysate of bovine whole cord blood with tangential membrane ultrafiltration. Its effect on functional state of cell cultures was evaluated by adhesion, proliferation and mitotic regimen indices, on human donor blood leukocytes it was done by phagocytosis parameters.

When studying the FCB effect on cell cultures there were used human fibroblasts and passaged lines BHK-21 clone 13/04 ones. It is shown that FBCB both prior to and after cryopreservation stimulates proliferation of cell cultures, activating the cell mitosis activity, and does not affect the number of pathological cell divisions. FCB does not affect the ability of human fibroblasts to attach to a substrate both prior to and after cryopreservation, but significantly increases their flattening rate. In frozen-thawed line BHK-21 the clone 13/04 FCB supports preservation of cell number capable of attachment to the substrate at a level of native culture and normalizes their morphology.

When studying the effect of FBCB on human blood leukocytes it was revealed that this was of dose-dependent stimulating effect on phagocytic activity indices of neutrophils and monocytes. Particularly, when studying the digestive and absorptive functions of phagocytes after incubation of leukocyte concentration with FBCB, it was observed a significant increase of phagocytic number and phagocytosis completeness coefficient of neutrophils and monocytes if compared with the control. The study of phagocytic activity of neutrophils and monocytes after hypothermic storage and cryopreservation also revealed a stimulating effect of FBCB on their absorptive and digestive capacity.

Thus, it was shown a perspective use of fraction (up to 5 kDa) of bovine cord blood to recover functional activity of cells, both of different cell cultures and donor blood after hypothermic or low temperature storage.

Определение температурных интервалов фазовых превращений в криозащитном растворе для разработки единого протокола замораживания-оттаивания биообъектов

Т.М. ГУРИНА, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Determining the Temperature Ranges of Phase Transitions in Cryoprotective Solution for Development of Unified Protocol of Biological Objects' Freeze-Thawing

T.M. GURINA, A.L. KIRILYUK

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

Криоконсервирование – надежный способ долгосрочного сохранения биоматериала. При разработке протоколов замораживания-оттаивания, как правило, основное внимание уделяется режиму охлаждения в то время, как скорости охлаждения-нагрева находятся в тесной взаимосвязи и взаимозависимости. В практической криобиологии в последнее время все чаще используются контролируемые скорости на этапе охлаждения, однако оттаивание происходит традиционным способом – на водяной бане.

Цель данной работы – разработать оригинальную методику определения температурных интервалов использования контролируемых скоростей как на этапе охлаждения, так и на этапе нагрева для создания единого протокола замораживания-оттаивания, обеспечивающего максимальную сохранность биообъекта после криоконсервирования. При разработке единого протокола замораживания-оттаивания перспективным является подход, при котором изменение скоростей охлаждения-нагрева происходит в температурных интервалах, связанных с фазовыми и структурными преобразованиями в криозащитных средах сложного состава. Предельные значения этих температурных интервалов определяли методом термопластической деформации, который является разновидностью термомеханического анализа.

Для выявления вклада фазовых превращений, соответствующих каждому компоненту криозащитной среды сложного состава, исследовали экспериментальные термопластические кривые для дистиллированной воды, физиологического раствора, культуральных сред и соответствующих растворов криопротекторов. Сформулированы общие принципы выбора внешнего деформирующего напряжения для определения предельных значений рассматриваемых температурных интервалов для различных криозащитных сред, а также принцип выбора конкретного значения скорости охлаждения и нагрева в температурных интервалах, соответствующих следующим фазовым преобразованиям: кристаллизация (плавления) основной массы льда, кристаллизация (плавления) смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, кристаллизация (плавления) эвтектики растворителя на основе культуральной среды, а также рекристаллизация перед соответствующими процессами плавления на этапе нагрева.

Методика разработки единого протокола замораживания-оттаивания с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева имеет универсальный характер и применима при криоконсервировании биообъектов с криозащитными средами сложного состава. Единый протокол может служить основой для разработки программного обеспечения для замораживателей с целью внедрения методики замораживания-оттаивания с контролируемыми скоростями в программных замораживателях.

Cryopreservation is a reliable way for long time preservation of biological material. When designing freeze-thawing protocols as a rule the great attention is paid only to cooling regimen while cooling and warming rates are closely interrelated and dependent. Nowadays in cryobiological practice the controlled cooling rates is mostly used, however thawing is still done with traditional water bath.

The research aim was to develop an original method of temperature ranges determination using controlled rates both at cooling and warming stages to create an unified freeze-thawing protocol providing a maximum preservation of biological object after cryopreservation. During development of unified freeze-thawing protocol the approach, in which a change of cooling-warming rates occurs within temperature ranges associated with phase and structural changes in composite cryoprotective media is perspective. Limit values of these temperature ranges were determined by thermoplastic deformation method, a type of thermomechanical analysis.

To identify the contribution of phase transitions corresponding to each component of composite cryoprotective medium, experimental thermoplastic curves for distilled water, physiological solution, cultural media, and appropriate cryoprotective solutions were studied. The general principles of external deforming stress selection to determine the limits of observed temperature ranges for different cryoprotective media, as well as the principle of choosing the specific value of cooling and warming rates within the temperature ranges appropriate to phase transitions such as: crystallization (melting) of the bulk of ice, crystallization (melting) of eutectic concentration mixture of cryoprotective solution, crystallization (melting) of culture medium solvent eutectics, as well as recrystallization prior to corresponding processes of melting during warming.

Method for development of unified freeze-thawing protocol with controlled cooling-warming rates is universal and applicable for cryopreservation of biological objects in composite cryoprotective media. Common protocol can serve as the basis for development of a software for freezers to implement the methods of freeze-thawing with controlled rates using programmable freezers.

Флуктуация содержания кальция во внутриклеточных депо нативных и девитрифицированных ооцитов свиней

В.Ю. ДЕНИСЕНКО, Т.И. КУЗЬМИНА

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин

Calcium Fluctuation in Intracellular Depots of Intact and Devitrified Pig Oocytes

V.YU. DENISENKO, T.I. KUZMINA

All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding of the Russian Academy of Agricultural Sciences, St.-Petersburg, Pushkin, Russia

Создание криобанка донорских ооцитов млекопитающих позволит интенсифицировать внедрение клеточных репродуктивных технологий в биомедицину и животноводство. Флуктуация содержания кальция – индикатор функционального состояния ооцитов животных при созревании *in vitro* [Kuzmina *et al.*, 2007]. Цель настоящей работы – на основе ингибиторного анализа исследовать освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ВД) нативных и девитрифицированных ооцитов при воздействии соматотропина (СТГ) и ГТФ. Ооциты, выделенные из яичников на стадии фолликулярного роста, витрифицировали в соответствии с методикой, описанной ранее [Денисенко, Кузьмина, 2012]. Концентрацию кальция во ВД измеряли с помощью хлортетрациклина (ХТЦ). Ооциты инкубировали 5 мин при 37°C в среде Дюльбекко, содержащей $40\ \mu\text{M}$ ХТЦ. Флуоресценцию комплекса Ca^{2+} -ХТЦ-мембрана возбуждали ртутной лампой ДРШ-250 М. Для выделения возбуждающей флуоресценцию длины волны с максимумом на $390\ \text{nm}$ применяли светофильтры СС и СЗС, флуоресценцию регистрировали на длине волны $520\ \text{nm}$. Исходную популяцию ооцитов оценивали с помощью витального красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB, «Sigma») и в соответствии с окраской делили на две группы: завершившие фазу роста (окрашенная ооплазма) и растущие ооциты (отсутствие окраски). В работе использовали завершившие фазу роста ооциты, их витрифицировали и после окрашивания вновь инкубировали с BCB. Ооплазма девитрифицированных завершивших стадию роста ооцитов после экспозиции с BCB оставалась окрашенной. В нативных ооцитах при совместном действии СТГ в концентрации $10\ \text{ng/ml}$ и ГТФ в концентрации $10\ \mu\text{M}$ фиксировали переход Ca^{2+} между различными ВД, о чем свидетельствовало дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД при совместном действии СТГ и ГТФ. Освобождение Ca^{2+} из ВД вызывает рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и обеспечивает прохождение мейоза [Santella *et al.*, 1999]. Добавление ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола ($10\ \mu\text{M}$) отменяло дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД и соответственно перемещение Ca^{2+} между ВД, стимулированное совместным действием СТГ и ГТФ. В ооцитах после девитрификации при совместном действии СТГ и ГТФ также наблюдали дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД ооцитов, эффект ингибировался нокодазолом. Таким образом, в ооцитах витрификация не оказывает влияния на перемещение Ca^{2+} между различными ВД, стимулированное совместным действием СТГ и ГТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

Establishing a cryobank for mammalian donor's oocytes will allow to intensify the introduction of cell reproductive technologies in biomedicine and animal breeding. Calcium fluctuation is an indicator of functional state of animal oocytes during maturation *in vitro* [Kuzmina *et al.*, 2007]. The research aim was to study Ca^{2+} release out of intracellular depots (IDs) of native and devitrified oocytes under effect of somatotropin (STH) and GTF based on inhibitory analysis. Oocytes isolated from ovaries at follicular growth stage were vitrified according to the previously described method [Denisenko and Kuzmina, 2012]. Calcium concentration in IDs was measured with chlortetracycline (ChTC). Oocytes were incubated for 5 min at 37°C in Dulbecco's medium containing $40\ \mu\text{M}$ of ChTC. Fluorescence of Ca^{2+} -ChTC-membrane complex was excited with DRSh-250 M mercury lamp. There were used light filters SS and ESS to detect exciting fluorescence wavelength maximum at $390\ \text{nm}$. Fluorescence was recorded at wavelength of $520\ \text{nm}$. Initial population of oocytes was assessed with vital dye brilliant crystal blue (BCB, Sigma), and according with the staining it was divided into two groups: completed growth phase (stained ooplasm) and growing oocytes (without staining). Completed growth phase oocytes were used in the research, vitrified and incubated again with BCB after their staining. Ooplasm of devitrified completed growth stage oocytes after exposure with BCB remained stained. In native oocytes at a combined action of $10\ \text{ng/ml}$ STH and $10\ \mu\text{M}$ GTF Ca^{2+} transition among different IDs was revealed, as evidenced by additional Ca^{2+} release out of IDs at combined action of STH and GTF. Release of Ca^{2+} out of IDs causes a rise of Ca^{2+} concentrations in cytoplasm and provides meiosis [Santella *et al.*, 1999]. Addition of polymerization inhibitor of nocodazole microtubules ($10\ \mu\text{M}$) avoided additional release of Ca^{2+} out of IDs and, accordingly, Ca^{2+} transition in IDs, stimulated by combined action of STH and GTF. There was also observed an additional Ca^{2+} release out of IDs in oocytes after devitrification at combined effect of STH and GTF. Effect was inhibited by nocodazole. Thus, vitrification in oocytes does not affect the Ca^{2+} transfer between different IDs, stimulated by combined action of STH and GTF.

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project ofi-a 10-04-00389).

Использование низкотемпературного фактора в лечении воспалительных заболеваний ЛОР-органов

А.С. ЖУРАВЛЕВ, М.И. ЯШЕНКО, М.В. КАЛАШНИК

Харьковский национальный медицинский университет

Use of Low Temperature Factor in Treatment of Inflammatory Diseases of Otorhinolaryngology Organs

A.S. ZHURAVLYOV, M.I. YASHCHENKO, M.V. KALASHNIK

Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine

Современное состояние научно-технического прогресса открывает широкие возможности для внедрения в практическое здравоохранение новых низкотемпературных методов лечения. В ЛОР-клинике Харьковского национального медицинского университета холод используется для лечения различных форм ринитов (257 человека), риносинуситов (132 человека), тонзиллитов (179 человек), фарингитов (352 человека), новообразований ЛОР-органов (121 человек). Для повышения эффективности лечения ЛОР-заболеваний совершенствуется криохирургическая техника, которая адаптирована к определенным условиям проведения оперативных вмешательств. В частности, это рабочие наконечники и конструкции аппаратов, которые позволяют четко и быстро регулировать процесс замораживания-отогрева (Патент № 49074 от 12.04.2010; Патент № 65345 от 12.12.2011).

Нами предложены устройство и метод внутриспаузного криораспыления, который с успехом используется для лечения больных с гнойными процессами в околоносовых пазухах, что ранее считалось прямым противопоказанием для использования холода.

В настоящее время для лечения хронических риносинуситов мы успешно комбинируем низкотемпературный фактор (как локальное воздействие) с методами лечения, влияющими на гомеостаз организма в целом. Для этого мы используем внутривенное ультрафиолетовое и лазерное облучение крови и другие. Такое сочетание холодого метода с лечебными процедурами, оказывающими иммуномодулирующее воздействие на организм, оказалось наиболее эффективным (Патент №10071 от 30.09.1996) и поэтому рекомендуется для практического здравоохранения.

Для ускорения заживления ран и улучшения косметического эффекта использовали криоконсервированные препараты: «Платекс-хориальный», «Платекс-плацентарный» (МНЦ КиК НАН, НАМН и МЗ Украины), которые существенно стимулируют репаративные процессы и сокращают сроки лечения.

The current state of scientific and technical progress opens wide range of opportunities for introduction into practical health care of novel low temperature methods of treatment. In the otorhinolaryngology clinic of the Kharkiv National Medical University cold is used for treatment of various forms of rhinites (257 people), rhinosinusites (132 people), tonsillites (179 people), pharyngites (352 people), neoplasms of otorhinolaryngology organs (121 people). Cryosurgical equipment adapted for certain conditions to carry out surgeries is modified to increase the efficiency of treatment of the otorhinolaryngology diseases. In particular, there are operating adapters and constructs of devices which allow to regulate freeze-thawing process (Patent of Ukraine Nr. 49074 of 12.04.2010; Patent of Ukraine Nr. 65345 of 12.12.2011) accurately and quickly.

We have proposed the device and method of cryospraying inside maxillary sinus cavity which is successfully used for treatment of patients with purulent processes in perirhinal cavities that was previously considered as a direct contraindication for cold usage.

Nowadays we successfully combine low temperature factor (as local influence) with methods of treatment affecting organism homeostasis of in a whole for treatment chronic rhinosinusites. For this purpose we use intravenous ultra-violet and laser radiation of blood and others. Such a combination of cooling method with medical procedures having immunomodulatory effect on organism, appeared to be the most effective (Patent of Ukraine Nr. 10071 of 30.09.1996) and consequently is recommended for practical health care.

Accelerated healing of wounds and improvement of cosmetic effect were used for cryopreserved preparations: Platex-Chorional, Platex-Placental (Interdepartmental Centre of Cryobiology and Cryomedicine, Ukraine) essentially stimulating reparative processes and reducing the treatment terms.

Збереження чоловічих гаметофітів орхідних при низьких критичних температурах

Р.В. ІВАННІКОВ

Національний ботанічний сад НАН України, м. Київ

Preservation of Orchid Male Gametophytes at Critical Low Temperatures

R.V. IVANNIKOV

National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Принципова можливість тривалого збереження фертильності чоловічих гаметофітів тропічних та субтропічних орхідних при температурах нижчих за 0°C була нами показана у попередніх роботах. З літературних джерел відомі нечисельні публікації відносно криозбереження пилку деяких видів орхідних [Carvalho V.S., 2006; Wagner A., 2008]. Автори наводять складну, багатоетапну процедуру проводки полінаріїв через серію розчинів кріопротекторів, яка є коштовною і не завжди зручною у практичній роботі. В роботах, які на сьогодні опубліковані, здебільшого йдеться про пилок цінних у комерційному відношенні видів та їх гібридів, натомість представникам рідкісних та зникаючих видів увага практично не приділяється.

Відповідно до цього метою нашої роботи було відпрацювання протоколу процедури тривалого збереження пилку орхідних, який би суміщав у собі позитивні сторони кріотехнологій та відносну простоту технік низькотемпературного зберігання полінаріїв орхідних. Як об'єкти для даного етапу дослідження нами були обрані рослини *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe і *Phalaenopsis sp.* з колекції НБС ім. М.М. Гришка НАН України. Рослини *P. appletonianum* в природі літофіти, а більшість представників роду *Phalaenopsis* Blume – типові епіфіти.

Зібраний пилок поміщали у спеціальні віалі для заморожування на целулойдні стрічки. Пилок кожного з видів був розділений на контрольну та експериментальну групи. Заморожування полінаріїв проводили у рідкому азоті шляхом прямого занурення віалей у судину Дьюара. Експозиція 7 хв. Після цього віалі поміщали у термос на льодяну баню, який попередньо витримували добу в холодильній камері (–18°C). В термосі зразки знаходилися 1 годину (під час транспортування), після чого віалі розташовували в холодильній камері (–18°C). Контрольні партії полінаріїв після розморожування перевірялися на здатність до запилення. Експериментальну партію зберігали в холодильнику і щорічно, в сезон квітання, перевіряли полінарії на фертильність. При зберіганні у віалі із полінаріями завжди додавали гранули гідрофільного сорбенту (силікагель). Отримане в результаті експерименту насіння мало нормальну морфологію і було висіяне на живильні середовища MS. Розвиток сіянців представників дослідних видів за фенологічними та морфологічними параметрами не відрізнявся від норми.

Таким чином, нами вперше була розроблена проста й ефективна процедура тривалого зберігання чоловічих гаметофітів тропікогенних орхідних, яку можна використовувати як для наземних видів, так і для типових епіфітів. Встановлено, що, застосовуючи дану методику, можна зберігати фертильність полінаріїв орхідних не менш двох років.

Principle possibility of long-term preservation of fertile male gametophytes of tropical and subtropical orchids at the temperatures below 0°C has been shown by us previously. There are known a few publications as for cryopreservation of pollen of some orchids [Carvalho V.S., 2006; Wagner A. 2008]. The authors present a complicated, multi-stage procedure of pollinaria exposure in the series of cryoprotectant solutions, which is very expensive and not always suitable in practice. In the reports which have been already published mostly the pollen of commercially valuable species and their hybrids is described, but the attention has not been virtually paid to the representatives of rare and endangered species.

Therefore our research aim was to develop the protocol of long-term preservation of orchid pollen, which would combine the positive issues of cryotechnologies and relatively simple techniques of low temperature preservation of orchid pollinaria. We have chosen the plants *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe and *Phalaenopsis sp.* from the collection of M.M. Gryshko National Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine. Plants *P. appletonianum* in nature are lithophytes, and the majority of the representatives of *Phalaenopsis* Blume are typical epiphytes.

The collected pollen was placed into special freezing vials and to celluloid bands. The pollen from each species was divided into control and experimental groups. Pollinaria were frozen in liquid nitrogen by a direct plunging of vials into Dewar vessel. The exposure time was 7 min. Afterwards the vials were placed into thermal vessel on ice bath, which was preliminarily kept in freezing chamber (–18°C). In thermal vessel the samples were kept during 1 hr (during transportation) afterwards the vials were located in freezing chamber (–18°C). Control batch of pollinaria after thawing was checked for pollination ability. Experimental batch was stored in refrigerator and annually in blossom season the pollinaria were checked for the fertility. When storing in a vial with pollinaria the granules of hydrophilic adsorbing agent (silica gel) was always added. The obtained as a result of experiment seeds were of normal morphology and was seeded onto nutrient medium MS. The developing seedlings of the representatives of species on their phenological and morphological parameters did not differ from the norm.

Thus we have for the first time developed a simple and effective procedure of long-term preservation of tropicogenic orchid male gametophytes which may be used both for land species and typical epiphytes. It has been established that using this method the fertility of orchid's pollinaria can be preserved up to 2 years.

Подбор эффективных протекторных сред для криоконсервирования мицелиальных грибов

А.В. КАНТЕРОВА¹, И.С. ВАЖИНСКАЯ¹, Г.И. НОВИК¹, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

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

Selection of Efficient Protective Media for Cryopreservation of Mycelial Fungi

A.V. KANTEROVA¹, I.S. VAZHINSKAYA¹, G.I. NOVIK¹, I.P. VYSEKANTSEV²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

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

Криоконсервирование мицелиальных грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces*, *Rhizoctonia*, проводили в жидком азоте. В качестве криопротекторов использовали ДМСО, 5% об.; глицерол, 10% об.; лактозу, 10%; 10%-е обезжиренное молоко. Перед замораживанием культуры выращивали 14 суток на сусло-агаре, затем образцы выросшего мицелия помещали в криопробирки с протектором, выдерживали 20 мин и быстро погружали в жидкий азот. После хранения в течение 3-х суток образцы размораживали при 37°C и определяли процент выживаемости грибов. Культуры родов *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces* сохраняли 100% выживаемость при использовании в качестве протекторов ДМСО, глицерола и обезжиренного молока и ~90% в случае лактозы. Без использования протекторных сред выживаемость составляла не более 80%.

Такой результат можно объяснить тем, что к родам *Laetiporus* и *Inonotus* относятся афиллофорные дереворазрушающие трутовые грибы, и в лабораторных условиях, как правило, приходится работать с их мицелием, расположенным в апикальной зоне колоний, в которой гифы тонкостенные и менее устойчивые к воздействию стрессовых факторов. Относительно представителей примитивных форм гимноасковых грибов *Paecilomyces* следует отметить, что гифы мицелия на всей поверхности колоний тонкие и легко травмируются. Таким образом, криоконсервирование грибов этих таксономических групп без протекторных сред нецелесообразно. То, что при использовании глицерола, обезжиренного молока и ДМСО эти культуры полностью сохраняли выживаемость, можно объяснить максимальной доступностью их мицелиальных клеток для криопротекторов. Микофильные несовершенные грибы рода *Rhizoctonia* имели низкие показатели выживаемости без использования протекторных сред, хотя считается, что грибы этого рода отличаются высокой криоустойчивостью. Возможно, за 14 суток выращивания мицелия не наступала достаточно зрелая стадия его развития, и время культивирования следовало увеличить. Процент выживаемости, полученные для грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* при использовании всех вариантов криопротекторов, имели более высокие показатели, чем без них.

В результате исследований можно сделать вывод, что все проверенные нами криопротекторы оказались достаточно эффективными.

Cryopreservation of mycelial fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces*, *Rhizoctonia* was performed in liquid nitrogen. We used DMSO, 5% v/v; glycerol, 10% v/v; lactose, 10%; 10% skimmed milk in water as cryoprotectants. Before freezing the cultures were grown for 14 days on wort agar, then the samples of grown mycelium were placed into cryovials with protectant, maintained for 20 min and rapidly plunged into liquid nitrogen. After 3-day-long storage the samples were thawed at 37°C and we determined the survival rate of fungi. Culture of genera *Laetiporus*, *Inonotus*, *Paecilomyces* preserved 100% survival when using protectants such as DMSO, glycerol and skimmed milk and ~90% in the case of lactose. Without application of protective media the survival was less than 80%.

This result may be explained by the fact that the genera *Laetiporus* and *Inonotus* include aphylophoral wood-destroying *Polyporaceae* fungi and in the laboratory, as a rule, we have to work with their mycelium located in the apical zone of colonies where hyphae are thin-walled and less resistant to stress factors. Concerning the representatives of primitive forms of *Gymnoascaceae* fungi *Paecilomyces* we should note that hyphae of mycelium on the entire surface of colonies are thin and slightly injured. Thus cryopreservation of fungi of these taxonomic groups without protective media is unreasonable. The fact that when using glycerol, skimmed milk and DMSO these cultures entirely preserved the survival, can be explained by maximal availability of their mycelial cells for cryoprotectants. Micophil imperfect fungi *Rhizoctonia* had low survival rates without protective media, although it is believed that fungi of this genus are highly cryoresistant. Possibly during 14 days of growing mycelium sufficiently mature stage of its development does not occur and the culturing time should have been increased. The survival obtained for the fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* after using all the types of cryoprotectants was higher comparing to the case of absent cryoprotectants.

Basing on our study we can conclude that all tested cryoprotectants were quite efficient.

Моделирование сольватации аминокислот полимерными криопротекторами в условиях масс-спектрометрического эксперимента

М.В. КОСЕВИЧ¹, В.Г. ЗОБНИНА¹, О.А. БОРЯК¹, В.В. ЧАГОВЕЦ¹, А.В. ЗИНЧЕНКО²

¹Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, г. Харьков

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

Modeling of Amino Acid Solvation by Polymer Cryoprotectants under Mass Spectrometric Experiment Conditions

M.V. KOSEVICH¹, V.G. ZOBNINA¹, O.A. BORYAK¹, V.V. CHAGOVETS¹, A.V. ZINCHENKO²

¹B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

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

Одной из важных функций криопротекторов, применяющихся для криоконсервирования биологических материалов, является сохранение сольватной оболочки биомолекул при низких температурах. Для изучения процесса сольватации на молекулярном уровне перспективным является метод масс-спектрометрии.

В данном сообщении приводятся результаты исследования взаимодействия набора аминокислот (валин, гистидин, лизин, пролин, триптофан, орнитин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты) с криопротекторными соединениями на основе органических полиэфиров – ПЭГ-400 и оксиэтилированный глицерин (ОЭГ-5) – с помощью вторично эмиссионной и электрораспылительной масс-спектрометрии.

В масс-спектрах растворов аминокислот в жидких полимерах были зарегистрированы пики, соответствующие ассоциатам аминокислот с олигомерами ПЭГ-400 и ОЭГ-5. Перевод неразрушенных невалентных ассоциатов из жидкой в газовую фазу в условиях масс-спектрометрического эксперимента является свидетельством их стабильности и указывает на эффективную сольватацию аминокислот данными полиэфиром.

Обнаружено, что относительная интенсивность ассоциатов выше для комплексов с аминокислотами с гидрофильными и ионными боковыми радикалами, а зарядовое состояние ассоциатов определяется ионной формой боковых радикалов аминокислот. Так, катионный гистидин формирует сольватные комплексы преимущественно в протонированной форме, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты – в депротонированной форме.

Структурная организация сольватных комплексов, зарегистрированных в масс-спектрометрическом эксперименте, была установлена путем моделирования методом молекулярной динамики. Компьютерное моделирование показало, что стабилизация сольватных комплексов достигается за счет завивания полиэфирной цепочки вокруг ионных групп аминокислот. В комплексах с гидрофобными аминокислотами полимерная цепочка удерживается посредством водородных связей ее концевых ОН-групп с заряженными группами цвиттерной формы аминокислот.

Данные о сольватации боковых радикалов олигомерами полиэфиров, полученные на уровне отдельных аминокислот, могут быть использованы при моделировании взаимодействия белков с полимерными криопротекторами.

One of the important functions of cryoprotectants, applied for biological material cryopreservation, is the keeping of biomolecule solvate shell under low temperatures. Mass spectroscopy is promising to study solvation process at molecular level.

In this report there are shown the results of studies of amino acids (valine, histidine, lysine, proline, tryptophan, ornithine, aspartic and glutamic acids) interactions with cryoprotective substances, based on organic polyethers: PEG-400 and oxyethylated glycerol (OEG-5) using the secondary emission and electrospray mass spectrometry.

In mass spectra of amino acid solutions in liquid polymers there were recorded the peaks, corresponding to amino acid associates with PEG-400 and OEG-5 oligomers. The transfer of undestroyed non-valent associates from a liquid into gas phase under mass spectrometry experimental conditions testifies to their stability and indicates to the efficient amino acid solvation with these polyethers.

A relative intensity of associates was revealed to be higher for the complexes with amino acids with hydrophilic and ion side radicals, and a charge state of associates was depended from an ion form of amino acid side radicals. Thus, a cation histidine forms the solvation complexes mostly in a protonated form, but the aspartic and glutamic acids do in a deprotonated one.

Structural organization of solvation complexes, recorded in mass spectrometry experiment, was established by modeling with molecular dynamics method. Computer modeling demonstrated the stabilization of solvation complexes as achieving due to the polyester chain curving around ion groups of amino acids. In the complexes with hydrophobic amino acids a polymer chain is held by hydrogen bonds of its end OH-groups with charged groups of amino acid zwitterionic form.

The data about the side radical solvation by polyether oligomers, obtained at the level of certain amino acids, may be used for modeling protein interactions with polymer cryoprotectants.

Типы стратегий холодовых адаптаций у насекомых, обитающих в Центральной Якутии

Н.Г. Ли

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Types of Cold Adaptation Strategies in Insects Inhabiting Central Yakutia

N.G. Li

Institute for Biological Problems of Cryolithozone of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russia

Географическое распределение типов стратегий холодовых адаптаций у насекомых – слабоизученный вопрос [Chown *et al.*, 2001]. В ранних исследованиях было показано, что толерантность к замерзанию является, возможно, наиболее успешной стратегией в континентальных арктических областях [Zachariassen, 1985; Duman 1991]. Несмотря на суровый климат, фауна и флора Якутии характеризуются значительным биоразнообразием, свидетельствующем о высоком адаптационном потенциале организмов, обитающих в данной области. Около 9 000–10 000 видов, описанных в энтомофауне Якутии, адаптированы к исключительно суровым климатическим условиям [Vinokurov, 2000]. Целью настоящего исследования являлось определение типов стратегий холодовых адаптаций, которые позволяют насекомым Якутии выживать на холоде.

Тип стратегии холодовых адаптаций был определен на основании измерения температуры их замерзания, как это описано ранее [Gehrken, 1984]. Жизнеспособность насекомых после замораживания в лабораторных условиях оценивалась по их способности координированно передвигаться в течение 30 мин. У куколок и пупариев данный показатель оценивался по скорости их дыхания при 20°C с помощью стеклянного респирометра по методу, описанному Энгельманом [Engelmann, 1963].

Настоящие исследования показали, что большинство холодоустойчивых насекомых в Якутии развивают стратегию морозоустойчивости. Из 28 исследованных видов 93,3% были морозотолерантными и только 6,7% были морозочувствительными. Три вида, *Cossus cossus*, *Pieris rapae* и *Acanthocinus aedilis*, относятся к насекомым, которые способны к смене стратегии адаптации в зависимости от климатических условий. Только два вида, *Rhagium inquisitor* и *Apatele Psi* [Hansen, 1978], были квалифицированы как морозочувствительные с высокой способностью к переохлаждению. Показано, что насекомые продуцируют высокопотенциальные льдонуклеирующие агенты и умеренные концентрации полиолов. Другой механизм (дегидратация) был обнаружен у трех видов при оценке взаимосвязи между содержанием воды и липидов в их организме в зимний период.

Geographic distribution of cold adaptation strategies' types in insects has been poorly studied issue (Chown *et al.*, 2001). In early studies it has been shown that tolerance to freezing is probably the most successful strategy in the continental Arctic regions [Zachariassen, 1985; Duman 1991]. Despite the harsh climate, Yakutia fauna and flora are characterized with significant biodiversity, indicating to a high potential for adaptation of organisms living in this area. About 9,000–10,000 species described in Yakutia entomofauna are adapted to extremely harsh climatic conditions [Vinokurov 2000]. The purpose of this study was to determine the types of cold adaptation strategies allowing the Yakutia insects to survive cold.

Type of cold adaptation strategy was determined by measuring the temperature of freezing, as described previously [Gehrken, 1984]. Insect viability after freezing in laboratory conditions was assessed by their ability to move in a coordinated manner for 30 min. In pupae and puparia this index was assessed by their respiration rate at 20°C with a glass respirometer by the method described by Engelmann (Engelmann, 1963).

The present study showed that the majority of cold resistance insects in Yakutia developed cold resistant strategy. Among 28 studied species 93.3% were cold tolerant and only 6.7% were cold sensitive ones. Three species, *Cossus cossus*, *Pieris rapae* and *Acanthocinus aedilis*, are referred to the species capable to change the adaptation strategies, depending on climatic conditions. Only two species, *Rhagium inquisitor* and *Apatele Psi* (Hansen, 1978), were classified as cold sensitive with a high potential for hypothermia. It is shown that the insects produce high-potential ice nucleating agents and moderate concentrations of polyols. Another mechanism (dehydration) was found for three species on the basis of evaluating water content and lipids in their organisms in winter period.

Точка переохлаждения и специфическая льдонуклеирующая активность как параметры оценки потенциала холодоустойчивости насекомых

Н.Г. Ли

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Supercooling Point and Specific Ice Nucleating Activity as the Parameters for Evaluating of Insect Cold Hardiness Potential

N.G. Li

Institute for Biological Problems of Cryolithozone of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russia

Точка переохлаждения (ТП) важна для описания способности видов переживать замораживание, но ее значение как прогностического параметра выживаемости при зимовке, или в оценке вероятности выживания того или иного вида в новых условиях в местах их зимовки, ограничено [Turnock and Fields, 2005]. В настоящем исследовании на двух видах холодоустойчивых насекомых, обитающих в Центральной Якутии, показано, что именно специфическая льдонуклеирующая активность, а не ТП должна использоваться для оценки потенциала холодоустойчивости у насекомых.

Исследования проводились на акклимированных к комнатной температуре гусеницах *Aporia crataegi* и сезонно-акклимированных жуках *Upis ceramboides*. ТП гусениц измеряли с помощью тонкой медь-константановой термопары, помещенной близко к сухой поверхности тела.

Инициацию кристаллизации выявляли как внезапное повышение температуры, связанное с выделением тепла от жидкости тела, превращающейся в лед, а самая низкая температура, зарегистрированная до повышения температуры, была принята за ТП. Специфическую льдонуклеирующую активность гемолимфы насекомых определяли изовольметрическим путем разведения образца, когда каждый образец разбавляли с одним и тем же коэффициентом разведения, используя один и тот же базовый раствор. Этот метод был впервые подробно описан Zachariassen и соавт.

Данные исследования показывают, что, поскольку ТП зависит от таких факторов, как концентрация полиолов в гемолимфе, она может быть зимой ниже, чем весной. Тем не менее, качество процесса льдообразования выше у зимних насекомых. Истощение полиолов весной приводит к увеличению ТП. В отличие от осени, когда увеличение ТП связано с развитием холодоустойчивости, весенние изменения ТП у этого жука происходят одновременно с потерей холодоустойчивости. Изменения физических и химических параметров в акклимированной к теплу гемолимфе *A. crataegi* были также связаны с увеличением ТП на 5-й день акклимации. Хотя тепловая акклимация *A. crataegi* индуцирует повышение ТП, нуклеация льда при этой температуре была неспецифичной и поэтому, вероятно, не имела адаптивного значения.

Итак, тепловая акклимация сопровождается адаптивной потерей нуклеаторов льда (хотя остаются случайные), связанной с падением потенциала холодоустойчивости у насекомых. Таким образом температура нуклеации сама по себе не отражает процесс льдообразования у насекомых, толерантных к замерзанию. Похоже, что только профиль активности льдонуклеации может сделать льдонуклеацию гемолимфы основной чертой процесса холодной адаптации.

The SCP is a useful parameter for describing the ability of species to survive freezing but its value as a predictor of overwintering survival, or in estimating the probability of a species surviving under new conditions in their overwintering habitats, is limited [Turnock and Fields, 2005]. The present study on the two freeze-tolerant insects inhabiting central Yakutia, shows that a specific ice nucleating activity rather than SCP should be used for evaluating of insect cold hardiness potential.

The studies were carried out on room acclimated caterpillars *Aporia crataegi* and seasonal acclimatized beetles *Upis ceramboides*. The supercooling point (SCP) of the caterpillars was measured by using a thin copper constantan thermocouple placed in close contact with the dry body surface. Initiation of freezing was detected as a sudden temperature increase due to the release of heat of fusion from body water being transformed to ice, and the lowest temperature recorded prior to the temperature increase was taken as the SCP. Specific ice nucleating activity of the insects hemolymph was determined by isovolumetric technique of sample dilution at which each sample was diluted by the same factor from the same stock solution. This method was first described in detail by Zachariassen *et al.*

Present studies show that because the SCP is influenced by such factors as polyol concentrations in the hemolymph, it can be lower in winter than in spring. Nevertheless, the quality of ice nucleating process is higher in winter insects. The depletion of polyols in the spring causes increase of SCP. Unlike in the autumn, when an increase in SCP is associated with development of freeze tolerance, spring changes in SCP for this beetle occur simultaneously with the loss of cold tolerance. The changes in the physical and chemical situation in the warm acclimated *A. crataegi* hemolymph were also correlated with an increase in SCP by the 5th day of acclimation. Although warm acclimation of *A. crataegi* induces an increase in the SCP, ice nucleation at this temperature was non-specific and therefore likely had no adaptive importance.

Hence, warm acclimation is accompanied by a loss of adaptive ice nucleators (although incidental ones remain), associated with a drop in the cold hardiness potential of the insects. Thus, the nucleation temperature (SCP) itself does not reflect the character of ice nucleating process in the freeze-tolerant insects. Only the profile of ice nucleating activity seems to determine the ice nucleation in the hemolymph as a feature of cold adaptation process.

Использование системы сигнализации уровня жидкого азота для оптимизации условий хранения биологического материала в низкотемпературном банке

А.Н. ОВЕРКО, М.И. ГРОШЕВОЙ, В.В. ЧИЖЕВСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Liquid Nitrogen Level Alarm System to Optimize Conditions of Biological Material Storage at Low Temperature Bank

A.N. OVERKO, M.I. GROSHEVOY, V.V. CHIZHEVSKY

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

В низкотемпературном банке (НТБ), наряду с научными задачами относительно замораживания живых объектов, возникают научно-технические задачи практического характера по обеспечению полноценного хранения криоконсервированных биообъектов.

Для оптимизации условий хранения биологического материала в НТБ используется автоматизированная система контроля температуры и уровня жидкого азота в криохранилищах – СКК-1. Однако, согласно регламенту работы, при проведении заправки хранилищ банка хладоносителем, данная система должна отключаться. Поэтому целесообразно создать и использовать систему сигнализации азотного уровня (САУ), задачей которой являлось бы отслеживание уровня жидкого азота в криохранилищах непосредственно в процессе заправки.

Нами разработан САУ, принцип измерения которого основан на отличии эффективности отвода тепла жидкостью и газом. Известно, что при погружении терморезистора в жидкий азот его температура быстро снижается до -196°C . В то же время при нахождении в парах азота температура датчика повышается, а его сопротивление снижается.

Прибор состоит из контрольного блока снаружи криохранилища и металлической рейки, в которой равномерно размещены 10 датчиков. Рейка с датчиками установлена между внутренней стенкой хранилища и поворотным стеллажом. Данный вариант размещения датчиков не мешает при работе с биоматериалом, а также не повреждается при заправке.

Состояние (пар/жидкость) каждого датчика отображается светодиодом на контрольном блоке, свечение диода указывает на то, что соответствующий датчик находится в жидкости. В результате на контрольном блоке светодиодами отображается наполняемость хранилища с шагом 10% от общей ёмкости хранилища.

Внедрение данной системы сигнализации во всех хранилищах банка позволит контролировать процесс заправки криохранилищ жидким азотом, а также облегчит и обезопасит работу оператора.

At low temperature bank (LTB) along with scientific tasks as for freezing of living objects there are appeared the R&D tasks of practical character on providing the integral storage of cryopreserved biological objects.

To optimize the storage conditions of biological material in the LTB there are used the automated system of temperature and liquid nitrogen level control in SKK-1 cryotanks. However, according to the exploitation protocol when performing filling in of the tanks with cooling agent this system should be turned-off. Therefore it is expedient to create and use the nitrogen level alarm system (NLAS), the task of which would be the tracing the liquid nitrogen level in cryotanks directly during the filling.

We have designed the NLAS the operating principle of which is based on the difference of efficiency of heat transfer in liquid and gas. It is known that when plunging the thermal resistor into liquid nitrogen its temperature reduces rapidly down to -196°C . At the same time being in nitrogen vapors the gauge temperature increases and its resistance reduces.

The device consists of the control block outside the cryotank and metal strip wherein 10 gauges are evenly set. The strip with gauges is adjusted between the inner wall of the depot and revolving shelves. This variant of gauges location does not interfere when working with biological materials as well as is not damaged during filling.

The state (vapor/liquid) of each gauge is shown by light diode at the control block, diode lightening means that corresponding gauge is in liquid. As a result at the control block the fill rate of the tank (each light diode corresponds to the 1/10th of the depot filling capacity) is shown.

Introduction of this alarm system in all the tanks of the bank allows the control of the filling process of cryotanks with liquid nitrogen and also will facilitate and make safer the operating person work.

Использование протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева для клеток интерстиция взрослых крыс

А.В. ПАХОМОВ, Т.М. ГУРИНА, Г.А. БОЖОК, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Cryopreservation Protocols with Controlled Cooling-Heating Rates for Adult Rat Interstitial Cells

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

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

Скорости охлаждения и нагрева являются одним из решающих факторов криоконсервирования, оказывающих влияние на жизнеспособность клеточной суспензии и сохранность функциональной способности стероидогенных клеток. Криобиологические исследования направлены на поиск оптимального сочетания скоростей охлаждения-нагрева для разработки режимов замораживания-оттаивания, позволяющих максимально сохранить гормонопродуцирующую составляющую тестисов – клеток Лейдига.

Цель данной работы – исследовать эффективность применения протоколов криоконсервирования с контролируемыми скоростями охлаждения-нагрева в температурных интервалах, связанных с фазовыми превращениями, для клеток интерстиция взрослых крыс.

Методом термопластической деформации определены температурные интервалы фазовых преобразований для криозащитного раствора (10%-й раствор ДМСО на среде 199 с 20 мМ HEPES), используемого при криоконсервировании клеток интерстиция тестисов взрослых крыс, а именно: кристаллизация (плавления) основной массы льда, кристаллизация (плавления) смеси эвтектической концентрации раствора криопротектора, кристаллизация (плавления) эвтектики растворителя на основе культуральной среды, а также рекристаллизация перед соответствующими процессами плавления на этапе нагрева. Замораживание и оттаивание образцов осуществляли в программном замораживателе «Cryoson», комбинируя высокие (20 град/мин) и низкие (1 град/мин) скорости охлаждения-нагрева в указанных температурных интервалах. В качестве контроля использовали оттаивание образцов на водяной бане 40°C. При анализе результатов подсчитывали сохранность количества клеток после криоконсервирования, а также количество клеток с неповрежденной клеточной мембраной в зависимости от вариаций скоростей охлаждения-нагрева в температурных интервалах фазовых преобразований.

Впервые разработан единый протокол замораживания-оттаивания, предусматривающий определенное сочетание высоких и низких контролируемых скоростей охлаждения-нагрева в указанных температурных интервалах. Этот протокол позволил получить высокие показатели сохранности и функциональной активности как клеток общей суспензии (56,7%), так и сохранности отдельной популяции – клеток Лейдига (78,7%).

Вследствие исключения субъективного фактора при оттаивании клеточной суспензии на водяной бане, полученные результаты имеют хорошую повторяемость. Предложенная методика имеет универсальный характер и может быть использована вне зависимости от вида биобъекта и состава криозащитной среды для криоконсервирования различных видов клеток.

Cooling and heating rates are essential factors in cryopreservation, affecting the cell suspension viability and preservation of functional capability in steroidogenic cells. Cryobiological researches are aimed to find the optimal combination of cooling and heating rates for designing the freeze-thawing regimens, enabling the maximum preservation of hormone-producing component of testes, Leydig cells.

The aim of this research was to investigate the application efficiency of cryopreservation protocols with the controlled cooling-heating rates within temperature intervals, associated with phase transitions for interstitial cells of adult rats.

Using the thermoplastic deformation method we determined the temperature intervals of phase transitions for cryoprotective solution (10% DMSO in medium 199 with 20 mM HEPES), used for cryopreservation of testicular interstitial cells of adult rats, such as: the crystallization (melting) of the bulk ice mass, crystallization (melting) of mixture of eutectic concentration of cryoprotective solution, the crystallization (melting) of solvent eutectics, based on culture medium, as well as the recrystallization before following processes of melting at heating stage. The samples' freeze-thawing was carried-out with the programmable freezer Cryoson, by combining high (20 deg/min) and low (1 deg/min) cooling-heating rates within the mentioned temperature intervals. As the control we used the samples' freeze-thawing in 40°C water bath. When analyzing the results obtained we calculated the preservation of cell number after cryopreservation, as well as the number of cells with intact cell membrane, depending on variation of cooling-heating rates within temperature intervals of phase transitions.

For the first time there was designed the universal freeze-thawing protocol, providing the certain combination of high and low controlled cooling-heating rates within the mentioned temperature intervals. This protocol enabled the obtaining of high indices of viability and functional activity for both cells of total suspension (56.7%) and the survival of certain population, *i. e.* Leydig cells (78.7%).

The obtained results are of good reproducibility due to excluding a subjective factor during cell suspension freeze-thawing in a water bath. The proposed technique is universal and may be used independently on bioobject type and cryoprotective medium composition for cryopreservation the variety of cells.

Перспективный для криобиологии зонд с длинноволновой эмиссией для обнаружения апоптоза

К.А. ПЫРШЕВ, М.М. ГУЗЫК, К.Ю. МАНОЙЛОВ

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, г. Киев

Red-Shifted Probe for Apoptosis Detection Prospective for Cryobiology

K.A. PYRSHEV, M.M. GUZYK, K.YU. MANOILOV

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Последние данные литературы демонстрируют противоречивые результаты о влиянии низких температур на различные типы клеток, акцентируя при этом внимание на роли апоптоза. Поэтому изучение апоптоза очень важно для криобиотехнологии. Наиболее популярные методы, применяемые для обнаружения апоптоза клеток, используют те же механизмы, что и макрофаги, распознающие изменения на поверхности апоптотической клетки. Нарушение липидной асимметрии с последующей экспозицией фосфатидилсерина (ФС) на внешний слой плазматической мембраны является основным критерием раннего выявления апоптоза и обычно изучается с помощью аннексина V. В связи с автофлуоресценцией, вызванной клеточными пигментами, представленной в коротковолновой области, многие исследователи интересуются зондами с излучением в красной области. Таким свойством обладает зонд на основе нильского красного (NR12S) [Kucherak *et al.*, 2010]. NR12S является радиометрическим зондом, спектры возбуждения которого находятся в сине-зеленой области с эмиссионными сдвигами длины волны в желтую и красную области. Еще одним преимуществом такого подхода является возможность его комбинированного использования в спектрофлуориметрии, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, что позволяет детально характеризовать исследуемые системы.

Мы протестировали NR12S в исследованиях клеток. Использовали культуру моноцитов человека U937 в среде RPMI 1640/HEPES («Sigma-Aldrich») с эмбриональной бычьей сывороткой. Уровень некроза изучали по окрашиванию пропидием йодидом (PI) («Sigma-Aldrich»). Были обнаружены некоторые особенности применения NR12S, что может быть важно для других исследователей, использующих этот метод.

Данные спектрофлуориметрии показали, что NR12S и PI, внесенные вместе во внеклеточный раствор, взаимодействуют и дают один пик излучения с эмиссией с увеличенным квантовым выходом и смещенным пиком ближе к 620 нм. Такая проблема может быть решена с помощью зонда для выявления некроза со спектром излучения в зеленой области или применением дополнительных контрольных образцов для обнаружения уровня некроза. Другая характеристика имеет отношение к наличию в растворе RPMI 1640 красителя фенолового красного с возбуждением при 520 нм и эмиссией при более 580 нм. Из-за наложения с эмиссией NR12S наиболее часто изучаемые клетки в растворе RPMI 1640 дают эмиссию, смещенную в более длинноволновую область, что искусственно увеличивает процент апоптотических и некротических клеток в тестах с проточной цитометрией. Применение NR12S зонда в исследованиях на клетках для обнаружения апоптоза находится только на начальной стадии, и определение оптимальных условий его применения имеет важное значение.

Авторы выражают благодарность Н. В. Короткевич и А.Ю. Лабынцеву за предоставленные культуры клеток и техническую консультацию.

Recent literature data search shows controversial results dealing with influence of low temperatures on different cell types with important focus on apoptosis. The most popular methods applying for apoptotic cells detection use the same mechanism as the macrophages recognizing the change on apoptotic cell surface. Lipid asymmetry disturbance followed by phosphatidylserine (PS) exposure on plasma membrane extracellular layer is the main parameter for early detection of apoptosis been commonly studied by annexin V assays. In view of autofluorescence caused by the cellular pigments presented in a short-wavelength region a lot of researchers interest in probes with the emission in red region. Such characteristic is proper for probe based on Nile Red (NR12S) [Kucherak, Oncul *et al.*, 2010]. NR12S is a ratiometric probe that can be excited in the blue-green region with response by wavelength shifts in yellow and red emission. Another advantage of this approach is the possibility of its combine using in spectrofluorimetry, flow cytometry and confocal microscopy permitting to characterize the studied system in detail.

We tested the application of NR12S for cellular studies. Human monocytes culture U937 was used in RPMI 1640/HEPES (Sigma-Aldrich) with fetal bovine serum (FBS). The level of necrosis was detected by propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). Some peculiarities in NR12S application have been found that can be important for other researchers using this method.

Spectrofluorimetry data has shown that NR12S and PI added together to extracellular solution are interacting and giving one peak of emission with enhanced quantum yield and shifted peak closer to 620 nm. Such problem can be solved by using the probe for necrosis with emission spectra in green region or applying additional control specimen for necrosis level detection. Another characteristic deals with existing in RPMI 1640 solution of the dye phenol red excited in 520 nm and giving response over 580 nm. Due to overlap with NR12S emission the commonly studied cells in RPMI 1640 solution respond in emission shifted to longer-wavelength region artificially increasing percent of apoptotic and necrotic cells detected by flow cytometry. It has to be noted that FBS contains different types of proteins and flow cytometer has shown their conjugating with NR12S probe.

NR12S probe application in a cell research as the assay for apoptosis is just on its beginning and the determination of its optimal application conditions is of importance. Some results of NR12S application will be presented at the conference.

The authors would like to thank N.V. Korotkevich and A.J. Labyntsev for providing cell culture and technical advice.

Биологические свойства криоконсервированных биообъектов плаценты различной степени дезинтеграции

В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Biological Properties of Cryopreserved Placental Biological Objects of Different Disintegration Degree

V.Yu. PROKOPYUK, O.S. PROKOPYUK

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

Криоконсервированные плацентарные биообъекты (КПБ) активно используются в разных областях биологии и медицины. С разработкой криобиологических технологий, позволяющих длительно сохранять не только низкомолекулярные экстракты, фракции полипептидов, но и клеточные, тканевые структуры, появилась возможность создавать препараты плаценты разной степени дезагрегации, разного состава. Для клинического применения необходимо определить биологические свойства этих препаратов, особенности их фармакодинамики и фармакокинетики.

Цель работы – изучение биологических свойств КПБ в виде криоэкстракта, суспензии клеток и фрагментов плаценты.

Влияние препаратов на пролиферативную и митотическую активность изучали на клеточной линии ВНК-21 clone 13/04. Для определения длительности выведения препаратов по уровню содержания плацентарных альфа-фетопротеина (АФП) и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) использовали 30 самцов крыс линии Wistar, которым вводили КПБ, для оценки эмбриотоксичности и эмбриолетальности – самок крыс линии Wistar, для оценки аномальной токсичности – крыс и кроликов.

Показано, что все препараты позитивно влияют на пролиферативную и митотическую активность. При введении криоэкстракта плаценты содержание АФП и ХГЧ определяется в крови животных с первых суток после введения и исчезает к 5–7-м суткам, при использовании клеток и фрагментов плаценты АФП и ХГЧ – с 7-х суток в гораздо меньшей концентрации, максимальная концентрация наблюдается с 14-х по 40-е сутки, следовые концентрации сохраняются до 60 суток. Фрагменты плаценты определяются в месте имплантации 30-х суток, при этом с 7-х по 14-е сутки наблюдается лейкоцитарная инфильтрация, а до 60-х суток сохраняются элементы, напоминающие структуру ворсин. Аномальной токсичностью не обладает ни один КПБ. Эмбриотоксичными свойствами обладает только криоэкстракт плаценты, что, очевидно, связано с резким высвобождением большого количества биологически активных веществ.

Таким образом, исследованные КПБ отличаются по фармакодинамике, фармакокинетики и должны иметь разные показания к применению. Так, криоэкстракт плаценты может применяться для быстрого достижения эффекта с периодичностью введения не реже 1 раза в 4–5 дней, однако противопоказан при беременности. Криоконсервированные фрагменты плаценты целесообразно применять при длительных хронических заболеваниях. Введение клеток плаценты может быть промежуточным вариантом терапии.

Cryopreserved placental biological objects (CPB) are widely used in various fields of biology and medicine. With the development of cryobiological technologies allowing long-term preservation of not only low molecular weight extracts, fractions of polypeptides, but also cellular and tissue structures there was appeared the possibility to design preparations of different disaggregation degrees, and various composition. For clinical use it is necessary to examine biological properties of these preparations, especially of their pharmacodynamics and pharmacokinetics.

The research aim was to study biological properties of CPB as cryoextract, cell suspension and placental fragments.

Effect of preparations on proliferative and mitotic activity was studied in BHK-21 clone 13/04 cells. To determine the duration of excretion of the preparations on the contents of placental alpha-fetoprotein (AFP) and human chorionic gonadotropin (HCG) there were used 30 male Wistar rats, which were administered with the CPB, Wistar female rats were done for the assessment of embryo toxicity and embryo lethality, for evaluation of abnormal toxicity there were used rats and rabbits.

It is shown that all the preparations have a positive effect on proliferation and mitotic activity. When introducing cryoextract of placenta the content of AFP and HCG in the blood of animals was found from the first day after administration and disappeared to the 5–7th day, using the placental cells and fragments this occurred to the 7th day in a much lower concentration, the maximum concentration was observed from 14th to 40th days, trace concentrations were kept up to 60 days. Placental fragments are found at implantation site of the 30th day, herewith from the 7th to 14th day there is observed a leukocyte infiltration, and up to the 60th day the elements resembling the structure of the villi are preserved. None of CPB had an abnormal toxicity. Embryotoxic properties were inherent only to placental cryoextract, which was obviously due to a sharp release of a big number of biologically active substances.

Thus, the studied CPBs differ in pharmacodynamics, pharmacokinetics, and should have different indications for application. For example the placenta cryoextract can be used to achieve a rapid effect with the administration period at least once in 4–5 days, but it is contraindicated during pregnancy. Cryopreserved placental fragments are expedient to be applied for long-term chronic diseases. Introduction of placental cells may be an interim therapy.

Морфологическое состояние изолированной печени крыс после гипотермического хранения в слабозлектролитных средах и нормотермической реперфузии

Н.В. РЕПИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological State of Isolated Liver of Rats After Hypothermic Storage in Weak-Electrolytic Media and Normothermic Reperfusion

N.V. REPIN

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

Проведен сравнительный анализ морфологического состояния изолированной и перфузированной печени крыс, хранившейся при гипотермии (4°C) в средах различного состава в течение 1 и 24 ч, а также после ее нормотермической реперфузии (НТРП).

В качестве растворов для гипотермического хранения (ГХ) печени использовали общепринятую UW-среду, сахарозо-содержащую среду, состоящую из 260 мМ сахарозы, 14 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂; pH 7,4 и маннит-содержащую среду (МСС), в состав которой входят 260 мМ маннита, 14 мМ KCl, 1 мМ NaCl, 3 мМ CaCl₂; pH 5,4.

После 1- и 24-часового ГХ изолированной печени в средах UW и МСС орган подвергался 60-минутной НТРП (37°C) минимальным солевым раствором Кребс-Рингера-бикарбонат (pH 7,4), который предварительно (3 мин) насыщался карбогеном и дополнительно содержал HEPES (10 мМ), глюкозу (5 мМ).

Реперфузия после 1-часового ГХ изолированной печени в сахарозо- или маннит-содержащей среде с пониженным pH обеспечивает сохранность основных морфологических характеристик органа и макроэргов. Для данных условий в клетках не наблюдалось значимого увеличения доли конденсированного хроматина, чрезмерного набухания митохондрий и дезорганизации их крист, фрагментации, вакуолизации и расширения цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭПР) – признаков, которые обычно связывают со снижением активности или нарушением ядерного аппарата и клетки в целом.

Краткосрочное (1 ч) гипотермическое хранение изолированной и перфузированной печени в сахарозо- или маннит-содержащей с пониженным значением pH средах и последующая НТРП обеспечивают высокий (аналогичный среде UW) уровень сохранности морфологических и биохимических характеристик органа, что свидетельствует о перспективности слабозлектролитных сред для ГХ. Показано, что 24-часовое хранение в данных средах является критическим сроком для восстановления функции печени после НТРП.

В результате экспериментальных исследований установлено, что важным условием для предотвращения отека органа при холодовом хранении является использование в консервирующих растворах слабо проникающих в клетку соединений.

Comparative analysis of morphological state of the isolated and perfused rat livers, stored under hypothermia (4°C) in media of various composition for 1 and 24 hr and also after its normothermic reperfusion (NTRP) was held.

As the solutions for hypothermic storage (HS) of liver the standard UW-medium, sucrose-containing medium, consisting of 260 mM sucrose, 14 mM KCL, 1 mM NaCl, 3 mM CaCl₂; pH 7.4 and mannitol-containing medium (MCM) which comprises 260 mM mannitol, 14 mM KCL, 1 mM NaCl, 3 mM CaCl₂; pH 5.4 were used.

After 1- and 24-hr-long HS of the isolated liver in the UW-media and MCM the organ was exposed to 60-min NTRP (37°C) by the minimal Krebs-Ringer-bicarbonate solution (pH 7.4), which was previously (3 min) saturated by carbogene and in addition contained HEPES (10 mM), glucose (5 mM).

Reperfusion after 1-hr-long HS of the isolated liver in sucrose- or mannitol-containing medium with lowered pH preserves the main morphological characteristics of organ and macroergs. For these conditions in cells there were no significant increase of the condensed chromatin share, excessive mitochondrial swelling and disorganization of their cristae, fragmentation, vacuolization and expansions of endoplasmic reticulum (EPR) cisterns, the features which are usually associated with the decreasing of activity or disorder of nuclear apparatus and a cell in a whole.

Short-term (1 h) hypothermic storage of the isolated and perfused liver in sucrose- or mannitol-containing media with low pH value and the following NTRP provided a high (similar to the UW-medium) level of preservation of morphological and biochemical characteristics of organ that testified to the prospectivity of weak-electrolytic media for HS. It is shown that 24-hr-long storage in these media is critical term for restoration of liver function after NTRP.

As a result of experimental investigations it has been established that the important condition for prevention of organ oedema during cold storage is the usage in preserving solutions of slightly penetrating into cell compounds.

Течение и исход беременностей, наступивших после переноса криоэмбрионов

Е.П. РЯБЕНКО, Е.А. МОЛЧАНОВА, Л.С. СЕМЕНЮК, Н.В. РУКОМЕДА

Клиника репродуктивной медицины «Надія», г. Киев

Course and Outcome of Pregnancies after Cryoembryos' Transfer

E.P. RYABENKO, E.A. MOLCHANOVA, L.S. SEMENYUK, N.V. RUKOMEDA

Clinic of Reproductive Medicine "Nadia", Kiev, Ukraine

В настоящее время беременность, наступившая с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, вызывает пристальное внимание специалистов, так как её наступление и вынашивание значительно отличается от природной.

Под нашим наблюдением находилась 21 беременная. Беременность наступила по программе IVF в криопротоколе. Эмбрионы 15 пациенток были криоконсервированы на 3-и сутки развития на стадии 6–8 бластомеров по длинному протоколу с использованием криопротекторов фирмы «Cook». Эмбрионы остальных пациенток криоконсервировали на 5-е сутки развития на стадии бластоцист методом витрификации с использованием криопротекторов фирмы «Irvine Scientific». Эмбрионы переносили в полость матки в день размораживания.

Средний возраст беременных составил $32,6 \pm 9,5$. Беременность после первой попытки наступила в 8 (38%), второй – 6 (28,5%), третьей – 7 случаях (33%). В данной группе двойни составили 8 (38%) случаев. Беременность протекала на фоне сердечно-сосудистой патологии в 13 случаях (61,9%), заболеваний щитовидной железы – 4 (19%), 1 из которых диффузный зоб. Все беременности выношены и закончились рождением живых детей. Оперативным родоразрешением (кесарево сечение) закончились 11 (52%) беременностей. Средний вес новорожденных составил $2658,75 \pm 729$ г, рост – $48,69 \pm 6,78$ см.

Беременность после вспомогательных репродуктивных технологий относится к группе риска и характеризуется высокой частотой многоплодия и оперативного родоразрешения.

Nowadays the pregnancy resulted from assisted reproductive technologies is of great interest for the experts, since its onset and carrying differ significantly from the natural pregnancy.

We have monitored 21 pregnant women. The pregnancy started by means of IVF program according to cryoprotocol. The embryos of 15 patients were cryopreserved to the 3rd day of development at the stage of 6–8 blastomeres according to long protocol using Cook cryoprotectants. The embryos of the rest patients were cryopreserved to the 5th day of development at the stage of blastocyst by vitrification using Irvine Scientific cryoprotectants. The embryos were transferred into uterus at the day of thawing.

An average age of patients made 32.6 ± 9.5 . Pregnancy after the first attempt started in 8 (38%), after the second one in 6 (28.5%), after the third one in 7 cases (33%). Pregnancy proceeded on the background of cardiovascular pathology in 13 cases (61.9%), diseases of thyroid gland in 4 (19%), 1 of those was with diffuse goiter. All the pregnancies were mature and resulted in the delivering of living babies. Eleven pregnancies (52%) resulted in delivery with surgery (Cesarean section). An average weight of newborns made $2,658.75 \pm 729$ g, height was 48.69 ± 6.78 cm.

Pregnancy after assisted reproductive technologies is referred to the risk group and characterized with a frequent plural pregnancy and delivery by means of surgery.

Динамика изменения наноструктуры мембран эритроцитов при кровопотере в результате хирургических операций в клинике

В.А. СЕРГУНОВА, Б.Ф. НАЗАРОВ, Е.А. МЯГКОВА

Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского, РАМН, г. Москва

Dynamics of Change in Erythrocyte Membrane Nanostructure During Blood Loss as a Result of Surgeries in Clinic

V.A. SERGUNOVA, B.F. NAZAROV, E.A. MYAGKOVA

V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimation of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Изучение структуры красных клеток крови при кровопотере в результате оперативных вмешательств и травм является одной из актуальных задач реаниматологии. Красные клетки крови представляют особый интерес в качестве объекта исследования, так как именно они определяют газотранспортную функцию крови.

Цель работы – изучить нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при кровопотерях в клинике.

Исследовали 17 пациентов с патологией спинного мозга и 15 пациентов с тяжелой сочетанной травмой. Все доноры дали добровольное согласие на исследование своей крови в соответствии с нормами этического комитета НИИОР. Обследовали три группы больных с минимальной кровопотерей до 300 мл, средней – 500 мл и массивной – больше 1000 мл. Изображения фрагментов структуры поверхности мембран эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) «NTEGRA Prima» («NT-MDT», Россия). Для количественного анализа параметров микроструктуры изображения поверхности мембраны разлагали на поверхности трех порядков с помощью пространственного Фурье-преобразования.

В контрольном монослое до операции 85% клеток – дискоциты, остальные клетки имели измененную форму (эхиноциты, плоские, с глубокой впадиной). После операции наблюдалось изменение формы клеток. На третий день количество дискоцитов у пациентов первой группы уменьшилось до 34, второй – до 54, а третьей – до 56%. К пятым суткам количество дискоцитов у пациентов первой и второй групп приближалось к контрольным значениям, а в третьей группе по-прежнему оставалось около 50%. Наряду с изменением макроструктуры наблюдалась динамика нарушения параметров наноструктуры мембран клеток. Через сутки после операции у всех больных возрастала высота первого порядка h_1 в 3–5 раз, к пятым суткам стремилась к контролю у больных с минимальной и средней кровопотерей, но оставалась увеличенной в 5 раз у больных с массивной кровопотерей. При тяжелой сочетанной травме также наблюдалось изменение параметров наноструктуры мембран.

У больных с кровопотерей наблюдается изменение наноструктуры мембран эритроцитов. Количественный анализ АСМ-изображений показывает, что степень изменения наноструктуры хорошо коррелирует с объемом кровопотери.

Studying the structure of red blood cells in blood loss as a result of surgeries or traumas is one of the actual tasks in emergency medicine. Red blood cells are of particular interest as an object of study, since namely they determine the gas-transport function of blood.

The research aim was to study the disorder in erythrocyte membrane nanostructure during blood loss in clinic.

We investigated 17 patients with spinal cord pathology and 15 ones with severe combined injuries. All the donors gave a voluntary consent for studying their blood according to the statements of Ethics Committee of V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimation of the Russian Academy of Sciences. We examined three groups of patients with the minimum blood loss up to 300 ml, medium – 500 ml and massive one – more than 1,000 ml. The images of surface structure fragments of erythrocyte membranes were obtained with atomic force microscopy (AFM) NTEGRA Prima (NT-MDT, Russia). For a quantitative analysis of microstructure parameters the image of membrane surface was decomposed on surface of three orders by means of spatial Fourier transform.

In the control monolayer prior to surgery 85% of cells were discocytes, other cells had a changed shape (echinocytes were flat, with deep cavity). A change in cell shape was observed after surgery. To the 3rd day a number of discocytes in patients of the first, second and third groups decreased down to 34, 54 and 56%, correspondingly. To the 5th day the discocyte number in patients of the first and second groups was close to the control values, and in the third one it still remained about 50%. Along with a changed macrostructure there was also observed the dynamics of disorder in nanostructure parameters of cell membranes. One day after surgery, there was an increase in first-order height h_1 by 3–5 times in all the patients, to the 5th day it approached the control in patients with the minimum and medium blood loss, but remained 5-fold increased in patients with a massive blood loss. There was also observed a change in parameters of membrane nanostructure in severe combined injury.

In patients with blood loss, we observe a change in erythrocyte membranes nanostructure. Quantitative analysis of AFM images shows the degree of nanostructure change as well correlating with a blood loss volume.

Апипродукты – естественный источник аминокислот-детоксикантов

В.Ф. ФУРДУЙ, С.Н. ГАРАЕВА, А.И. МАНТОПТИН, Г.В. РЕДКОЗУБОВА, Г.В. ПОСТОЛАТИ, И.Г. МЕРЕУЦЭ
Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы, г. Кишинев

Apiproducts as Natural Source of Amino Acids-Detoxifiers

V.F. FURDUJ, S.N. GARAYEVA, A.I. MANTOPTIN, G.V. REDKOZUBOVA, G.V. POSTOLATI, I.G. MEREUTSE
Institute of Physiology and Sanocreatology of the Academy of Sciences of Moldova,
Republic of Moldova, Chisinau, Moldova

Роль аминокислот как участников метаболических процессов неразрывно связана с их функцией регуляторов многих биохимических и физиологических реакций, в том числе с функцией обезвреживания ксенобиотиков и токсичных продуктов обмена. В научной литературе выделен ряд аминокислот, которым отводят роль детоксикантов. Так, образование конъюгатов с ксенобиотиками осуществляется таурином, глицином и цистеином. Также выделена группа иммуноактивных аминокислот, не только формирующих иммуноактивные белки организма, но и ускоряющих производство Т-лимфоцитов и выработку специфических антител.

Материалом для настоящего исследования послужили пчелопродукты, полученные в мае в Кодрах Молдовы. Для определения суммарного содержания свободных аминокислот и аминокислот, связанных в белках, в меде, прополисе, цветочной пыльце, перге, маточном молочке и подморе пчел, использовали модифицированный метод их детектирования на аминокислотном анализаторе AAA 339M с предварительным гидролизом образцов 6N-соляной кислотой при 110°C в течение 24 ч.

Содержание аминокислот-детоксикантов (АК) в меде, прополисе, цветочной пыльце и подморе отражено в таблице.

Значительное содержание АК, в том числе иммуноактивных аминокислот, определяет саногенные свойства исследованных пчелопродуктов. Наибольшее суммарное содержание аминокислот-детоксикантов, обнаруженное в подморе пчел, определяет его значительную детоксицирующую и иммунную активность по сравнению с другими исследованными пчелопродуктами.

The role of amino acids as participants of metabolic processes is tightly related to their regulatory function in many biochemical and physiological responses, including that of xenobiotics and toxic metabolic products detoxication. In scientific literature there is emphasized a number of amino acids, playing the role of detoxifiers. Thus, the formation of conjugates with xenobiotics is implemented by taurine, glycine and cysteine. There was also emphasized the group of immunoactive amino acids, not only forming the immunoactive proteins of organism, but also accelerating T-lymphocyte and specific antibodies production.

Bee products, procured in May in Moldavian Kodry, served as the material for this research. To determine total content of free amino acids and those, bound in proteins, in honey, propolis, pollen, beebread, royal jelly and dead bees, we used the modified method for their detection with amino acid analyzer AAA 339M with preliminary sample hydrolysis with 6N hydrochloric acid at 110°C within 24 hrs.

The content of amino acids-detoxifiers (AD) in honey, propolis, pollen and dead bees are shown in the Table.

Significant AD content, including immunoactive amino acids, determines therapeutic properties in the studied bee products. The highest total content of amino acids-detoxifiers, revealed in dead bees, determines their high detoxicant and immune activities compared to other studied bee products.

АК, г/кг AD, g/kg	Мед Honey	Подмор пчел Dead bees	Цветочная пыльца Pollen	Прополис Propolis	Перга Beebread	Маточное молочко Royal jelly
Таурин Taurine*	0,182±0,0434	2,27±0,50	0,08±0,02	0,009±0,002	0,14±0,02	0,30±0,03
Аспаргат Aspartate*	0,096±0,0156	36,16±5,36	15,39±2,92	0,804±0,177	12,96±1,88	46,61±3,73
Глутамат + глутамин Glutamate+ Glutamine*	0,150±0,032	81,48±16,70	27,27±4,66	1,113±0,237	20,08±2,89	37,65±5,65
Глицин Glycine*	0,032±0,007	37,54±7,14	7,30±1,50	0,582±0,119	6,31±0,63	8,95±0,90
Цистеин Cysteine*	0,007±0,001	7,89±1,06	1,97±0,40	0,202±0,038	0,65±0,11	1,16±0,09
Метионин Methionine*	0,006±0,001	5,69±1,14	1,62±0,28	0,070±0,017	0,50±0,04	3,42±0,34
Орнитин Ornithine*	0,007±0,001	0,14±0,03	0,14±0,03	0,005±0,001	0,32±0,02	0,11±0,01
Аргинин Arginine*	0,073±0,014	25,71±5,45	6,23±1,18	0,243±0,047	5,59±0,96	14,69±1,62
Валин Valine	0,033±0,006	32,00±5,95	6,90±1,35	0,294±0,050	5,76±0,75	13,69±1,51
Изолейцин Isoleucine	0,024±0,005	19,42±1,77	5,38±0,98	0,190±0,031	4,25±0,68	12,84±1,67
Лейцин Leucine	0,044±0,008	41,59±7,18	11,35±2,36	0,478±0,099	7,92±1,47	21,41±1,93
Сумма АК Total AD	0,654±0,072	289,89±43,48	83,63±10,04	3,989±0,558	64,48±7,09	160,83±25,73

Примечание: * – иммуноактивные аминокислоты.

Note: * – immune active amino acids.

Имплантация криоконсервированной тестикулярной ткани в эксперименте: новые аспекты

В.Е. ЧАДАЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Implantation of Cryopreserved Testicular Tissue in Experiment: New Aspects

V.YE. CHADAYEV

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

Впервые эксперименты по аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани проводили на 18-месячных кроликах породы Шиншилла массой 3000–3500 г. Всю работу с животными проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Животных содержали в стандартных условиях вивария в течение 1,5 месяцев, температуру помещения поддерживали в диапазоне 15...17°C с относительной влажностью 5–65%. Во время эксперимента наблюдали за самочувствием животных визуально.

Материалом для создания низкотемпературного банка служили сегменты тестисов, полученных во время лапаротомии у здоровых кроликов. Забор яичек кроликов производили в возрасте 18 месяцев. Забор амниотической оболочки осуществляли от здоровых самок. При этом учитывали отсутствие патологий различного генеза. Ампулы непосредственно перед операцией деконсервировали. Сегменты тестикулярной ткани и амниотическую оболочку промывали в питательной среде, затем сегменты погружали в амниотическую оболочку. Сформированный «мешочек» завязывали кетгутовой лигатурой. После соответствующей обработки операционного поля под местной анестезией производили поперечный разрез кожи в подвздошной области.

Применение данной биологической мембраны позволило пролонгировать функциональную активность тестикулярной ткани благодаря ослаблению эффекта отторжения и лизиса.

For the first time the experiments on allotransplantation of cryopreserved testicular tissue were carried-out in 18-month-old rabbits of the Chinchilla breed, weight of 3,000–3,500 g. All the work with animals was carried-out according to the General Principles of Experiments in Animals, which were approved by the 3rd National congress on bioethics (Kiev, 2007) and coordinated with the statements of European Convention on Protection of the Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Animals were kept in standard conditions of vivarium within 1.5 months, the room temperature was maintained within the range of 15...17°C with relative humidity of 55–65%. The health of the animals was monitored visually during the experiment.

Testicular segments, which were derived during laparotomy in healthy rabbits, served as a material for establishing the low-temperature bank. Rabbit testes were sampled at 18 months age. A sampling of an amniotic membrane was carried-out in healthy females. Thus the absence of pathologies of various genesis was considered. Ampoules were thawed directly before the surgery. The segments of testicular tissue and amniotic membrane were washed in nutrient medium, then the segments were placed into amniotic membrane. The formed 'sack' was fastened by catgut ligature. After the corresponding processing of a surgical field the skin in iliac region under local anaesthesia was cross-sectionally cut.

Application of this biological membrane allowed to prolong a functional activity of testicular tissue due to weakening the effect of rejection and lysis.

Аллотрансплантация криоконсервированной тестикулярной ткани как метод коррекции гипофункции яичек млекопитающих

В.Е. ЧАДАЕВ, В.В. ВОЛИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Allotransplantation of Cryopreserved Testicular Tissue as Method to Correct Mammalian Testicular Hypofunction

V.YE. CHADAYEV, V.V. VOLINA

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

В настоящее время актуальны изучение терапевтического эффекта новых методов коррекции тестикулярной недостаточности и их внедрение в репродуктивную медицину.

Целью работы было изучение влияния трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани кроликов при половой абстиненции, как модели гипофункции яичек *per se* и на фоне применения препарата «Ноофен».

Установлено, что моделирование гипофункции яичек у кроликов в условиях невозможности освобождения их семенников от зрелых сперматозоидов приводило к возникновению деструктивных изменений, которым подвергались, в первую очередь, наиболее дифференцированные ярусы сперматогенного эпителия – формирующиеся сперматозоиды и сперматиды. Последние, набухая, сливались в характерные округлые массы (семенные шары), плавающие в просвете канальца. Поскольку нижние слои сперматогенного эпителия (сперматогонии и сперматоциты I порядка) при этом сохранялись более длительно, то возможно восстановление сперматогенеза после прекращения действия повреждающего агента или неблагоприятного фактора.

Морфологическое исследование семенников животных с моделированной гипофункцией яичек (содержание без самок в течение 2-х месяцев), которым производилась трансплантация криоконсервированной тестикулярной ткани и которые в течение 4-х недель получали ноотропный препарат «Ноофен», показало восстановление сперматогенного эпителия и возобновление сперматогенеза в извитых семенных канальцах. В соединительной ткани паренхимы семенников между петлями семенных канальцев вокруг кровеносных капилляров определялись интерстициальные клетки Лейдига, которые осуществляют в семенниках эндокринную функцию, синтезируя стероидные гормоны. Тот факт, что интерстициальные клетки в большем количестве обнаруживаются в семенниках у животных, получавших после трансплантации ткани яичек препарат «Ноофен», свидетельствует в пользу последнего, как препарата, улучшающего капиллярное кровообращение.

Таким образом, показано: 1) половая абстиненция кроликов в течение 2-х месяцев не является необратимой; 2) метод трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани позволяет восстанавливать морфофункциональное состояние семенников, осуществляя коррекцию снижения их функции; 3) ноотропный препарат «Ноофен» усиливает эффект, полученный от трансплантации.

Nowadays an actual is the study of therapeutic effect of new methods for correcting testicular failure and their introduction into reproductive medicine.

The research aim was to study the effect of transplantation of cryopreserved testicular tissue of rabbits under sexual abstinence as a model of testicular hypofunction *per se* and on the background of the drug Noophen introduction.

It has been found that the modeling of testicular hypofunction in rabbits under conditions of impossibility of releasing of mature spermatozoa from testes led to the occurrence of destructive changes, primarily in the most differentiated layers of seminiferous epithelium, *i. e.* developing spermatozoa and spermatids. Underwent swelling the latter merged into characteristic rounded masses (semen balls) floating in the tubule lumens. Since lower layers of the seminiferous epithelium (spermatogonia and spermatocytes of the 1st order) herewith were longer preserved, the spermatogenesis recovery was possible after ceasing the effect of damaging agent or unfavorable factor.

Morphological examination of animals' testes with experimental testicular hypofunction (keeping without females within 2 months), which were transplanted with cryopreserved testicular tissue and which within 4 weeks received nootropic drug Noophen showed the recovery of seminiferous epithelium and renewal of spermatogenesis in the convoluted seminiferous tubules. In connective tissue of testes parenchyma between the loops of the seminiferous tubules around blood capillaries there were found interstitial Leydig cells, performing endocrine function in testes by synthesizing steroid hormones. The fact that the interstitial cells are found in great number in the testes of animals treated with drug Noophen after transplantation of testicular tissue testifies to a favor of the latter, as the drug improving capillary blood circulation.

Thus we have shown that 1) sexual abstinence of rabbits for 2 months is not irreversible, 2) transplantation of cryopreserved testicular tissue can recover testicular morphology and function, by correcting their functions' reduction, 3) nootropic drug Noophen strengthens the effect resulted from a transplant.

Состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях лабораторных животных на фоне введения криоконсервированного экстракта плаценты в условиях общего охлаждения

А.К. Черемской, В.В. Чижевский, Ю.В. Никитченко, О.С. Прокопюк
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

State of Prooxidant-Antioxidant Balance in Tissues of Laboratory Animals on Background of Introduction of Cryopreserved Placental Extract Under General Cooling

A.K. CHEREMSKOY, V.V. CHIZHEVSKY, YU.V. NIKITCHENKO, O.S. PROKOPYUK
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Свободнорадикальное повреждение биомолекул является одним из основных механизмов холодового повреждения мембран [Никитченко Ю.В., Овсянников С.Е., 2000]. Показано, что при общем охлаждении и последующем самоотогреве экспериментальных животных увеличивается интенсивность свободнорадикального окисления липидов, снижается активность ряда антиоксидантных ферментов и содержание природных антиоксидантов в тканях, т.е. нарушается прооксидантно-антиоксидантный баланс организма. В связи с этим поиск средств, обладающих антиоксидантным действием или способностью повышать активность эндогенной антиоксидантной системы, необходим для повышения холодовой устойчивости организма.

Изучали состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях сердца, печени и крови крыс через 3 ч самосогревания после общего охлаждения белых крыс, получавших предварительно в течение 5 дней криоконсервированный экстракт плаценты.

Полученные в работе данные позволяют сделать вывод, что общее охлаждение животных увеличивает содержание ТБК-активных продуктов и интенсивность спонтанного и аскорбат-индуцированного ПОЛ в сердце, печени и сыворотке крови. При этом антиокислительная активность сыворотки крови и активность супероксиддисмутазы в сердце, печени и сыворотке крови снижались, а активность церулоплазмينا и каталазная активность не изменялись. Криоконсервированный экстракт плаценты нормализовал антиокислительную активность и активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови, сердце и печени подопытных животных снижал накопление ТБК-активных продуктов, а также интенсивность спонтанного и аскорбат-индуцированного ПОЛ в изученных тканях, что несомненно является положительным стабилизирующим механизмом в реагировании теплокровного организма на холодовой стресс.

Free radical damage of biomolecules is one of the main mechanisms of the membrane damages by cold [Nikitchenko Yu.V., Ovsyannikov S. E., 2000]. It is shown that at general cooling and the subsequent self-warming of experimental animals, the intensity of free radical oxidation of lipids increases, activity of some antioxidant enzymes and the content of natural antioxidants in tissues decreases, *i. e.* the prooxidant-antioxidant balance of an organism is disordered. In this connection the search for the means possessing an antioxidant action or ability to increase the activity of endogenous antioxidant system, is necessary to enhance cold hardiness of an organism.

There was studied the state of prooxidant -antioxidant balance in tissues of heart, liver and blood of rats in 3 hrs after self-warming with following general cooling of white rats, previously administered with a cryopreserved extract of placenta during 5 days.

The data obtained in the work allow the conclusion about the fact that total cooling of animals increases the content of TBA-active products and intensity of spontaneous and ascorbate-induced lipid peroxidation in heart, liver and blood serum. Thus the anti-oxidative activity of blood serum and activity of superoxide dismutase in heart, liver and blood serum decreased, the activity of ceruloplasmin and catalase activity did not change. Cryopreserved extract of placenta normalized antioxidative activity and the one of superoxide dismutase in blood serum, heart and liver of experimental animals and reduced the accumulation of TBA-active products and intensity of spontaneous and ascorbate-induced lipid peroxidation in the investigated tissues, which is undoubtedly positive stabilizing mechanism in the response of homoiothermic organism to cold stress.

Прогнозирование осмотического поведения клеток при замораживании и их сохранности после отогрева

Н.А. ЧЕРНОБАЙ, И.Ф. КОВАЛЕНКО, Г.А. БОЖОК, А.В. ПАХОМОВ, Л.Ф. РОЗАНОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Forecasting of Osmotic Behavior of Cells During Freezing and their Post-Thaw Survival

N.A. CHERNOBAY, I.F., KOVALENKO, G.A. BOZHOK, A.V. PAKHOMOV, L.F. ROZANOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В работе с помощью модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского [Гордиенко Е. А. и др., 2008] на основе определенных геометрических и транспортных характеристик клеток интерстиция тестисов (КИТ) в растворах криопротекторов [Чернобай Н.А. и др., 2010] прогнозировали осмотическое поведение этих клеток на разных этапах криоконсервирования и сохранность КИТ после отогрева.

В работе оценена сохранность КИТ после криоконсервирования с растворами глицерина (7%), ДМСО (10%), ЭГ (7%) и диметилформамида (ДМФА) 5% с использованием скоростей охлаждения 1, 5 и 10 град/мин до -40°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Показано, что глицерин обеспечивает достаточно высокую (до 75%) сохранность клеток после замораживания. Замораживание с применением растворов ДМСО и ЭГ со скоростью охлаждения 1 град/мин обеспечивает сохранность КИТ до 59%, со скоростями 5–10 град/мин – до 72%. Наиболее высокие значения сохранности (83%) получены при криоконсервировании клеток со скоростью охлаждения 10 град/мин с использованием ДМФА.

Прогнозирование осмотического поведения КИТ на этапе замораживания с различными скоростями охлаждения показало, что при охлаждении со скоростью 1 град/мин в присутствии ДМСО обезвоживание клеток завершается к -10°C , в присутствии ЭГ и ДМФА – к -20°C . При использовании глицерина достижение минимального объема клеток наблюдается к -45°C . Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии всех исследуемых веществ расширяет температурный диапазон обезвоживания КИТ. При охлаждении со скоростью 100 град/мин степень обезвоживания клеток незначительна, что может привести к внутриклеточной кристаллизации и стать причиной повреждения клеток.

Результаты прогнозирования позволяют дать следующее объяснение повышению сохранности клеток при повышении скорости охлаждения до 10 град/мин в присутствии ДМСО, ЭГ и ДМФА. Охлаждение со скоростью 1 град/мин сопряжено с длительным нахождением клеток в обезвоженном состоянии, что может стать причиной их гибели в результате осмотического стресса. Увеличение скорости охлаждения до 10 град/мин снижает время экспозиции клеток в дегидратированном состоянии, исключая одновременно и внутриклеточную кристаллизацию, и осмотический стресс. Вместе с тем, очевидно, что дальнейшее увеличение скорости охлаждения до 100 град/мин, хотя и позволяет избежать длительного действия гипертонии, наблюдающейся при медленных скоростях, может привести к значительному переохлаждению клеток и возникновению внутриклеточной кристаллизации.

By means of modified Kedem-Kachalsky physical and mathematical model [Gordienko E.A. *et al.* 2008] and basing of certain geometrical and transport characteristics of testes interstitial cells (TICs) in cryoprotectant solutions [Chernobay N.A. *et al.* 2010] in this research we forecasted the osmotic behaviour of mentioned cells at different stages of cryopreservation and TIC survival after thawing.

In the research we estimated the TIC survival after cryopreservation in the solutions of glycerol (7%), DMSO (10%), EG (7%) and 5% dimethyl formamide (DMFA) using cooling rates of 1, 5 and 10 deg/min down to -40°C with following plunging of the samples into liquid nitrogen. Glycerol has been shown to provide quite a high (up to 75%) cell survival after freeze-thawing. After freeze-thawing in solutions of DMSO and EG using cooling rate of 1 deg/min provided the TICs survival up to 59% and in the case of 5–10 deg/min it was up to 72%. The highest survival (83%) was obtained when freeze-thaw the cells using cooling rate of 10 deg/min and DMFA solution.

Forecasting of osmotic behaviour of TICs at stage of freezing when using various cooling rates has shown that during cooling with the rate of 1 deg/min in DMSO presence the cell dehydration terminates at -10°C and in the presence of EG and DMFA does at -20°C . When using glycerol, the achieving the minimum volume of cells is observed at about -45°C . The rise in cooling rate up to 10 deg/min in the presence of all the studied substances extends the temperature range of TIC dehydration. When cooling with the rate of 100 deg/min the dehydration degree of cells is insignificant, likely leading to intracellular crystallization and be the cause of cell damage.

The results of forecasting allowed to explain rise in cell survival after increasing the cooling rate up to 10 deg/min in the presence of DMSO, EG and DMFA. Cooling with the rate of 1 deg/min is related to long-term exposure of cells to dehydration, which might be the cause of their death because of osmotic stress. Increased cooling rate up to 10 deg/min reduced the time of cell exposure in dehydrated state, excluding simultaneously both intracellular crystallization and osmotic stress. Along with this it is evident that further rise of cooling rate up to 100 deg/min even if allows the avoiding of lasting effect of hypertonia observed at slow rates may lead to significant overcooling of cells and appearance of cell crystallization.

Дослідження впливу кріоконсервування на морфофункціональні властивості клітин гранульози та кумулюсу яєчника людини

Н.Н. ЧУБ, М.П. ПЕТРУШКО, І.В. ДОБРУНОВА, В.В. КІРОШКА, О.Б. РЕВЕНКО
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Study of Cryopreservation Influence on Morphological Properties of Human Ovarian Granulosa and Cumulus Cells

N.N. CHUB, M.P. PETRUSHKO, I.V. DOBRUNOVA, V.V. KIROSHKA, O.B. REVENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Останнім часом при комплексному лікуванні деяких форм безпліддя, особливо для збереження фертильності пацієнток, які проходять абляційну хіміо- та радіотерапію, використовують кріоконсервовані репродуктивні тканини, клітини, гамети або ембріони.

Мета роботи – оцінка морфофункціональних властивостей клітин гранульози та кумулюсу яєчника людини до та після кріоконсервування.

У роботі використовували кріоконсервовані за повільною програмою охолодження під захистом 5% ДМСО + 5% ПЕО-400, фрагменти клітин гранульози та кумулюсу (КГК) яєчника людини, які вилучали з преовуляторних фолікулів під час проведення програми запліднення *in vitro*. Клітини за різними методами культивували в середовищі «Upgraded B2» (Франція) або ДМЕМ («Serwa») до та після кріоконсервування. Стероїдогенну активність та життєздатність КГК оцінювали за допомогою флуоресцентних барвників: нільського червоного та пропідіуму йодиду.

Гістологічні дослідження не виявили суттєвих відмінностей у структурі КГК до та після кріоконсервування, однак у деяких препаратах спостерігали зміну тінкторіальних властивостей в бік еозинофілії після дії низьких температур. При культивуванні нативних препаратів адгезію й міграцію КГК відмічали на 2-у добу культивування, після кріоконсервування – на 3–4-у добу. Імовірно, даний факт пов'язаний з репарацією нелетальних ушкоджень, що виникають у клітинах в результаті кріоконсервування. На 7-у добу відзначали множинну міграцію клітинних елементів в моношарі. Клітини мали округлу форму з дрібнозернистою цитоплазмою. На 10-у добу спостерігали багаточарові фрагменти КГК із тонкогранульованою цитоплазмою. Флуоресцентний барвник нільський червоний виявив збереження стероїдогенної активності КГК у культурі на 10-у добу після дії кріозахисного середовища та кріоконсервування, що було підтверджено при ксенотрансплантації КГК оваріоектомованим самкам щурів. Життєздатність клітин після кріоконсервування була знижена на 29%. До 14-ї доби більшість клітин і фрагментів відкріплювалися від дна чашки, що свідчило про настання фази старіння культури.

Таким чином, низькотемпературне зберігання під захистом двохкомпонентного кріозахисного середовища незначно впливає на стероїдогенну активність, морфологічну цілісність КГК, міграцію і проліферацію клітин у культурі.

Recently in a complex treatment of some types of infertility, especially for preserving the fertility in the patients undergoing ablational chemotherapy and radiotherapy, the cryopreserved reproductive tissues, cells, gametes or embryos have been used.

The research aim was to assess morphological and functional properties of human ovarian granulosa and cumulus cells before and after cryopreservation.

In the work there were used cryopreserved under protection of 5% DMSO + 5% polyethyleneoxide-400 fragments of human ovarian granulosa and cumulus cells (GCC), isolated from pre-ovulatory follicles during *in vitro* fertilization procedure. The cells were cultured using different methods in Upgraded B2 (France) or DMEM (Serwa) media before and after cryopreservation by slow cooling program. Steroidogenic activity and viability of GCC was assessed using fluorescent dyes: Nile Red and propidium iodide.

Histological studies have found no significant differences in the structure of GCC before and after cryopreservation, however, in some samples there was observed a change in tinctorial properties towards eosinophilia after low temperature exposure. When cultured native preparations the adhesion and migration of GCC were noted to the second day of culturing after cryopreservation it was found to the 3–4th day. This fact is presumably associated with reparation of non-lethal damages appearing in the cells as a result of cryopreservation. To the seventh day there was found a multiple migration of cell elements in monolayer. The cells were of a round shape with fine-grained cytoplasm. To the 10th day there were observed the multilayer areas of GCC with fine-grained cytoplasm. Fluorescent dye Nile red revealed the preserved steroidogenic GCC activity in the culture to the 10th day after exposure to cryoprotective media and cryopreservation, which was confirmed by xenotransplantation of GCC to ovarioectomized female rats. Post-thaw cell viability was reduced by 29%. By the 14th day the majority of cells and fragments detached from the dish bottom, indicating the onset of culture aging phase.

Thus, low-temperature storage under the protection of two-component cryoprotective medium does not significantly affect steroidogenic activity, morphological integrity of GCC, migration and proliferation of cells in culture.

Чувствительность фетальных и неонатальных нервных клеток крыс к гипотермическому хранению

М.В.ШЕВЧЕНКО¹, А.Н.СУКАЧ²

¹Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

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

Sensitivity of Rat Fetal and Neonatal Neuronal Cells to Hypothermic Storage

M.V. SHEVCHENKO¹, A.N. SUKACH²

¹G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov, Ukraine

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

Изучение влияния гипотермических условий на жизнеспособность изолированных нервных клеток (НК) различного уровня развития актуально для криобиологии, трансплантологии и медицины. Цель работы – изучение влияния гипотермического хранения (ГХ) изолированных НК фетального и неонатального мозга крыс в средах различного состава на их поведение в культуре *in vitro*.

Нервные клетки получали из тканей мозга эмбрионов крыс 15–16-х суток гестации и новорожденных крыс. Клетки хранили в течение 1, 2, 3, 4 и 5-и суток при температуре 8°C в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки крови крыс. Культивировали их в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной 10%-й сывороткой. Жизнеспособность клеток оценивали по трипановому тесту. Клетки окрашивали на маркер нейронов β -тубулин III.

В течение 1-х суток ГХ наблюдалось увеличение жизнеспособности всех изучаемых клеток в 1,5–2 раза, которая при дальнейшем хранении практически не изменялась. Количество клеток при этом уменьшалось.

Гипотермическое хранение эмбриональных НК до 3-х суток не приводило к изменению поведения клеток в культуре по сравнению с контролем. Нервные клетки формировали агрегаты, от которых после прикрепления мигрировали нейроны и клетки глии. После формирования глиального монослоя появлялись нейробласты и колонии клеток; в течение 4-х суток ГХ характеризовалось уменьшением количества клеток с нейрональной морфологией и более низкой скоростью формирования монослоя глии. После 5 суток ГХ нервные клетки формировали мелкие рыхлые агрегаты со слабой способностью к прикреплению. При этом мигрирующие от них клетки в основном были представлены клетками глии, которые характеризовались низким уровнем пролиферации. Площадь монослоя не превышала 20% площади лунки. Поведение неонатальных НК в культуре после ГХ на протяжении 2-х суток не отличалось от поведения исходных клеток. Происходило формирование многоклеточных агрегатов, которые прикреплялись к подложке, после чего от них мигрировали нейроны и клетки глии. Формировался монослой клеток глии, на котором появлялись нейробласты и колонии клеток. Культивирование неонатальных НК после 3-х суток ГХ характеризовалось прикреплением и распластыванием единичных клеток глии, а также формированием мелких рыхлых агрегатов, которые к подложке не прикреплялись, в дальнейшем распадались на единичные клетки и погибали.

Таким образом, неонатальные НК более чувствительны к условиям ГХ по сравнению с эмбриональными клетками. При этом нейрональные клетки более чувствительны к условиям гипотермического хранения в сравнении с клетками глии.

Studying the influence of hypothermic conditions on the viability of isolated neuronal cells (NCs) of different developmental level has been actual for cryobiology, transplantology and medicine. This research aim was to study the effect of hypothermic storage (HS) of isolated NCs of fetal and neonatal rat brain in the media of different composition on their behavior *in vitro*.

Neuronal cells were procured from brain tissues of rat embryos of 15–16 gestation days and newborn ones. The cells were stored for 1, 2, 3, 4 and 5 days at 8°C in DMEM/F12 medium supplemented with rat blood serum. They were cultured in 2×10^6 cells/ml concentration in DMEM/F12 medium, enriched with 10% serum. The cell viability was assessed by trypan blue test. Cells were stained for neuronal marker β -tubulin III.

During the 1st day of HS there was observed an increase in viability of all studied cells by 1.5–2 times, which remained almost unchanged during following storage. In this case a number of cells was reduced.

Hypothermic storage of embryonic NCs up to 3 days did not change the cell behavior in culture as compared with the control. Neuronal cells formed the aggregates, from which the neurons and glial cells migrated after attaching. After glial monolayer formation there were appeared the neuroblasts and cell colonies, during 4 days the HS was characterized by a decreased number of cells with neuronal morphology and a lower rate of glial monolayer formation. After 5 days of HS the neuronal cells formed small loose aggregates with a low ability for adherence. In this case the migrating cells were mainly presented by glial cells, characterized by low proliferation. The monolayer area did not exceed 20% of the well bottom surface. The neonatal NCs behavior in culture after HS for up to 2 days did not differ from that of initial cells. There were formed the multi-cell aggregates, attached to the substrate, after that there was the migration of neurons and glial cells. The monolayer of glial cells was formed, where neuroblasts and cell colonies appeared. The culturing of neonatal NCs after 3 days of HS was characterized by the attachment and flattening of single glial cells, as well as by formation of small loose aggregates, not attached to the substrate, then dissociated into single cells and died.

Thus, the neonatal NCs are more sensitive to HS conditions as compared to embryonic cells. Thereat the neuronal cells are more sensitive to hypothermic storage conditions compared to glial ones.

Сочетанное действие глицерина и предварительного обезвоживания на гипертонический шок эритроцитов человека

Н.М. ШПАКОВА, Н.В. ОРЛОВА, Е.Е. НИПОТ, Д.И. АЛЕКСАНДРОВА, С.С. ЕРШОВ, О.А. ШАПКИНА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Combined Effect of Glycerol and Preliminary Dehydration on Hypertonic Stress of Human Erythrocytes

N.M. SHPAKOVA, N.V. ORLOVA, E.YE. NIPOT, D.I. ALEKSANDROVA, S.E. ERSHOV, O.A. SHAPKINA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Предварительное инкубирование эритроцитов млекопитающих в средах, содержащих непроникающие в клетку компоненты и характеризующихся определенным диапазоном осмолярности, формирует устойчивость клеток к последующему действию гипертонического шока.

Цель работы – исследовать сочетанное действие проникающего криопротектора глицерина и предварительного обезвоживания эритроцитов человека на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку (4,0 моль/л NaCl при 37 и 0°C).

Предварительное обезвоживание эритроцитов человека в средах 0,2–0,8 моль/л NaCl приводит к немоному изменению их гипертонической чувствительности при перенесении в среду 4,0 моль/л NaCl. Минимальное значение гемолиза наблюдается после инкубации клеток в 4,0 моль/л NaCl. Инкубация эритроцитов человека с глицерином (0,5; 1,0 и 2,0 моль/л) в физиологической среде снижает уровень гипертонического гемолиза эритроцитов в 3–5 раз, причем это снижение практически не зависит от концентрации криопротектора.

Добавление глицерина в среды обезвоживания при 0°C расширяет диапазон концентраций NaCl, при которых формируется устойчивое состояние клеток к действию гипертонического шока. При этом снижение чувствительности эритроцитов к гипертоническому гемолизу при сочетанном действии глицерина и предварительного обезвоживания в солевых средах происходит во всем диапазоне исследуемых концентраций (0,2–0,8 моль/л).

При 37°C наблюдается аналогичная картина, однако в этом случае использование глицерина на этапе предварительного обезвоживания клеток позволяет не только расширить диапазон осмотической устойчивости, но и дополнительно снизить уровень гипертонического гемолиза эритроцитов в 2–3 раза.

Таким образом, сочетанное использование глицерина как проникающего криопротектора и NaCl как непроникающего вещества (в умеренно гипертонических концентрациях) позволяет в значительной степени снизить уровень гипертонического повреждения эритроцитов человека.

Preliminary incubation of mammalian erythrocytes in the media, containing the non-penetrative into cell components and characterizing by the certain osmolarity range, forms the cell resistance to following effect of hypertonic stress.

This research was aimed to study a combined effect of penetrative cryoprotectant glycerol and preliminary dehydration of human erythrocytes on erythrocyte sensitivity to hypertonic stress (4.0 mol/l NaCl at 37 and 0°C).

Preliminary dehydration of human erythrocytes in the media of 0.2–0.8 mol/l NaCl results in a non-monotonous change of their hypertonic sensitivity under transfer into the medium of 4.0 mol/l NaCl. The minimum hemolysis value was observed after cell incubation in 4.0 mol/l NaCl. Human erythrocyte incubation with glycerol (0.5; 1.0 and 2.0 mol/l) in physiological medium reduces the level of erythrocyte hypertonic hemolysis in 3–5 times, moreover this decrease is practically independent on cryoprotectant concentration.

Glycerol adding into the dehydration media at 0°C extends the range of NaCl concentration, where a resistant cell state to hypertonic stress effect is formed. At the same time a decrease in erythrocyte sensitivity to hypertonic hemolysis under a combined effect of glycerol and preliminary dehydration in saline media occurs within the whole range of the studied concentrations (0.2–0.8 mol/l).

Similar picture is observed at 37°C, but in this case the use of glycerol at the stage of preliminary cell dehydration enables not only the widening of osmotic resistance range, but an additional reduction in the level of erythrocyte hypertonic hemolysis in 2–3 times.

Thus, combined use of glycerol as penetrative cryoprotectant and NaCl as non-penetrative substance (in moderately hypertonic concentrations) enables a significant reduction of the hypertonic damage level in human erythrocytes

Улучшение выживаемости клеток после криоконсервирования за счет альгинатной инкапсуляции

О. ГРИШКОВ, Н. ХОФМАНН, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Alginate Encapsulation Technology Improves Survival of Living Cells Post-Cryopreservation

O. GRYSHKOV, N. HOFMANN, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Germany

Инкапсуляция живых клеток в полупроницаемые матрицы была предложена как наиболее перспективный метод лечения хронических заболеваний. Однако доступность некоторых типов клеток, таких как стволовые клетки человека, в свою очередь, увеличивает потребность в том, чтобы такие клетки хранились в течение длительного времени обычно с использованием метода криоконсервирования, которое может причинить вред клеткам. Полупроницаемые мембраны, выступая в качестве резервуаров для криопротекторов (КП), могут защитить клетки при криоконсервировании. Кроме того, небольшие микрокапсулы на основе альгината (300 мкм) имеют больше преимуществ по сравнению с более крупными в случае трансплантации и криоконсервирования благодаря большей удельной площади поверхности и меньшему содержанию воды в них.

В связи с этим нами показана возможность применения технологии инкапсуляции с использованием альгината для увеличения жизнеспособности клеток после криоконсервирования, а также для поддержания нормальной скорости их пролиферации после оттаивания. Фибробласты NIH 3T3 (5×10^6 кл/мл) были инкапсулированы в 1,5 или 2,0% (масса/объем) альгинатных микрокапсулах (диаметр ~250 мкм) в стерильных условиях с использованием технологии с высоким напряжением и ранее оптимизированных параметров. Криоконсервирование проводили с протоколом 2 К/мин до -30°C и при 5К/мин от -30 до -80°C , использовали среду DMEM с 20% FCS и 10% DMSO. Размораживание проводили при 20°C с использованием стандартного оборудования. Пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных клеток до криоконсервирования и после оттаивания оценивали с помощью тестов MTT и Calcein AM/Ethd соответственно. С помощью микроскопа «Carl Zeiss Axiovert 200M» при увеличении $5\times$ или $10\times$ и программы «AxioVision V 4.8.2.0» наблюдали за изменениями в морфологии альгинатных микрокапсул. Фибробласты NIH 3T3 инкапсулировали в альгинатные микрокапсулы при концентрации около 130 ± 24 клеток на капсулу. Предварительные результаты выживаемости клеток после инкапсуляции выявили, что электрораспыление является подходящим методом для заключения живых клеток. Микроскопические наблюдения показали, что низкотемпературная обработка и последующее оттаивание существенно не влияют на морфологию альгинатных капсул – они были стабильными и округлой формы. Результаты анализа жизнеспособности клеток показали увеличение жизнеспособности инкапсулированных клеток на 10% после криоконсервирования по сравнению с неинкапсулированными. Анализ пролиферации с MTT показал, что клетки делятся и после оттаивания. Для дальнейшего повышения жизнеспособности клеток необходимо найти наиболее подходящие методы замораживания-оттаивания, а также альтернативные и наиболее безопасные для клеток КП.

Encapsulation of living cells into semi-permeable matrices has been proposed as a most promising method to treat chronic disorders. However, the availability of some cell types such as human stem cells, in turn, promotes the need for such cells to be preserved for longer periods of time, commonly using cryopreservation procedures, which can cause injuries to the cells. Semi-permeable membranes might protect the cells during cryopreservation, serving as reservoirs for cryoprotective agents (CPAs). Additionally, smaller alginate-based micro-capsules (300 μm) offer more advantages over larger ones for transplantation and cryopreservation owing to higher specific surface area and less water content.

Herein we indicate the possibility for alginate-based encapsulation technology to improve the post-cryopreservation viability of living cells as well as to support their normal rate of proliferation after thawing. NIH 3T3 fibroblasts (5×10^6 cells/ml) were encapsulated into 1,5% or 2,0% (w/v) alginate micro-capsules (diameter ~250 μm) under sterile conditions using high-voltage processes based on previously optimized parameters. Cryopreservation was conducted under 2 K/min to -30°C and 5 K/min from -30°C to -80°C freezing protocol using DMEM, 20% FCS, 10% DMSO as freezing medium. Thawing was performed at 20°C using standardized equipment. The proliferation and viability of encapsulated cells before cryopreservation and after thawing was measured using MTT and Calcein AM/Ethd assays respectively. The change in morphology of alginate micro-capsules was observed under Carl Zeiss Axiovert 200M microscope using $5\times$ or $10\times$ magnifications and AxioVision V 4.8.2.0 built-in software.

NIH 3T3 fibroblasts cells have been encapsulated into alginate micro-capsules at a density of approximately 130 ± 24 cells per capsule. Preliminary results on cell survival after encapsulation found that electrospraying is a suitable technique for living cells entrapment. Microscopic observations showed that low temperature treatment and further thawing did not significantly affect the morphology of alginate capsules - they appeared to be stable and round in shape. The results of cell viability assays indicated an increase in viability of encapsulated cells post-cryopreservation as compared to non-encapsulated by 10%. The MTT proliferation assay showed that cells proliferate well after thawing. In order to further improve the viability of cells, the most suitable freezing and thawing protocol as well as the finding of alternative and less-harmful for the cells CPAs are of necessary and will supplement this study.

Клеточная инкапсуляция в полупроницаемые альгинатные микрокапсулы с использованием высокого напряжения

О. ГРИШКОВ, Х. ЦЕРНЕЧ, Т. ХАКРАДЕО, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Cell Encapsulation in Semi-Permeable Alginate Micro-Capsules Using High Voltage Processes

O. GRYSHKOV, H. ZERNETSCH, T. CHAKRADEO, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz University Hannover, Germany

Клеточная терапия имеет большой потенциал лечения широкого спектра заболеваний (печеночная недостаточность, болезнь Паркинсона и др.). Инкапсуляция живых клеток в полупроницаемые мембраны (например, альгинатные микрокапсулы) была предложена как средство избежания нежелательного иммунного ответа реципиента, достижения контролируемой доставки терапевтических веществ, произведенных инкапсулированными клетками, и долгосрочного выхода терапевтических веществ. Большой интерес в костно-тканевой инженерии также представляют быстро деградирующие микрокапсулы на основе альгината, содержащие стволовые клетки. Размер альгинатных микрокапсул, их проницаемость и скорость деградации должны соответствовать типу живых клеток и скорости их пролиферации, которые используются для инкапсуляции.

В этой работе представлена возможность инкапсуляции живых клеток в альгинатные микрокапсулы с помощью электрораспыления. Раствор полимерного альгината находится внутри шприца и откачивается через наконечник с помощью электрического поля с высокой напряженностью в заземленную ванну со сшивающим раствором CaCl_2 . При попадании в сшивающий раствор альгинат сразу превращается в гель за счет быстрого физико-химического взаимодействия между сшиваемыми агентами. Для получения мелких микрокапсул с регулируемым распределением размеров были оптимизированы такие параметры процесса, как: концентрация альгината, скорость потока, расстояние распыления, прикладываемое напряжение, концентрация сшивающего раствора. Фибробласты NIH 3T3 были инкапсулированы при различных концентрациях (10^6 , 5×10^6 , 10^7 кл/мл) в стерильных условиях. Распределение размеров микрокапсул, а также эффективность инкапсуляции клетки изучали с помощью микроскопа «Carl Zeiss Axiovert 200M» с 5- или 10-кратными увеличениями и программного обеспечения «AxioVision V 4.8.2.0».

При электрораспылении размер микрокапсулы альгината можно регулировать путем корректировки одного или нескольких оптимизированных параметров. Было показано, что точное управление диаметром гранулы возможно только при распылении струйного потока (от 15–17 кВ). Существенного влияния скорости потока на гранулу не наблюдается (в пределах напряженности электрического поля 2 кВ/см). Было обнаружено, что напряжение и концентрация альгината являются наиболее значимыми параметрами, определяющими размеры микрокапсул, в то время как концентрация CaCl_2 в основном влияет на их морфологию и однородность. Эффективность клеточной инкапсуляции, а также диаметр гранулы можно контролировать с помощью концентрации клеток, скорости потока, прикладываемого напряжения, концентрации сшивающего раствора. Кроме того, было установлено, что увеличение начальной концентрации клеток приводит к уменьшению диаметра микрокапсул. Проведенные эксперименты по выживаемости клеток после инкапсуляции доказали эффективность технологии клеточной инкапсуляции в альгинатные полупроницаемые полимерные матрицы с использованием высокого электрического напряжения.

Cell therapies have a great potential to treat a wide variety of diseases (liver failure, Parkinson disease *etc.*). Encapsulation of living cells in semi-permeable membranes (such as alginate microcapsules) has been proposed as a means to avoid undesired host immune response, to achieve controlled delivery of therapeutic products produced by encapsulated cells and to continuously release therapeutic products for longer durations [1]. Fast degradable alginate-based micro-capsules containing stem cells are also of great interest in bone-tissue engineering [2]. Size of alginate micro-capsules, their permeability and degradation rate should be previously matched with the type of living cell and their proliferation rate being used for encapsulation.

This work indicates the possibility to encapsulate living cells into alginate micro-capsules using electrospraying. Alginate polymer solution is kept inside the syringe and pumped through the nozzle applied high-strength electric field into the grounded bath with CaCl_2 cross-linking solution. When being dropped into the cross-linking solution, alginate becomes immediately gelled due to the fast physico-chemical interaction between cross-linkable agents. To provide small micro-capsules with controlled size distribution the process parameters (alginate concentration, flow rate, spraying distance, applied voltage, concentration of cross-linking solution) were optimized. NIH 3T3 fibroblasts cells were encapsulated at different densities (10^6 , 5×10^6 , 10^7 cells/ml) under sterile conditions. Size distribution of micro-capsules as well as cell encapsulation efficiency was studied using Carl Zeiss Axiovert 200M microscope with 5× or 10× magnifications and AxioVision V 4.8.2.0 built-in software.

Using electro-spraying the size of alginate micro-capsules can be controlled by adjusting one or a couple of optimized parameters. It has been shown that the precise control over the bead diameter is only possible when spraying in jet flow regime (ranging from 15–17 kV). No significant effect of flow rate on bead diameter (within strength of electric field 2 kV/cm) has been observed. Voltage and alginate concentration were found to be the most important parameters that determine the micro-capsules size, while CaCl_2 concentration affects mainly their morphology and homogeneity. Cell encapsulation efficiency as well as bead diameter can be controlled by cell density, flow rate, applied voltage, concentration cross-linking solution. Moreover, it has also been observed that an increase in initial cell concentration causes a decrease in micro-capsules diameter. Previous experiments on cell survival post encapsulation process have proven the effectiveness of cell encapsulation technology into alginate semi-permeable polymer matrices using high-voltage processes.

Криоконсервирование мезенхимальных стволовых клеток приматов с использованием антиоксидантов как дополнительных криопротекторов

Н. Хофманн¹, Т. Мюллер², Д. Погожих^{1,3}, Б. Гласмахер¹

¹Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

²Институт трансфузионной медицины, Высшая медицинская школа Ганновера, Ганновер, Германия

³Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Primate Mesenchymal Stem Cells With Antioxidants as Additional CPA

N. Hofmann¹, T. Mueller², D. Pogozykh^{1,3}, B. Glasmacher¹

¹Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universitaet Hannover, Hannover, Germany

²Institute for Transfusion Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany

³Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Kharkov, Ukraine

Стволовые клетки могут использоваться в клинической терапии и регенеративной медицине. Одной из основных проблем, касающихся применения этих клеток, является разработка эффективного протокола криоконсервирования, так как используемые в настоящее время методы обеспечивают низкие жизнеспособность и уровень дифференцировки. Высокая выживаемость зависит от выбора оптимальной скорости охлаждения, соответствующего криопротектора (КП) в необходимой концентрации. Однако наиболее широко используемый КП диметилсульфоксид (ДМСО) токсичен при высоких концентрациях и оказывает негативное влияние на биологическую функцию клетки. Таким образом, значительный интерес представляет разработка новых стратегий криозащиты с заменой используемых в настоящее время КП или уменьшением их концентрации. Поскольку одним из основных повреждающих факторов является наличие активных форм кислорода во время и после оттаивания, мы исследовали добавление аскорбиновой кислоты и α -токоферола в качестве потенциальных антиоксидантов.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*) замораживали в 200 мкл ПЦР-пробирках 200 мкл (5×10^5 клеток/мл) с оптимальной скоростью охлаждения (полученной в параллельном исследовании) в μ -замораживателе. Различные концентрации аскорбиновой кислоты (50, 100 и 250 мкмоль) и α -токоферола (100, 200 и 500 мкмоль) были изучены отдельно или в комбинации с ДМСО (2.5 и 5% об.). Клетки, прикрепившиеся к поверхности культурального флакона, после 24 ч рекультивирования считались жизнеспособными, выживаемость сравнивали с клетками, замороженными с ДМСО (положительный контроль). Далее выжившие клетки проверяли на способность к дифференциации.

Добавление 200 мкмоль α -токоферола увеличивало выживаемость МСК приматов после криоконсервирования даже с 2,5% ДМСО. С использованием 100 мкмоль α -токоферола и 5% ДМСО сохранность была в два раза выше, чем с добавлением только 5% ДМСО. Аскорбиновая кислота незначительно влияла на выживаемость МСК. Внутриклеточные липосомы были четко окрашены масляным красным О, что доказывало способность к адипогенной дифференцировке МСК игрунок обыкновенных после криоконсервирования с добавлением антиоксидантов.

Мы благодарим Л. Смита и Б. Зингерофа за оказанную техническую помощь. Эта работа финансируется Немецким научно-исследовательским обществом для кластера передового опыта REBIRTH (EXC 62/1).

Stem cells have potential use in clinical therapy and regenerative medicine. One of the major challenges regarding the application of these cells is the development of an efficient cryopreservation protocol, since currently used methods exhibit poor viability and differentiation rates. A high survival rate is a function of optimal cooling rate, appropriate cryoprotective agent (CPA) and its adjusted concentration. The most widely used CPA, dimethyl sulfoxide (Me_2SO), however is toxic at high concentrations and has detrimental effects on the biological functioning of a cell. Therefore, it is of great interest to develop new cryoprotective strategies to replace currently used CPAs or to reduce their concentration. Since one of the major damaging factors is the occurrence of reactive oxygen species during and after thawing we have investigated the addition of ascorbic acid and α -tocopherol as potential antioxidants.

Mesenchymal stem cells (MSC) from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) were frozen in 200 μl PCR-tubes (5×10^5 cells/ml) with optimal cooling rate (gained from a parallel study) in a μ -freezer device. Different concentrations of ascorbic acid (50, 100 and 250 mM) and α -tocopherol (100, 200 and 500 μM) were studied exclusive or in combination with Me_2SO (2.5 and 5% v/v). Cells attached to the culture flask surface after 24 h recultivation were considered as viable, the survival rate was compared to that of cells frozen with Me_2SO as positive control. Survived cells were further tested for differentiation capability.

The addition of 200 μM α -tocopherol improved the survival of primate MSCs after cryopreservation even with 2.5% Me_2SO . With 100 μM α -tocopherol and 5% Me_2SO survival was more than two fold higher than with 5% Me_2SO alone. Ascorbic acid had no considerable effect on the survival rate of MSCs. Intracellular lipid vesicles were clearly stained by Oil Red O and proved the adipogenic differentiation capability of marmoset MSCs after cryopreservation with antioxidant addition.

Accessory application of α -tocopherol improved survival and proliferation of MSCs from the marmoset monkey after cryopreservation. Me_2SO could be reduced to moderate concentrations. These findings will be transferred on the cryopreservation of induced pluripotent stem cells in further studies.

We thank L. Smits and B. Zingerov for their outstanding technical assistance. This work is supported by funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft for the Cluster of Excellence REBIRTH (EXC 62/1).

Разработка стратегии криоконсервирования эквивалента роговицы человека

И. БЕРНЕМАНН¹, С. РАЙХЛ², Б. ГЛАСМАХЕР¹, Н. ХОФМАНН¹

¹Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

²Институт фармацевтической технологии, Технический университет Брауншвейга, Брауншвейг, Германия

Development of a Cryopreservation Strategy for a Human Corneal Equivalent

I. BERNEMANN¹, S. REICHL², B. GLASMACHER¹, N. HOFMANN¹

¹Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universitaet Hannover, Hannover, Germany

²Institute for Pharmaceutical Technology, Technische Universitaet Braunschweig, Braunschweig, Germany

В настоящее время криоконсервирование является единственным методом длительного хранения клеток и тканей. Однако эффективность охлаждения и оттаивания тканей и продуктов тканевой инженерии вызывают интерес. Так, до сих пор не определены успешные стратегии криоконсервирования роговицы человека. Целью этого исследования является разработка протокола эффективной транспортировки и хранения эквивалента «полуроговицы» (hemisocnea) человека, который используется как модель *in vitro* для исследования трансроговичного всасывания препаратов.

В первую очередь мы использовали разработанный системный подход для оптимизации параметров охлаждения и оттаивания для каждого типа клеток конструкции «полуроговицы», что важно для эффективного криоконсервирования. Скорость охлаждения 0,2 К/мин, использованная для эпителиальных клеток роговицы человека (HCE-T-клетки), обеспечила высокую выживаемость, а в случае кератиноцитов человека (HCK-Ca-клеток) оптимальной была скорость охлаждения от 5 до 10 К/мин. Несмотря на эту разницу, приемлемая выживаемость обоих клеточных компонентов может быть достигнута путем подбора как состава криопротекторов, так и концентрации их смесей. Результаты исследования использовали в экспериментах по криоконсервированию «полуроговичных» 3D-конструкций. В соответствии с протоколом можно сохранить основные свойства относительно важных барьерных характеристик этой модели *in vitro*, которые были оценены путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления и проницаемость Na-флуоресцеина как маркерного вещества. Данные барьерной функции эпителия показали, что полученные результаты позволяют разработать эффективный протокол низкотемпературного хранения конструкции «полуроговицы» человека. Кроме того, в будущем это даст новые возможности для создания низкотемпературных банков роговиц.

Это исследование финансируется Федеральным институтом оценки рисков (BFR) в рамках гранта №1328-488.2. Мы благодарим М. Ханэ и А. Бринкманна за помощь в создании полуроговичной конструкции.

Currently, cryopreservation is the only method for long-term storage of living cells and tissues. However effective cooling and thawing of tissue and tissue engineered products pose a specific challenge. Due to this so far no successful cryopreservation strategy for human cornea is established. Aim of this project was to develop a protocol for effective transport and storage of a human hemi-cornea equivalent that is used as *in vitro* model for transcorneal drug absorption studies.

Since effective cryopreservation requires optimization of cooling and thawing parameters for every cell type we firstly used a systematic approach to optimize these conditions for the 2 different cell types of the hemi-cornea construct. For human corneal epithelial cells (immortalised HCE-T cells) a cooling rate of 0,2 K/min led to the highest survival rates whereas human keratinocytes (HCK-Ca cells) showed optimal survival with cooling rates of 5 to 10K/min. Despite this discrepancy acceptable cell survival of both cellular components could be achieved by adaption the cryoprotective agent (CPA) both regarding the composition and the concentration of the CPA mixture. The findings are transferred to the cryopreservation experiments with the 3D hemi-cornea constructs. With the applied protocol the main properties with respect to the important barrier characteristics of the *in vitro* model could be maintained. This was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance and permeation of Na-fluorescein as marker substance. The data for the epithelial barrier function showed promising results to develop an effective protocol for a low temperature storage of the human hemi-cornea construct. Furthermore this will offer new options for corneal graft banking in the future.

This work is supported by funding from the German Federal Institute for Risk Assessment (BFR) under the grant no. 1328-488.2. We thank M. Hahne and A. Brinkmann for their support with HCC construction.

Вплив екстракту селезінки на пептидний склад шкіри щурів та процес загоєння холодкових ран

О.О. БОГАТИРЬОВА, І.Г. БОРИСЕНКО, А.В. ШИНДЕР, Н.Ю. ШКОДОВСЬКА,
С.Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б.П. САНДОМИРСЬКИЙ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Spleen Extract on Peptide Content of Rat Skin and Healing of Cold Injuries

O.O. BOGATYREVA, I.G. BORISENKO, A.V. SHINDER, N.YU. SHKODOVSKA, S.YE. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Дослідження впливу малих доз біологічно активних речовин представляє значний інтерес, оскільки ефекти малих доз можуть бути пов'язані з тим, що організм реагуватиме не на концентрацію речовини, а на зміну її концентрації.

Екстракт отримували з кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней (ЕСС) або з фрагментів шкіри щурів шляхом інкубації в фізіологічному розчині протягом 60 хв та видалення термолабільних білків. Щури з холодовою травмою були розділені на групи: контрольні (введення фізіологічного розчину) та дослідні (введення ЕСС). Щурам з холодовою травмою ЕСС вводили у черевну порожнину по 1 мл один раз на добу. Доза пептидів становила 50 мкг/100 г маси. При виконанні роботи використовували наступні методи дослідження: планіметричний, спектрофотометричний, гель-проникаючої хроматографії, хемілюмінесцентний, гістологічний. Проводили аналіз лейкоцитарних формул крові.

На хроматограмах екстракту нативної шкіри щурів реєструються 3 піки, через добу після введення ЕСС (доза пептидів 1000 мкг) – 5 піків. Після введення пептидів у дозі 100 мкг збільшується кількість піків на хроматограмах. В цьому випадку реєструються 10 піків.

При введенні тваринам пептидів у дозах 10, 1, 0,1 та 0,01 мкг також реєструється 5 піків. При цьому молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах шкіри такий же, як і при введенні пептидів в дозі 1000 мкг, і не залежить від дози введених пептидів ЕСС і практично не відрізняється від розподілу пептидів після введення пептидів в дозі 1000 мкг. Піки, характерні для нативної шкіри, реєструються на хроматограмах при всіх умовах експерименту.

Встановлено, що холодкові рани у щурів, яким вводили ЕСС, загоюються більш швидкими темпами, ніж у контрольних. При цьому зменшуються інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів та рівень ТБКАП у сироватці крові тварин.

Введення ЕСС прискорює регенерацію епітелію та утворення в дермі похідних шкіри в порівнянні з контрольною групою, а прискорення загоєння ран після введення екстрактів не впливає на якість цього процесу.

Аналіз лейкоцитарних формул крові контрольних та дослідних щурів дозволив зробити висновок, що введення тваринам ЕСС зменшує вираженість процесу запалення та нормалізує імунну реакцію організму на холодову травму.

The studies of the influence of biologically active substances of small doses are of considerable interest because the effects of low doses may be associated with the fact that an organism will not respond to the concentration of the substance, but to the change of its concentration.

The extract was obtained from cryopreserved porcine spleen fragments (PCE) or fragments of rat skin by incubation in saline for 60 min and removal of thermolabile proteins. Rats with cold injury were divided into the groups: control (introduction of saline) and experimental (administration of PCE) ones. Rats with cold injury were injected with 1 ml PCE into abdominal cavity once a day. The dose of peptide was 50 µg/100 g of mass. When performing the work we used the following methods: planimetry, spectrophotometry, gel chromatography, chemiluminescence, histology. The WBC differential analysis was carried-out.

In the chromatograms of rat native skin extract three peaks were recorded, one day after introduction of PCE (peptide dose of 1,000 µg) 5 peaks were found. After the introduction of peptides in the amount of 100 µg the number of peaks increases in the chromatograms. In this case 10 peaks are recorded.

After peptides injection into animals in the amounts of 10, 1, 0.1 and 0.01 µg five peaks were also found. Thereat, the molecular mass distribution of peptides in skin extracts is the same as after introduction of peptides in 1,000 µg amount and it does not depend on the amount of introduced PCE peptides and almost does not differ from the distribution of peptides after administration of peptides in amount of 1,000 µg. Peaks characteristic for native skin are recorded in chromatograms under all the experimental conditions.

We have found that cold injuries in rats injected with PCE are healed more rapidly than in the control animals. Herewith, the intensity of free radical oxidation of lipids and TBA active products level decrease in blood serum of animals.

Introduction of PCE accelerates the regeneration of epithelium and formation in the derma of skin derivatives in comparison with the control group, and the acceleration of wound repair after administration of the extracts does not affect the quality of this process.

Analysis of WBC differential for the control and experimental rats allowed to conclude that the introduction of PCE in animals reduces the severity of inflammation and normalizes the immune response of an organism to cold injury.

Применение криоконсервированной кордовой крови в комплексной терапии острого гнойного перитонита у крыс

К.А. ГОЛЬЦЕВ¹, И.А. КРИВОРУЧКО², К.А. АЖГИБЕСОВ², О.В. САФРАНЧУК¹,
О.Ю. КОЖИНА¹, М.В. ОСТАНКОВ¹, А.Н. ГОЛЬЦЕВ¹

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

²Харьковский национальный медицинский университет

Use of Cryopreserved Cord Blood in Treatment of Acute Purulent Peritonitis in Rats

K.A. GOLTSEV¹, I.A. KRIVORUCHKO², K.A. AZHGIBESOV², O.V. SAFRANCHUK¹,
O.YU. KOZHINA¹, M.V. OSTANKOV¹, A.N. GOLTSEV¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Kharkov National Medical University, Kharkov, Ukraine

В свете новых диагностических технологий очевидна необходимость изучения роли иммунного воспаления при перитоните. Это позволит оптимизировать схемы и повысить эффективность применения иммуномодулирующей терапии, направленной на уменьшение реакции локального воспаления, минимизацию риска развития аутоиммунной агрессии, нарушений гомеостаза организма в целом, снижение показателей инвалидности и летальности пациентов. Для лечения острого гнойного перитонита (ОГП) в данных исследованиях была апробирована криоконсервированная кордовая кровь человека (кККЧ) как потенциальный корректор состояния иммунной системы организма экспериментальных животных.

Оценивали эффективность корригирующего влияния кККЧ в комплексном лечении крыс с ОГП на медиаторы воспаления (ИФН- α и ИЛ-10 цитокины; С-реактивный белок (С-РБ)), показатели крови и выживаемости животных. Моделировали ОГП у 6-месячных крыс линии Вистар массой 160–180 г. Под общим тиопенталовым наркозом животным перевязывали и отсекали червеобразный отросток, который оставляли в брюшной полости. Все крысы были разделены на группы: 1 – интактные (контроль); 2 – ОГП, релапаротомия через 24 ч после операции и санации брюшной полости раствором «Фурацилина»; 3 – релапаротомия и инъекция «Ампициллина»; 4 – релапаротомия, инъекция «Ампициллина» с введением кККЧ в объеме 0,3 мл; 5 – релапаротомия с введением кККЧ. Все показатели оценивали на 1, 3, 5-е сутки после релапаротомии. Концентрацию цитокинов ИЛ-10 и ИФН- α определяли по количеству рецепторов в пермебилизированных клетках селезенки методом проточной цитофлуориметрии («FACS Calibur», «BD», США). Оценивали концентрацию С-РБ в сыворотке крови методом латексной агглютинации. Исследовали клинические показатели крови и оценивали выживаемость животных.

Проведенное исследование выявило взаимосвязь между различными маркерами иммунного воспаления и их ролью в патогенезе ОГП. Показано, что применение кККЧ с антибиотиком во время релапаротомии положительно влияет на содержание медиаторов воспаления: концентрацию провоспалительного (ИФН- α) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов, уровень С-РБ, показатели крови, а также на показатели выживаемости животных. Полученные результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать кККЧ с антибиотиком и релапаротомией для клинического применения при лечении ОГП.

In view of new diagnostic technologies the need to study the role of immune inflammation in peritonitis is obvious. This will allow to optimize the treatment protocols and increase the effectiveness of immune modulating therapies directed to reduce the local inflammatory response, minimize the risk of autoimmune aggression and disorders of homeostasis of an organism in a whole, reducing the degree of disability and mortality in patients. For the treatment of acute purulent peritonitis (APP) in our study we tested cryopreserved human cord blood (CHCB) as a potential correcting agent of an organism immune system in experimental animals.

We evaluated the effectiveness of CHCB correcting effect in complex treatment of rats with APP on inflammatory mediators (IFN- α and IL-10 cytokines, C-reactive protein (CRP)), blood indices and animals' survival. APP was modeled in 6-month-old Wistar rats of 160–180 g. Under general thiopental anesthesia the animals' appendix were ligated, cut-off, and left in the abdominal cavity. All the rats were divided into groups: 1 – intact (control), 2 – APP, relaparotomy in 24 hrs after surgery and sanitation of abdominal cavity with Furacilin solution, 3 – relaparotomy and Ampicillin injection, 4 – relaparotomy, Ampicillin injection and 0.3 ml CHCB introduction, 5 – relaparotomy with CHCB introduction. All the indices were evaluated at 1, 3, 5 days after relaparotomy. The concentration of IL-10 and IFN- α were determined by the number of receptors in the permeabilized spleen cells by flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA). The concentration of CRP in serum by latex agglutination was assessed. The clinical blood indices and the survival of animals were evaluated.

The study revealed a relationship between the markers of immune inflammation and their role in pathogenesis of APP. It has been shown that the application of CHCB with antibiotics during relaparotomy positively affects the content of inflammatory mediators: the concentration of pro-inflammatory (IFN- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, CRP, blood indices, as well as the survival of animals. The obtained experimental results allow us to recommend CHCB with antibiotics and relaparotomy for clinical use in the treatment of APP.

К вопросу поиска новых эффективных криозащитных растворов

А.Н. Худяков¹, О.О. Зайцева¹, Т.В. Полежаева¹, Д.С. Лаптев¹,
О.Н. Соломина¹, А.А. Костяев², С.В. Утемов², Ф.С. Шерстнёв²

¹ФГБУН "Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН", г. Сыктывкар, Россия

²ФГБУН "Кировский научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови ФМБА России", г. Киров

To the Question of Searching New Effective Cryoprotective Solutions

A.N. KHUDYAKOV¹, O.O. ZAITSEVA¹, T.V. POLEZHAYEVA¹, D.S. LAPTEV¹,
O.N. SOLOMINA¹, A.A. KOSTYAEV², S.V. UTEMOV², F.S. SHERSTNEV²

¹Institute of Physiology, Komi Science Center, The Urals Branch, the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

²Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia, Kirov, Russia

Целью данной работы явилось изучение возможности применения консервантов различной природы для сохранения клеток при температуре -80°C .

Объектом исследования были лейкоцитные концентраты (ЛК) крови здоровых доноров-добровольцев в объеме 17 ± 2 мл. При замораживании клеток использовали 2 варианта криоконсерванта. Основой первого являлось производное мочевины (ГМБТОЭМ). Дополнительно он содержал протектор ДМСО и реставрирующую добавку на основе янтарной кислоты. В основу второго криоконсерванта входил природный нетоксичный пектин, выделенный из раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* L.), а также глицерин. Консервант смешивали с ЛК в соотношении 1:1, время экспозиции составляло 20 мин. Замораживание проводили в пластикатных контейнерах по нелинейной программе до -80°C , хранили в течение 1 суток с последующим отогревом в водяной ванне при 38°C . Состояние лейкоцитов оценивали по общепринятым лабораторным методикам (общее количество лейкоцитов, эозинорезистентность, количество гранулоцитов, фагоцитарная активность нейтрофилов, содержание лизосомально-катионных белков).

При использовании первого раствора ($n = 10$) общее количество лейкоцитов сохраняется на уровне $95,9 \pm 3,9\%$ (от исходного значения), гранулоцитов – $94,5 \pm 6,9\%$, из них $78,1 \pm 5,9\%$ способны после отогрева образовывать фагосомы, $90,9 \pm 7,1\%$ лейкоцитов остаются устойчивыми к витальному красителю эозину, содержание в нейтрофилах лизосомально-катионных белков составляло $93,8 \pm 9,4\%$.

Применение второго раствора ($n = 10$) позволило сохранить $83,7 \pm 6,7\%$ лейкоцитов, из которых $78,8 \pm 9,2\%$ были устойчивы к эозину, $64,9 \pm 9,3\%$ проявили способность к фагоцитозу, а содержание в нейтрофилах лизосомально-катионных белков составляло $93,4 \pm 4,7\%$.

Исследования показали возможность применения как искусственно синтезированных, так и природных криофилактиков для сохранения клеток при температуре -80°C . Учитывая возрастающий интерес к изучению растительных пектинов в связи их иммуномодулирующим действием, использование данного класса соединений, в том числе в качестве криопротекторов, является в настоящее время перспективным направлением.

Авторы выражают благодарность РФФИ за оказанную финансовую поддержку (грант № 12-04-32207).

The research aim was to study the possibility of using the preservatives of different nature to store cells at -80°C .

The study involved the leukocyte concentrates (LC) of blood from healthy volunteer donors in the amount of 17 ± 2 ml. When freezing the cells there were used 2 variants of cryopreservative. The base of the first one was urea derivative, hexamethylene bis-tetra oxyethyl urea. Additionally it contained DMSO protectant and restoring additive based on succinate. The base of the second cryopreservative was non-toxic natural pectin isolated from *Rauwolfia serpentina* L., and glycerol. Preservatives were mixed with LC in 1:1 ratio, the exposure time was 20 min. Freezing was performed in plastic containers according to non-linear program down to -80°C and kept for 1 day, and after that thawed in a water bath at 38°C . The state of leukocytes was assessed by standard laboratory methods (total number of leukocytes, eosin resistance, number of granulocytes, phagocytic activity of neutrophils, content of lysosomal-cationic proteins).

When using the first solution ($n = 10$) the total number of white blood cells was $95.9 \pm 3.9\%$ (of initial value), there were $94.5 \pm 6.9\%$ granulocytes preserved, among them $78.1 \pm 5.9\%$ were able of forming phagosomes after thawing, $90.9 \pm 7.1\%$ of white blood cells remained resistant to a vital dye eosin, and the content in neutrophils of lysosomal-cationic protein was $93.8 \pm 9.4\%$.

The application of the second solution ($n = 10$) allowed to preserve $83.7 \pm 6.7\%$ of white blood cells, among which $78.8 \pm 9.2\%$ were resistant to eosin, $64.9 \pm 9.3\%$ showed the ability of phagocytosis, and the content in neutrophils of lysosomal-cationic proteins was $93.4 \pm 4.7\%$.

The studies have shown the possibility of using both artificial and natural cryoprotectants to preserve cells at -80°C . Considering the growing interest for the study of plant pectins because of their immune modulating effects, the use of these substances as cryoprotectants is presently a promising direction.

The authors acknowledge the Russian Foundation of Basic Research for the financial support (Grant № 12-04-32207).

Использование факторов роста BDNF и TGF1b для выбора способа замораживания амниотической оболочки плаценты человека и ее применения после антиглаукоматозной операции

Ю.А. ДЕМИН¹, В.В. РЯЗАНЦЕВ², И.Л. КАЗМИРУК¹, М.Ю. ДЕМИНА¹

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования

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

Use of Growth Factors BDNF and TGF1b for Selection of Method for Freezing of Human Placental Amniotic Membrane and its Application after Glaucoma Surgery

YU.A. DEMIN¹, V.V. RYAZANTSEV², I.L. KAZMIRUK¹, DEMINA M.YU.¹

¹Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education

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

Существует ряд патологий органа зрения, связанных с глаукоматозными состояниями, при которых показан хирургический метод лечения. На послеоперационном этапе очень важно создать благоприятные условия для заживления шва и отсутствия осложнений. Одним из таких подходов является использование биологических тканевых покрытий послеоперационного дефекта, в частности амниотической оболочки плаценты человека (АОПЧ). Известно, что существуют иммунологические и биохимические предпосылки использования АОПЧ при хирургических операциях с целью коррекции глаукоматозных состояний: большое количество факторов клеточного роста (BDNF и TGF1b), минимальная иммуногенность АОПЧ.

Цель работы – установить наиболее благоприятный способ криоконсервирования АОПЧ, используя оценку проницаемости клеток по выходу факторов роста клеток BDNF и TGF1b в органе зрения на различных сроках наблюдения после антиглаукоматозной операции.

На модели глаукомы у лабораторных животных (кролики) и проведенной операции её коррекции в послеоперационный период использовали криоконсервированную АОПЧ (криоАОПЧ), замороженную при температуре жидкого азота простым погружением в азот или с помощью 10% ДМСО по специальному режиму замораживания. В результате наблюдения за послеоперационным швом в сроки 7, 14, 21 суток установлено, что криоконсервированная по специальной программе АОПЧ способствует сокращению послеоперационного восстановительного периода и формированию более мягкого шва. С целью оценки проницаемости клеток ткани криоАОПЧ после замораживания ее помещали в физиологический раствор, после чего измеряли выход факторов роста клеток BDNF и TGF1b в надсадок. Показано, что после использования специальной программы замораживания АОПЧ в 10% ДМСО кривая выхода факторов роста достигает максимума в более поздние сроки, что является доказательством большей сохранности клеток и структурной полноценности ткани АОПЧ после размораживания. Важно отметить, что по данным морфологии при этом также фиксируется хороший уровень сохранности клеток эпителия АОПЧ.

Измерение клеточных факторов роста BDNF и TGF1b в органе зрения лабораторных животных в месте операции после покрытия криоАОПЧ, замороженной в 10% ДМСО, показало их нарастание в срок до 7 суток и достаточно стабильный уровень на протяжении всего послеоперационного периода наблюдения до 21 суток. По сравнению с замороженной погружением в жидкий азот АОПЧ условия криоконсервирования криоАОПЧ в 10% ДМСО обеспечивают более высокую сохранность и жизнеспособность клеток эпителия.

There are a number of visual organ pathologies associated with glaucomatous states in which surgical treatment has been shown. At the postoperative period of importance is to create favorable conditions for suture adhesion and avoid the complications. One of such approaches is the application of biological tissue coverings of postoperative defect, in particular human amniotic membrane (HAM). It is known that there are immunological and biochemical backgrounds for use of HAM at surgeries to correct glaucomatous states: a large number of cell growth factors (BDNF and TGF1b), minimum immunogenicity of HAM.

Research aim was to determine the most appropriate method for HAM cryopreservation using the evaluation of cell permeability by releasing the cell growth factors BDNF and TGF1b in the visual organ of observation different terms after glaucoma surgery.

Using the model of glaucoma in laboratory animals (rabbits) and the performed operation of its correction in the postoperative period we applied cryopreserved HAM (cryoHAM) frozen at liquid nitrogen temperature by direct plunging into nitrogen or with 10% DMSO by special freezing regimen. As a result of observation for postoperative suture in the 7th, 14th, 21st days we have found that cryopreserved by special program HAM contributes to the reduction of post-operative recovery period and formation of softer suture. In order to evaluate the permeability of cryoHAM tissue cells after thawing it was placed into saline solution, then we measured the output of BDNF and TGF1b growth factors into the supernatant. After using special program for HAM freezing in 10% DMSO the curve of the yielding of growth factors was shown to achieve its maximum at later terms, which is proof of higher cell integrity and HAM tissue structural safety after thawing. It is important to note that according to the morphology data a high integrity level of HAM epithelial cells is also noted.

Measurement of BDNF and TGF1b cell growth factors in the visual organ of laboratory animals in the operation site after covering with cryoHAM frozen in 10% DMSO showed their growth in the period of 7 days and rather stable level throughout the postoperative follow-up to 21 days. Compared with frozen by plunging into liquid nitrogen cryoHAM in 10% DMSO provides higher integrity and viability of epithelial cells.

Морфологическая характеристика роговицы после применения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток

Ю.А. ДЕМИН¹, А.В. ПИВНЕНКО¹, Н.Г. МАЛОВА², М.Ю. ДЕМИНА¹

¹Харьковская медицинская академия последипломного образования

²Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины

Morphological Characteristics of Cornea after Administration of Mesenchymal Stromal Cells

YU.A. DEMIN¹, A.V. PIVNENKO¹, N.G. MALOVA², M.YU. DEMINA¹

¹Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

²V.Ya. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последнее время активно проводятся исследования по применению криоконсервированных биологических препаратов в офтальмологии, эффективность которых подтверждается результатами фундаментальных экспериментальных и клинических исследований.

Цель исследования – экспериментально обосновать возможность применения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток (кМСК) в терапии травматического повреждения роговой оболочки. Провести сравнительный анализ морфологических изменений в роговице после введения кМСК методами гидрирования и клеточного биологического покрытия (КБП) на основе мягкой контактной линзы. Экспериментальным животным наносили травматическое повреждение роговой оболочки по стандартной методике «роговичный тест». Животные были разделены на 3 группы: 1 – контрольная, 2 – введение кМСК методом гидрирования, 3 – применение КБП.

Изучены гистологические препараты роговицы. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Анализировали по 5–6 срезов каждого глазного яблока при $\times 200$ –400. На гистологических препаратах непосредственно после нанесения травматического повреждения определяются участки механического разрушения эпителиального слоя с проникновением в собственный слой роговицы. Микроструктуры стромы имеют низкую плотность, волокна неправильно ориентированы, определяются выраженная отечность и инфильтрация. В группе 1 на 14-е сутки после нанесения травмы все участки толщины роговицы практически возвращаются к исходному состоянию (норме). Однако при этом эпителиальный слой в некоторых участках остается неравномерным, определяются дистрофически измененные клетки в его слоях. Гистологическая картина свидетельствует о формировании рубцовых изменений в роговой оболочке, т. е. преобладании процессов заместительной регенерации. На 14-е сутки в опытных группах отмечали активное размножение клеток эпителиального слоя, инфильтрацию и отек стромы.

Таким образом, применение метода КБП на 14-е сутки после нанесения травмы приводит к нормализации структуры роговицы. В те же сроки после использования метода гидрирования в роговой оболочке отмечается разная толщина эпителиального слоя, клеточные слои слабо соединены между собой, в отдельных участках определяется десквамация эпителия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, при экспериментальной травме роговицы КБП является более эффективным методом введения кМСК, обеспечивает равномерное восстановление поврежденной ткани.

Recently the studies on the application of cryopreserved biological preparations in ophthalmology have been actively performed. Their efficiency is confirmed by fundamental experimental and clinical investigations.

The research aim was to experimentally prove the possibility of using the cryopreserved mesenchymal stromal cells (cMSCs) in the treatment of traumatic injury of cornea. To comparatively analyze morphological changes in cornea after introduction of cMSCs by hydrogenation and cell biological coating (CBC) on the base of soft contact lens. Experimental animals were subjected to trauma of cornea by the standard method of corneal reflex test. The animals were divided into 3 groups: group 1 was the control, animals of group 2 were introduced with cMSCs by hydrogenation, in group 3 we used CBC.

Histological preparations of cornea have been studied. Histological sections of 5 mm were stained with hematoxylin and eosin. By 5–6 slices of each eyeball were analyzed at $\times 200$ –400. The regions with mechanical destruction of epithelial layer with penetration into its own layer of cornea are determined in histological preparations immediately after trauma. The microstructures of stroma are of low density, the fibres are not properly orientated, pronounced edema and infiltration are determined. In group 1 to the 14th day after trauma all the regions of corneal thickness almost return to their initial state (norm). However epithelial layer in some regions remains uneven, dystrophically changed cells in its layers are observed. Histology indicates the formation of cicatricial changes in cornea, *i.e.* prevalence of substitutive regeneration. To the 14th day active cell proliferation of epithelial layer, infiltration and stromal oedema were reported in the experimental groups.

Thus, the application of CBC to the 14th day after trauma leads to the normalization of cornea structure. In the same time period after using hydrogenation in the cornea there is noted different thickness of epithelial layer, the cell layers are weakly connected, epithelial desquamation is observed in some regions. The obtained results testify to the fact that during experimental corneal trauma CBC is more efficient method for cMSCs introduction, it provides homogeneous regeneration of a damaged tissue.

Криоконсервирование единичных сперматозоидов человека в составе альгинатных микросфер

А.И. ПРАВДЮК^{1,2}, Н.Г. ГРИШЕНКО², Ю.А. ПЕТРЕНКО¹, А.Ю. ПЕТРЕНКО¹

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

²Клиника репродуктивной медицины им. академика В.И. Грищенко

Cryopreservation of Single Human Spermatozoa Within Alginate Microbeads

A.I. PRAVDYUK^{1,2}, N.G. GRISHCHENKO², YU.A. PETRENKO¹, A.YU. PETRENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Academician V.I. Grischenko Clinic for Reproductive Medicine, Kharkov, Ukraine

На данный момент разработаны эффективные технологии криоконсервирования сперматозоидов человека, позволяющие сохранять их жизнеспособность и функциональную активность в течение длительного времени. Традиционные подходы ориентированы на криоконсервирование суспензий с относительно большим содержанием сперматозоидов (10^3 – 10^8), при этом умеренные потери клеток допустимы. Вместе с тем существует необходимость криоконсервировать единичные сперматозоиды, отобранные в ходе морфологической селекции сперматозоидов, сохранения спермиев, полученных при тестикулярной биопсии, тяжелых формах олигоспермии и др. В таких случаях потери сперматозоидов в процессе криоконсервирования крайне нежелательны, поскольку могут отрицательно влиять на результаты циклов ВРТ. Поэтому для криоконсервирования единичных сперматозоидов целесообразно использовать специальные микронесители. Это облегчает обнаружение единичных сперматозоидов после отогрева и практически исключает их количественные потери. Одним из перспективных контейнеров для сперматозоидов являются альгинатные микросферы, которые активно применяются в биотехнологии и тканевой инженерии. Клетки в альгинатных микросферах могут быть криоконсервированы под защитой проникающих криопротекторов. Кроме того, сперматозоиды могут быть легко извлечены из альгинатных микросфер путем их деполимеризации в присутствии хелатирующих агентов, что является преимуществом данного типа носителей и упрощает проведение процедуры ICSI (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида). В данной работе изучалась возможность криоконсервирования сперматозоидов человека в составе альгинатных микросфер путем замораживания в парах азота.

Подвижные сперматозоиды от 5 доноров помещали с помощью микроманипулятора в альгинатные микросферы, которые криоконсервировали под защитой глицерола в парах азота. Для высвобождения сперматозоидов альгинатные микросферы подвергали деполимеризации. Жизнеспособность сперматозоидов после замораживания в составе альгинатных микросфер оценивали с помощью комбинированного флуоресцентного окрашивания и гипосмотического теста.

Показано, что после отогрева альгинатные микросферы сохраняли структурную целостность, а инкапсулированные в них сперматозоиды были жизнеспособными. Таким образом, криоконсервирование единичных сперматозоидов в альгинатных микросферах является перспективным методом ВРТ, требующим дальнейшей разработки и оптимизации.

For today there have been developed effective cryopreservation technologies for human spermatozoa allowing the preservation of their viability and functional activity for a long time. Traditional approaches are focused to cryopreservation of suspensions with relatively high content of sperm cells (10^3 – 10^8), when moderate losses in cell amount are admissible. However, there is a need in cryopreserving single morphologically selected spermatozoa, preservation of sperm obtained by testicular biopsy, severe oligospermia, etc. In such cases, the loss of sperm cells during cryopreservation is not admissible and can dramatically affect the outcome of ART cycles. Therefore, for single spermatozoa cryopreservation a special microcarriers should be used. This facilitates the detection of single spermatozoa after thawing and virtually eliminates their quantitative losses. One of the promising containers for spermatozoa are alginate microbeads. Alginate microbeads are widely used in biotechnology and tissue engineering. The cells in alginate microbeads could be cryopreserved under the protection of penetrating cryoprotectants. In addition, the spermatozoa can be easily derived from alginate microspheres by depolymerization in the presence of chelating agents, that is an advantage comparing to others carriers, this would simplify the ICSI (intracyto-plasmic sperm injection) performance. We studied the possibility of cryopreservation of human spermatozoa in the alginate microbeads by freezing in liquid nitrogen vapors.

Motile spermatozoa from 5 donors were placed into alginate microbeads using a micromanipulator. Microbeads with spermatozoa were cryopreserved under glycerol protection in liquid nitrogen vapors. To release spermatozoa the alginate microbeads were subjected to depolymerization. Viability of spermatozoa after freezing in alginate microbeads and thawing was evaluated using a combination of fluorescent staining and hypoosmotic test.

It has been shown that after thawing the alginate microbeads kept structural integrity, and encapsulated spermatozoa were viable. Thus, the cryopreservation of single spermatozoa in alginate microbeads is a promising tool for ART, demanding further development and optimization.

Применение методов лечебного охлаждения в терапии хронической алкогольной интоксикации

И.И. ЛОМАКИН, Г.А. БАБИЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Medical Cooling Methods Against Chronic Alcohol Intoxication

I.I. LOMAKIN, G.A. BABYCHUK

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

Актуальная задача современной медицины – своевременное и активное привлечение больных алкоголизмом к нетрадиционным терапевтическим методам, затрагивающим биологические механизмы действия алкоголя. Одним из терапевтических методов холодового воздействия является краниocereбральная гипотермия (КЦГ). Наиболее значимым терапевтическим эффектом КЦГ следует считать восстановление интеллектуально-мнестических функций при лечении хронической алкогольной интоксикации и повторных алкогольных делириев.

Другой метод холодового воздействия – общая экстремальная аэрокриотерапия (АКТ) в специальной воздушной криокамере с температурой $-120...-180^{\circ}\text{C}$ приводит к развитию компенсаторно-адаптационных реакций, направленных на активацию собственных гомеостатических регуляторных систем. Лечебные эффекты при АКТ связаны с тем, что организм реагирует на влияние холода не только системой терморегуляции, но и всеми возможными адаптационными механизмами, включая гипоталамо-гипофизарно-адреналовую, иммунную и эндокринную системы. Ведущими факторами в реализации терапевтических эффектов обоих методов являются изменения деятельности высших вегетативных центров и систем нейроэндокринной регуляции, непосредственно отвечающих за температурный гомеостаз организма. Физиологические особенности реакций организма и его функциональных систем на данные методы холодовых воздействий предполагают не только их индивидуальное применение, но и сочетанное с возможным взаимным потенцированием действие для повышения терапевтической эффективности.

Actual task of modern medicine is timely and active involvement of the patients with alcoholism to non-traditional therapeutic methods affecting the biological mechanisms of alcohol effect. One of the therapeutic methods of cold exposures is the cranio-cerebral hypothermia (CCH). The recovery of intellectual and mnemonic functions should be considered as the most significant therapeutic effect of CCH when treating chronic alcohol intoxication and repeated alcohol deliria.

Another method of cold exposure is general extreme aerocryotherapy (ACT) in special air cryochamber with temperature of $-120...-180^{\circ}\text{C}$ leads to the development of compensatory-adaptive reactions targeted to the activation of patient's own homeostatic regulatory systems. Therapeutic effects of ACT are associated with the fact that organism responds to the effect of cold with the system of thermoregulation, and all possible adaptation mechanisms as wells, including hypothalamic-pituitary-adrenal, immune and endocrine systems. Major factors in implementation of therapeutic effects of both methods are the changes of higher vegetative centers and neuroendocrine regulation directly responsible for temperature homeostasis of the organism. Physiological features of the organism and its functional systems responses to these cold exposures suggest their individual application as well as the effect for increasing the therapeutic efficiency combined with the possible mutual potentiation.

Влияние ритмических холодовых воздействий на восстановление цикла сон-бодрствование после искусственно вызванного десинхроноза

Е.А. ВЕНЦКОВСКАЯ, А.В. ШИЛО, Г.А. БАБИЙЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Rhythmic Cold Exposures on Sleep-Wake Cycle Recovery after Artificially Induced Desynchronization

E.A. VENTSKOVSKAYA, A.V. SHYLO, G.A. BABIYCHUK

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

Расстройства сна (десинхронозы), связанные со сменной работой, трансмеридианными перелетами, приводят к ухудшению самочувствия, снижению работоспособности, развитию ряда соматических и психических заболеваний. Несмотря на то, что в последние годы в исследованиях сна сделаны важные открытия, на основании которых было разработано большое количество медикаментозных средств, фармакотерапия нарушений сна остается сложной и до конца нерешенной проблемой. В этой связи наряду с поиском новых медикаментозных средств существует насущная потребность в использовании немедикаментозных способов коррекции нарушений сна, основанных на применении основных синхронизаторов ритма, одним из которых является температура.

Цель работы – изучить влияние ритмических холодовых воздействий (РХВ) на восстановление цикла сон-бодрствование после искусственно вызванного десинхроноза у крыс.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар, находящихся в звукопоглощающей камере с контролируемой длительностью светового дня (свет:темнота 12:12). Моделирование десинхроноза осуществляли инверсией светового режима (ИСР), т. е. однократным удлинением светового периода на 12 ч. После ИСР в течение двух дней проводили 2 серии из 9 охлаждений в темное время суток по 15 мин при температуре -12°C или 10°C с интервалами по 45 мин при комнатной температуре 23°C . Анализ изменений цикла сон-бодрствование осуществляли по общепринятым критериям.

Инверсия светового режима приводила к нарушению суточного распределения состояний сна и бодрствования и почасовой представленности фаз сна. Вызванное ИСР состояние десинхроноза у крыс сопровождалось уменьшением количества медленноволнового (МВС) и парадоксального сна (ПС) в светлое время первого и второго дня самовосстановления. Проведенные на фоне ИСР РХВ (-12°C) способствовали повышению количества МВС и ПС в указанные периоды, приближая их к контрольному уровню. Необходимо отметить, что изменения количества сна при ИСР и последующая его нормализация происходили за счет изменений длительности и количества эпизодов как МВС, так и ПС. РХВ (10°C) оказывали менее выраженный эффект на МВС. Они способствовали повышению представленности МВС только в первый день воздействий. Влияние РХВ (10°C) на представленность ПС было более выраженным, и количество ПС после проведения холодовых воздействий в светлое и темное время суток приближалось к контрольным значениям.

Таким образом, РХВ приводят к ускорению нормализации временной организации сна при экспериментально вызванном инверсией светового режима десинхронозе.

Sleep disorders (desynchronization) associated with a shift work, jet lag lead to the worsening of health, performance decrement, development of different somatic and psychic diseases. Despite the fact that recently important findings have been done in sleep investigation and on the base of them a great number of medicines has been developed, pharmacotherapy of sleep disorders remains complicated and not solved problem. In this regard along with the search for new medical treatments there is an impelling need in the non-medicated approaches of sleep disorders correction based on the application of main rhythm synchronizers, one of which is the temperature.

Research aim was to study the effect of rhythmic cold exposures (RCEs) on the sleep-wake cycle recovery after artificially induced desynchronization in rats.

The experiments have been carried-out in Wistar male rats kept in sound-attenuated chamber with controlled duration of light period (light:dark 12:12). De-synchronization was simulated by inversion of light regimen (ILR), *i. e.* one-fold prolongation of light period by 12 hrs. After ILR during two days 2 series of 9 cold exposures were performed in dark period for 15 min at -12°C or 10°C with intervals of 45 min at room temperature 23°C . The analysis of sleep-wake cycle changes was performed by standard criteria.

Inversion of light regimen led to the disorders in circadian distribution of sleep-wake states and hourly occurrence of sleep phases. Induced by ILR desynchronization in rats was accompanied by the amount decrease of slow wave (SWS) and rapid eye movement (REM) sleep in light period of the first and second days of self-recovery. Carried-out RCEs (-12°C) on the background of ILR led to the increase of SWS and REM sleep amounts in mentioned periods approaching them to the control level. It is worth noting that changes of sleep amount under ILR and its following normalization occurred due to the changes of duration and number of SWS and REM sleep episodes. RCEs (10°C) less significantly affected SWS. They resulted in the increase of SWS occurrence only in the first day of exposures. RCEs (10°C) effect on REM sleep occurrence was more expressed and REM sleep amount after cold exposures in light and dark periods approximated the control indices.

So, RCEs lead to the accelerated normalization of temporal sleep organization during desynchronization experimentally caused by inversion of light regimen.

Улучшенная функциональность эритроцитов как ответ на состояние гипобиоза у млекопитающих

С.В. РЕПИНА, О.А. НАРДИД

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Improved Functionality of Erythrocytes as Response to Hypobiosis State in Mammals

S.V. REPINA, O.A. NARDID

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

В последнее время возобновился интерес к феномену зимней спячки млекопитающих. Достижения в области молекулярных основ явления глубокого подавления интенсивности жизненных процессов имеют важное прикладное значение. В нем кроются стратегии для решения проблем клинической медицины, в том числе и криомедицины: устойчивость к гипотермии, ишемии, мышечной атрофии, регулируемый гипометаболизм, геронтологические аспекты, охлаждение и длительное хранение клеток, органов, тканей и пр.

Однако зимняя спячка является генетически закрепленной стратегией адаптации гетеротермных млекопитающих. Состояние гибернации гомойотермных животных может моделироваться введением их в искусственный гипобиоз (ИГ).

Цель работы – выяснить, имеет ли место структурно-функциональный ответ эритроцитов на пребывание млекопитающих в состоянии искусственного гипобиоза и выход из него. Достаточно информативными могут быть сравнительные исследования клеток животных, генетически адаптированных к различным интервалам изменения температуры тела (гомойо- и гетеротермные млекопитающие).

Исследования проводили на самцах сирийских хомяков и белых беспородных крыс. Состояние ИГ достигалось по методу Анджуса-Бахметьева-Джая: охлаждение в замкнутой камере. Исследовали эритроциты пяти групп животных: контрольных, в состоянии ИГ, через 2 и 24 ч после него и хомяков в состоянии зимней спячки. В качестве показателей структурно-функционального состояния эритроцитов использовали осмотическую устойчивость, относительное содержание основных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метHb), динамическое состояние цитозоля, морфологию клетки.

Снижение температуры тела до 16°C, одинаковое для крыс и хомяков в состоянии ИГ, сопровождается изменением всех изученных параметров эритроцитов. Реакции эритроцитов на состояние искусственного и природного гипобиоза млекопитающих имеют как общие, так и отличительные черты. Исследованные характеристики эритроцитов продолжают изменяться вплоть до 24 ч после нахождения животных в состоянии ИГ, при этом физиологические показатели организма не отличаются от контрольных через 2 ч.

Состояние искусственного гипобиоза (по методу Анджуса-Бахметьева-Джая) как гомойо-, так и гетеротермов, улучшает функциональность эритроцитов: наблюдаются существенное увеличение осмотической устойчивости и повышение относительного содержания охуHb вплоть до 24 ч после пребывания животных в гипометаболическом состоянии.

Recently there has been renewed the interest to the mammalian hibernation phenomenon. The achievements of the studies in the field of molecular principles of the phenomenon of a deep suppression of life processes intensity are of great practical importance. These contain the strategies for solving the tasks of clinical medicine, including cryomedicine such as: the resistance to hypothermia, ischemia, muscle atrophy, controlled hypometabolism, gerontological aspects, cooling and long-term storage of cells, organs, tissues, etc.

However, the hibernation is a genetically fixed adaptation strategy of heterothermic mammals. The hibernation state in homoiothermal animals may be modeled by their introducing into an artificial hypobiosis (AH).

This research was aimed to find out whether there is a structural and functional erythrocyte response to mammals' being in artificial hypobiosis state and leaving it. The comparative studies of animal cells, genetically adapted to different intervals of body temperature changes (homoio- and heterothermic mammals) may be quite informative.

The investigations were performed in male Syrian hamsters and white breedless rats. The AH state was achieved by the Bakhmet'ev-Andjus-Gaja method (cooling into a closed chamber). We investigated the erythrocytes of five groups of animals: control, in AH state, in 2 and 24 hrs after AH and hamsters in hibernation state. As the indices of structural and functional state of erythrocytes we used osmotic resistance, relative content of main hemoglobin forms (oxy, deoxy- and metHb), the dynamic state of cytosol, and cell morphology.

The body temperature decrease down to 16°C, equal for both rats and hamsters in AH state, is accompanied by the changes in all the studied parameters of erythrocytes. The erythrocyte response to the state of artificial and natural hypobiosis in mammals has both common and distinctive features. The studied characteristics of erythrocytes continue to change up to 24 hrs after animals' being in AH state, herewith an organism's physiological indices do not differ from the control ones in 2 hrs.

The artificial hypobiosis state (according to Bakhmet'ev-Andjus-Gaja) in both homoio- and heterothermic animals improves the erythrocyte functionality: there are observed a significant increase in osmotic resistance and rise in relative content of oxyHb up to 24 hrs after animal exposure to hypometabolic state.

Применение дермальных криоконсервированных аллофибробластов на носителях для лечения экспериментальных кожных ран у крыс

Л.Г. АБРАФИКОВА, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, О.В. ПИШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Dermal Cryopreserved Allofibroblasts on Carriers for Treatment of Experimental Skin Wounds in Rats

L.G. ABRAFIKOVA, T.F. PETRENKO, O.V. PISHKO

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

Возможное стимулирование репаративных процессов в раневых дефектах и очагах воспаления с помощью фибробластов остается актуальным вопросом.

Целью данной работы было изучение влияния криоконсервированных дермальных фибробластов крыс на скорость заживления кожных дефектов у экспериментальных животных на модели асептического воспаления кожи.

Аллофибробласты получали по существующим стандартным протоколам из эксплантатов дермы крыс. Суспензию полученных клеток криоконсервировали в эмбриональной сыворотке крупного рогатого скота под защитой ДМСО со скоростью охлаждения 1–2 град/мин до –40°C с последующим погружением в жидкий азот.

Асептическое воспаление кожи у экспериментальных животных моделировали путём подкожного введения 0,5 мл 9%-го раствора уксусной кислоты. На раневую поверхность суспензию клеток наносили на носителях: метилцеллюлозном (МЦ) геле и коллагеновой губке «Геласпон». О влиянии фибробластов на скорость репаративных процессов судили по динамике заживления дефектов, иммунологическим и биохимическим показателям сыворотки крови и гистологическим данным.

Процессы регенерации дефектов были более выражены у животных экспериментальных групп при нанесении на них препаратов криоконсервированных и нативных фибробластов, иммобилизованных в МЦ геле (группы 1, 2 соответственно), по сравнению с препаратами на губке «Геласпон» (группы 3, 4 соответственно). В группах 1 и 2 полное заживление наблюдали на 14-е сутки, а в группах 3 и 4 – на 21-е сутки.

При изучении гистологических данных на 7, 14 и 21-е сутки установлено, что в экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой, в которой дефект заживал самопроизвольно, наблюдали более выраженное уменьшение фибринозно-некротического слоя, увеличение скорости формирования грануляционной ткани и нарастание эпителия на поверхности дефекта. О стимулирующем действии на репаративные процессы криоконсервированных и нативных фибробластов свидетельствовала динамика возрастания и восстановления до значений нормы концентраций показателей острой фазы воспаления в сыворотке крови крыс.

Таким образом, экспериментально показан терапевтический эффект криоконсервированных и нативных фибробластов крыс на носителях при лечении экспериментального кожного дефекта. Статистические различия между показателями репаративных процессов после применения криоконсервированных и нативных фибробластов отсутствуют. Скорость заживления раневых дефектов во всех группах коррелировала с данными гистологического анализа и показателями сыворотки крови крыс.

Potential stimulating reparative processes in wound defects and inflammation areas with fibroblasts has remained an actual problem.

The research aim was to study the effect of cryopreserved dermal rat fibroblasts on healing rate of skin defects in experimental animals in the model of aseptic skin inflammation.

Allofibroblasts were derived according to the standard protocols from explants of rat derma. Suspension of derived cells was cryopreserved in fetal bovine serum under protection of DMSO with the cooling rate of 1–2 deg/min down to –40°C with further plunging into liquid nitrogen.

Aseptic skin inflammation in experimental animals was modeled by subcutaneous introduction of 0.5 ml 9% acetate solution. Cell suspension was applied on wound surface on carriers such as: methylcellulose (MC) gel and collagen sponge Gelaspon. The effect of fibroblasts on rate of reparative processes was judged by dynamics of healing defects, immunological and biochemical indices of rat blood serum and histologic data.

Processes of defects regeneration were more expressed in the animals of experimental groups when applying the preparations of cryopreserved and native fibroblasts immobilized in MC gel (groups 1 and 2, accordingly) if compared with preparations in sponge Gelaspon (groups 3,4, accordingly). In groups 1 and 2 a complete healing was observed to the 14th day and in groups 3 and 4 to the 21st day.

When studying the histological data to the 7th, 14th and 21st day it was established that in experimental groups if compared with the control one, in which the defect was healed spontaneously we observed more expressed reduction of fibrous-necrotic layer, an increase of the rate of granulation tissue formation and epithelium growth on defect surface. Dynamics of increasing and recovery of normal concentration values of the indices of inflammation acute phase in rat blood serum testified to stimulatory effect on reparative processes of cryopreserved and native fibroblasts.

Thus, therapeutic effect of cryopreserved and native rat fibroblasts in the carriers when treating experimental skin defect was experimentally shown. Statistical differences between the indices of reparative processes after application of cryopreserved and native fibroblasts are absent. Healing rate of wound defects in all the groups correlated with the findings of histological analysis and indices of rat blood serum.

Криоконсервирование производственных штаммов пробиотиков *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus bulgaricus* 1Z 03501 в различных защитных средах

А.Е. АНАНЫНА, А.В. ШЕГЛОВ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Production Strains of Probiotics *Bifidobacterium Bifidum* 1 and *Lactobacillus Bulgaricus* 1Z 03501 in Different Cryoprotective Media

A.E. ANANYINA, A.V. SHCHEGLOV, I.P. VYSEKANTSEV

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

Криоконсервирование – один из наиболее надежных способов долгосрочного хранения микроорганизмов. Помимо хранения микробных культур в коллекциях, криоконсервирование все чаще применяют для создания запасов посевного материала с последующим посевом в ферментеры криоконсервированных стартовых культур. В связи с этим актуальна разработка максимально унифицированных методов криоконсервирования микроорганизмов из различных таксонов, имеющих разную исходную криоустойчивость, на которую влияют видовые особенности строения, физиологии и культивирования.

Изучали влияние режимов охлаждения и состава сред криоконсервирования на жизнеспособность и пролиферативные свойства производственных штаммов пробиотиков *B. bifidum* 1 и *L. bulgaricus* 1Z 03501. Образцы замораживали со скоростями охлаждения 1, 5, 10, 15 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот и непосредственным погружением криопробирок в жидкий азот (-196°C). В качестве сред криоконсервирования использовали ростовую среду Блаурокка, среды СМЛ-1 и СМЛ-2 (водные растворы сахарозы, обезжиренного молока и лактозы в различной концентрации), 0,5 и 1%-е растворы альгината натрия.

Показано, что замораживание бактерий *B. bifidum* 1 со скоростью 1 град/мин во всех защитных средах, кроме среды Блаурокка, обеспечивало сохранность клеток на исходном уровне. Было установлено, что бактерии *L. bulgaricus* 1Z 03501 более устойчивы к повреждающему действию низких температур. При замораживании в средах Блаурокка и СМЛ-2 со всеми изучаемыми скоростями охлаждения сохранялось исходное количество жизнеспособных клеток. Замораживание со скоростью 5 град/мин в среде Блаурокка и в 1%-м растворе альгината натрия обеспечивало исходную жизнеспособность обеих бактерий. После замораживания по всем режимам наблюдали увеличение продолжительности lag- и начала log-фаз роста периодических культур. Время выхода этих культур в стационарную фазу роста и прирост биомассы не отличались от показателей контрольных культур.

Криоконсервирование не влияло на морфологические и культуральные свойства изучаемых микроорганизмов.

Cryopreservation is one of the most reliable methods for long-term storage of microorganisms. Except the storage of microbial cultures in collections the cryopreservation is more often applied for creating the stock of inoculum with the following inoculation of cryopreserved starter cultures into bioreactors. Herewith it is actual to develop maximally unified cryopreservation methods for microorganisms of different taxons with various initial cryoresistance, which is affected by specific peculiarities in structure, physiology and culturing.

The effect of cooling regimens and cryopreservation media composition on viability and proliferative features of technological probiotic strains *B. bifidum* 1 and *L. bulgaricus* 1Z 03501 was studied. The samples were frozen with the cooling rates of 1, 5, 10, 15 deg/min down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen and direct plunging of cryovials into liquid nitrogen (-196°C). We used Blaurock growth medium, media SML-1 and SML-2 (aqueous solution of sucrose, skimmed milk and lactose of different concentration), 0.5 and 1% sodium alginate solutions as the cryopreservation media.

It has been shown that freezing of bacteria *B. bifidum* 1 with the rate of 1 deg/min in all the cryoprotective media except Blaurock medium provided the cell survival at primary level. We have established that bacteria *L. bulgaricus* 1Z 03501 are more resistant to the damage effect of low temperatures. Initial number of viable cells was preserved during freezing in Blaurock and SML-2 media with all the studied cooling rates. Freezing with the rate of 5 deg/min in Blaurock medium and 1% sodium alginate preserved the initial viability of both bacteria. After freezing according all the regimens we observed the increased duration of lag-phase and of the log-phase start in growth of periodic cultures. Yield time of these cultures in stationary growth phase and biomass increase did not differ from the indices of the control cultures.

Cryopreservation did not affect the morphological and cultural properties of the studied microorganisms.

Сохранность генетических структур дрожжеподобных грибов *Candida albicans* после долгосрочного хранения при -196°C

А.Ю. АРТУЯНЦ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Genetic Structures of Yeast Fungi *Candida albicans* after Long-Term Storage at -196°C

A.YU. ARTUYANTS, I.P. VYSEKANTSEV

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

Грибы рода *Candida* являются возбудителями целого ряда заболеваний – кандидозного вульвовагинита, кандидоза кожи, висцеральных и генерализованных кандидозов, внутригоспитальных инфекций. При иммунодефицитах различного генеза, в том числе при ВИЧ-инфекции, они вызывают висцеральные и генерализованные кандидозы, поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. Возникла необходимость в создании коллекций клинических изолятов грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов. Ранее нами была показана сохранность после криоконсервирования различных генетически детерминированных биологических свойств грибов *Candida albicans*, которые используются для индикации, идентификации и являются факторами патогенности.

Целью данного исследования было изучение сохранности генетических структур грибов *C. albicans* после криоконсервирования по ранее изученным режимам, а также долгосрочного хранения в жидком азоте в течение четырех лет (срок наблюдения).

Объектом исследования были криоконсервированные в различных условиях и нативные дрожжеподобные грибы *C. albicans* ATCC 885. В качестве среды консервирования использовали дистиллированную воду, среду культивирования (сусло пивное), среду культивирования с добавлением 5% ДМСО. Клетки замораживали со скоростью 7 град/мин до -40°C в программном замораживателе биообъектов «Cryoson» с дальнейшим погружением в жидкий азот. Часть образцов замораживали путем погружения их в жидкий азот. Для определения температурозависимых мутантов размороженные и посеянные образцы инкубировали при 22°C в течение 5 суток, затем выросшие колонии нумеровали, каждую из них пересеивали на свежую среду и инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Сохранность структурного участка ДНК *C. albicans* в процессе криоконсервирования определяли методом ПЦР по стандартной методике, используя набор «Ампли СеНС-50 *Candida albicans*-500».

Исследования показали, что использование вышеуказанных режимов охлаждения как после кратковременного, так и последующего хранения в течение четырех лет не приводило к образованию после криоконсервирования температурозависимых мутантов, т. е. все колонии давали рост при температуре 37°C . Также установлено, что криоконсервирование и последующее долгосрочное хранение не вызывали повреждений специфического структурного участка ДНК *C. albicans* длиной 500 пар нуклеотидов, который является матрицей для дальнейшей амплификации в полимеразной цепной реакции. Полученные результаты свидетельствуют о сохранности генетических структур грибов в процессе криоконсервирования.

Fungi *Candida* are pathogenic agents of some diseases such as: candidal vulvovaginitis, cutaneous candidosis, visceral and generalized candidiasis and in-hospital infections. At immunodeficiency of various genesis, including HIV infection, they cause a visceral and generalized candidiasis, damages of respiratory system and gastrointestinal tract. There was a need in establishing the collections of clinical isolates of fungi *Candida*, derived from various biotopes. Previously we have shown the preservation after cryopreservation of different genetically determined biological properties of the fungi *Candida albicans*, used for indication, identification, and being pathogenicity factors.

The research aim was to study the integrity of the genetic structures of fungi *C. albicans* after cryopreservation according to the previously studied regimens, as well as long-term storage in liquid nitrogen during four years (observation period).

Native yeast-like fungi *C. albicans* ATCC 885 and cryopreserved under different conditions cells were the objects of the study. There were used distilled water, culture medium (beer wort), culture medium with 5% DMSO as preservation media. The cells were cooled with the rate of 7 deg/min down to -40°C using programmable freezer Cryoson and then plunged into liquid nitrogen. Some samples were frozen by direct plunging into liquid nitrogen. To determine temperature-dependent mutants the frozen-thawed and then seeded samples were incubated at 22°C for 5 days, then grown colonies were marked, each of them subcultured on fresh medium and incubated at 37°C for 48 hrs. During cryopreservation the examining of preservation of DNA structural site of *C. albicans* was performed by PCR according to the standard method, using Ampli SeNS-50 *Candida albicans*-500 kit.

The studies have shown that using the above-mentioned cooling regimens both after short-term and further storage for four years did not result in the formation of temperature-dependent mutants after cryopreservation, i. e. all the colonies grew at 37°C . It was also found that cryopreservation and further long-term storage did not impair specific DNA structural site of *C. albicans* with 500 base pair length, which was a matrix for the following amplification in polymerase chain reaction. The obtained results testify to integrity of fungi genetic structures during cryopreservation.

Эффективность криоконсервирования тромбоцитов при разных режимах замораживания

О.А. БОГДАНЧИКОВА, А.М. КОМПАНИЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Efficiency of Platelet Cryopreservation under Different Freezing Regimens

O.A. BOGDANCHIKOVA, A.M. KOMPANIETS

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

Оптимальный режим замораживания, наряду с криозащитной средой, является одним из ключевых факторов защиты биологических объектов от криоповреждений. В исследованиях по разработке методов криоконсервирования концентратов тромбоцитов (КТ) основное внимание сконцентрировано на выборе криопротектора и создании на его основе эффективной криозащитной среды. Работы, посвященные изучению эффективности различных режимов замораживания КТ, представлены лишь в единичных публикациях. В этой связи проведены исследования сохранности функциональной полноценности КТ донорской крови человека, криоконсервированных в комбинированных криозащитных средах, в зависимости от режимов замораживания.

Замораживание КТ проводили с использованием традиционного для тромбоцитов контролируемого замораживания в программном замораживателе, а также неконтролируемого – в парах азота с медленными и относительно высокими скоростями.

Анализ полученных данных показал высокую криозащитную активность комбинированных сред как при программном контролируемом замораживании КТ, так и неконтролируемом. Экспериментально установлена возможность эффективного неконтролируемого замораживания тромбоцитов с комбинированными средами в парах жидкого азота. Разработана методика неконтролируемого замораживания отдельных доз КТ в одноразовых полимерных криоконтейнерах.

Установлено важное значение для результатов криоконсервирования тромбоцитов таких факторов, как внеклеточное переохлаждение и длительность плато кристаллизации. К положительным свойствам исследованных комбинированных криоконсервантов следует отнести выявленное нами уменьшение величины начального переохлаждения среды – фактора, оказывающего повреждающее действие на тромбоциты при замораживании. Установлено, что при использовании комбинированных криоконсервантов уменьшается величина внеклеточного переохлаждения образца в момент кристаллизации по сравнению с результатами применения растворов отдельных криопротекторов.

Optimal freezing regimen along with cryoprotective medium are the key factors of biological objects' protection from cryodamages. In the researches directed to development of cryopreservation methods for platelet concentrates (PCs) main attention is paid to cryoprotectant selection and development on the its base of effective cryoprotective medium. The studies of efficiency of different freezing regimens of PCs are presented only in single publications. In this regard we performed the studies of functional integrity of PCs of human donor blood cryopreserved in combined media depending on freezing regimens.

Freezing of PCs was performed with traditional controlled rate freezing of platelets using programmable freezer, as well as non-controlled rate protocol in liquid nitrogen vapors with low and relatively high rates.

The analysis of the obtained data showed a high cryoprotective activity of combined media both after application of program controlled rate and non-controlled rate freezing of PCs. It was experimentally established the possibility of effective non-controlled rate platelet freezing in combined media in liquid nitrogen vapors. There was designed the method of non-controlled rate freezing of single samples of PCs in disposable polymer cryocontainers.

It was established that platelet cryopreservation results are significantly dependent on factors such as: extracellular supercooling and duration of crystallization plateau. To positive properties of the studied combined cryopreservatives the revealed reduction of medium initial supercooling value as the factor of damaging effect on platelets during freezing is referred. It was established that usage of combined cryopreservatives resulted in reduction of sample extracellular supercooling during crystallization if compared with the results of using monocryoprotectant solutions.

Влияние ДМСО и криоконсервирования на фосфолипиды мембран клеток костного мозга собак

Л.А. Водопьянова, О.Н. Денисова, Г.Ф. Жегунов
Харьковская государственная зооветеринарная академия

Influence of DMSO and Cryopreservation on Phospholipids of Cell Membranes of Canine Bone Marrow

L.A. VODOPYANOVA, O.N. DENISOVA, G.F. ZHEGUNOV
Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov, Ukraine

В клинической ветеринарии и трансплантологии актуально хранение клеток костного мозга (ККМ) с помощью замораживания. Применение криопротекторов позволяет повысить сохранность клеток, при этом малоизученной остается проблема влияния криоконсервирования на мембраны клеток. Изменение уровня фосфолипидов (ФЛ) является важным индикатором повреждения мембраны клетки. Среди различных методов исследования ФЛ особое место занимают цитохимические, сочетающие чувствительность биохимических методов с наглядностью цитологических. В данной работе изучали содержание ФЛ в ККМ собак после действия ДМСО, замораживания и размораживания.

Клетки костного мозга получали из бедренных костей 3–4-летних собак ($n = 8$). Диметилсульфоксид постепенно добавляли в суспензию ККМ до конечной концентрации 5, 7 и 10% при 4°C с дальнейшей инкубацией 10 мин. Замораживание проводили в пластиковых контейнерах «Eppendorf» по двухэтапной программе. Отогрев контейнеров осуществляли в воде при 41°C. Мазки изучали под увеличением $\times 100$, определяли интенсивность окраски суданом черным, вычисляя средний гистохимический коэффициент (СГК).

Фосфолипиды были обнаружены во всех ККМ, за исключением лимфоцитов. Наибольшее количество – в клетках гранулоцитарного ряда. При экспозиции клеток в среде получения (4°C, 30 мин) цитохимическая реакция не меняет степени выраженности. После инкубации ККМ с растворами ДМСО снижение уровня ФЛ наблюдалось в клетках эритроцитарного ряда. Отмечено, чем выше концентрация ДМСО, тем ниже степень выраженности окраски. После размораживания ККМ с 7%-м раствором ДМСО в бластных клетках, миелобластах, промиелоцитах, миелоцитах, палочкоядерных клетках и клетках моноцитарного ряда значение СГК было наиболее близким к показателям контроля, следовательно, данная концентрация ДМСО обладает высокими криопротекторными свойствами по отношению к мембранным фосфолипидам ККМ собак.

Установлено, что в исследованных ККМ собак изменения фосфолипидного матрикса мембран происходят уже на этапе подготовки к криоконсервированию с ДМСО. Максимальную защиту ФЛ бислоя мембраны обеспечил 7%-й раствор ДМСО.

The storage of bone marrow cells (BMC) using freezing is actual for clinical veterinary science and transplantology. The application of cryoprotectants allows the increasing of cell survival, herewith the problem of cryopreservation influence on cell membranes has been poorly studied. Change in the level of phospholipids (PL) is an important index of cell membrane damage. Among various research methods of PL the cytochemical methods take a special place, combining sensitivity of biochemical methods with visualization of cytologic ones. The content of PL in canine BMC after the effect of DMSO, freezing and thawing, was investigated.

Bone marrow cells were derived from femurs of 3–4-year-old dogs ($n = 8$). Dimethyl sulfoxide was gradually added to BMC suspension in final concentration of 5, 7 and 10% at 4°C with following 10 min-long incubation. Freezing was performed in plastic containers (Eppendorf) according to the two-stage program. The containers were warmed in water at 41°C. The smears were studied at $\times 100$ magnification, Sudan Black staining intensity was assessed by calculation of mean histochemical coefficient (MHC).

Phospholipids were found in all BMC, except lymphocytes. The maximum amount was revealed in granulocyte cells. After the exposure of cells in isolation medium (4°C, 30 min) the manifestation degree of cytochemical reaction does not change. After BMC incubation in DMSO solutions the decrease of PL level was observed in erythrocytes. It is noted that the higher concentration of DMSO is, the lower the degree of staining manifestation is. After thawing BMC frozen in 7% DMSO solution the value of MHC was the closest to the control index in blast cells, myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, rod nuclear cells and the cells of monocyte row, therefore, this concentration of DMSO possessed high cryoprotective properties in relation to membrane phospholipids of canine BMC.

It is established that in the investigated canine BMC the changes of phospholipid matrix of membranes occur at the stage of preparation to cryopreservation with DMSO. DMSO solution in 7% concentration provided the maximum protection of membrane bilayer PL.

Влияние факторов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики спермы человека

Н.А. ВОЛКОВА¹, Е.В. ПАВЛОВИЧ¹, А.А. ГАПОН¹, О.Т. НИКОЛОВ², М.П. ПЕТРУШКО¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Effect of Cryopreservation Factors on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm

N.A. VOLKOVA¹, E.V. PAVLOVICH¹, A.A. GAPON¹, O.T. NIKOLOV², M.P. PETRUSHKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

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

Подвижность спермы человека после криоконсервирования является одним из показателей, определяющих успех вспомогательных репродуктивных технологий. В связи с этим важна разработка новых подходов повышения функционального состояния спермы человека после криоконсервирования, которые заключаются в сочетании криопротекторов эндо- и экзоцеллюлярного типов, а также применении электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (КВЧ).

Цель работы – изучение влияния криозащитных сред и электромагнитного излучения КВЧ диапазона на спермии человека после низкотемпературного хранения.

В работе использовали эякуляты человека при астеноспермии, которые криоконсервировали по трехэтапной программе. В качестве криопротекторных сред использовали среды: 1–4% глицерин; 2–5% глицерин с 5% ДМСО; 3–8% глицерин с 2% ПЭО-400. Во всех случаях в состав сред входил 20% БСА. Отогрев осуществляли на водяной бане при 38°C. В образцах оценивали подвижность (фракция $a + v$), жизнеспособность (окрашивание нигрозином и эозином), состояние хроматина (тест 7AAD) сразу после отогрева и облучения КВЧ ($\lambda = 7,1 \text{ мм}$, $f = 42,25 \text{ ГГц}$, $P = 10^{-4} \text{ Вт/см}^2$) в течение 5, 10 и 15 мин.

Подвижность сперматозоидов после криоконсервирования под защитой среды 1 составляла $40 \pm 4\%$, среды 2 – $25 \pm 6\%$, среды 3 – $20 \pm 4\%$. При этом целостность мембраны и состояние ядра во всех исследуемых образцах после криоконсервирования достоверно не изменялись относительно нативных образцов. Облучение образцов спермы после криоконсервирования в течение 5 мин приводило к увеличению подвижности клеток в среде 1 на $10 \pm 2\%$, 2 – на $4 \pm 1\%$, в среде 3 изменений относительно исходных показателей установлено не было. Увеличение времени облучения до 10 и 15 мин не приводило к достоверным изменениям подвижности спермиев. Данные, полученные с использованием теста на включение 7AAD (FACS-анализ), коррелировали с показателями подвижности и жизнеспособности.

Таким образом, представленные результаты показали, что использование смеси 4% глицерина с 20% БСА позволяет сохранить достаточно высокий процент подвижных клеток после низкотемпературного консервирования. Применение КВЧ облучения приводило к увеличению содержания активно-подвижной фракции криоконсервированных спермиев человека без изменения состояния мембраны и ядерного хроматина.

The index of human sperm motility after cryopreservation is one of the important factors determining the successful outcome in assisted reproductive techniques. In this connection the development of new approaches to increase functional state of human sperm after cryopreservation, consisting in the use of combinations of cryoprotectants of endo- and exocellular types, as well as application of electromagnetic irradiation of millimeter range (EHF) is an actual one.

The research aim was to study the effect of cryoprotective media and electromagnetic irradiation of EHF range on human spermatozoa after low temperature storage.

We studied the human ejaculates of patients with astenospermia. Cryopreservation was performed according to three-step program. As cryoprotective media there were used: N1 – 4% glycerol, N2 – 5% glycerol with 5% DMSO; N3 – 8% glycerol with 2% PEO-400. In all the cases the media comprised 20% BSA. Thawing was done in water bath at 38°C. In the samples there were assessed motility (fractions $a + b$), viability (nigrosin and eosin staining), chromatin state (7AAD test) right after thawing and EHF irradiation ($\lambda = 7.1 \text{ mm}$, $f = 42.25 \text{ GHz}$, $P = 10^{-4} \text{ W/cm}^2$) during 5, 10 and 15 min.

Spermatozoa motility after cryopreservation under protection of the medium N1 made $40 \pm 4\%$, for medium N2 it was $25 \pm 6\%$ and $20 \pm 4\%$ for the N3 one. Herewith the membrane integrity and state of nucleus in all the studied samples after cryopreservation did not statistically and significantly change in respect of native samples. Irradiation of sperm samples after cryopreservation during 5 min resulted into a rise in the motility in case of the medium N1 by $10 \pm 2\%$, medium N2 by $4 \pm 1\%$ and in case of the medium N3 no changes were found in respect of initial indices. The increase of irradiation time up to 10 and 15 min did not result in statistically significant changes in spermatozoa motility. The data obtained using the test for 7AAD inclusion (cytofluorimetric analysis) correlated with motility and viability indices.

Thus the presented results have shown that the use of the mixture of 4% glycerol and 20% BSA enabled the preservation of high percentage of motile cells after low temperature storage. Application of EHF irradiation led to the rise in the content of actively motile fraction of cryopreserved human spermatozoa with no change in the state of membrane and nuclear chromatin.

Влияние криоконсервированных аутологических мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на восстановление дегенеративно-дистрофически измененных сухожилий

Н.А. Волкова¹, Е.В. Павлович¹, М.С. Юхта¹, Р.И. Блонский², А.А. Коструб², А.Н. Гольцев¹

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

²ГУ «Институт травматологии и ортопедии» НАМН Украины, г. Киев

Effect of Cryopreserved Autologous Mesenchymal Stromal Cells of Bone Marrow on Regeneration of Degenerative Dystrophically Changed Tendons

N.A. VOLKOVA¹, E.V. PAVLOVICH¹, M.S. YUKHTA¹, R.I. BLONSKY², A.A. KOSTRUB², A.N. GOLTSEV¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Traumatology and Orthopedics

of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

В современной ортопедии и травматологии перспективным направлением является использование биотехнологических методов, в частности клеточной терапии криоконсервированными аутологичными мезенхимальными стромальными клетками (КрАМСК) костного мозга.

Цель настоящей работы – оценить потенциальную возможность применения КрАМСК костного мозга на восстановление дегенеративно-дистрофических повреждений ахилловых сухожилий (АС) у экспериментальных животных.

Дегенеративно-дистрофическое повреждение АС моделировали на взрослых крысах-самцах массой 300–350 г путем 4-кратного инъекционного введения в толщу АС 0,03 мл препарата «Дипроспан» (бетаметазон) с интервалом в 7 дней. На 28-е сутки в толщу поврежденного сухожилия животным контрольной группы ($n = 10$) вводили 0,1 мл физиологического раствора NaCl, животным опытной группы ($n = 10$) – $0,25 \times 10^6$ КрАМСК. За всеми животными проводили клиническое наблюдение. Из опыта животных выводили на 7, 21 и 45-е сутки после проведения терапии. Качество восстановления сухожилий у животных всех групп оценивали гистологическим и биомеханическим методами.

Результаты гистологического исследования препаратов АС животных с терапией КрАМСК показали, что с 7 по 45-е сутки эксперимента наблюдалась тенденция к нормализации интенсивности окрашивания клеточных элементов сухожильных волокон и появлению участков с увеличенным количеством клеточных элементов, которые отсутствовали в контрольной группе. Прочность сухожилий определяли при помощи теста растяжения на разрыв. У животных контрольной группы прочность сухожилий уменьшалась и к концу эксперимента составляла $2,68 \pm 0,06$ МПа (норма $8,54 \pm 0,14$ МПа). У животных с терапией КрАМСК изменение прочности сухожилий имело положительную динамику, а именно ее увеличение в 1,5 раза на 7-е сутки, 2,3 раза – на 21-е сутки и 2,8 раза – на 45-е сутки относительно контрольной группы животных.

Таким образом, внутрисухожильное введение КрАМСК животным с тендопатией способствует активации репаративно-регенеративных процессов в поврежденной ткани, что выражалось в нормализации гистоструктуры и увеличении прочности сухожилий.

In modern orthopedics and traumatology a prospective direction is the use of biotechnological methods including cell therapy with cryopreserved autologous mesenchymal stromal cells (CAMSCs) of bone marrow.

The research aim was to evaluate the potential use of CAMSCs of bone marrow for regeneration degenerative-dystrophic damages of Achilles tendons (AT) in experimental animals.

Degenerative-dystrophic damage of AT was simulated in adult male rats of 300–350 g weight by 4-fold injection of 0.03 ml preparation Diprosan (betamethasone) into thickness of AT with an interval of 7 days. In the 28th day 0.1 ml of saline solution NaCl was introduced in the thickness of damaged tendon of the control animals ($n = 10$), 0.25×10^6 CAMSCs were done in the animals of the experimental group ($n = 10$). All the animals were under clinical observation. The animals were removed from experiment to the 7th, 21st and 45th days after therapy. Quality of regenerated tendons in animals of all the groups was evaluated by histological and biomechanical methods.

Histological investigation of AT sections in animals after CAMSCs therapy showed that from the 7 to 45th day of the experiment there was a tendency to the normalization of staining intensity of tendon fiber cell elements and the appearance of areas with increased number of cells which were absent in the control group. The strength of the tendons was determined by the test of elongation-at-break. The animals of the control group had decreased tendon strength and by the end of experiment it was 2.68 ± 0.06 MPa (norm was 8.54 ± 0.14 MPa). The animals with CAMSCs therapy had the change in tendon strength with a positive dynamics, namely it 1.5 times increased to the 7th day, 2.3 times did to the 21st day and 2.8 times enhanced to the 45th day if compared to the control group of animals.

Thus, the intratendinous introduction of CAMSCs to animals with tendinopathy enables the activation of reparative-regenerative processes in the damaged tissue that was reflected in the normalization of histostructure and increase of the tendon strength.

Исследование влияния мезенхимальных стволовых клеток на восстановление двигательных и когнитивных функций у крыс после острой фокальной ишемии головного мозга

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, Б.Б. Ивнев, Р.М. Радык

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины, г. Донецк

Study of Mesenchymal Stem Cell Effect on Recovery of Locomotor and Cognitive Functions in Rats after Acute Focal Cerebral Ischemia

V.K. GRIN¹, A.G. POPANDOPULO, B.B. IVNEV, R.M. RADYK

V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Отдельным типом стволовых клеток (СК) взрослого организма являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), основным источником которых является костный мозг. В настоящее время разработаны и апробированы методики выделения МСК, культивирования и наращивания *in vitro* до необходимого количества с сохранением большинства первоначальных свойств данного типа клеточного материала. Относительная простота забора и достаточное количество позволяют использовать в клеточной терапии аутологичные МСК и, в свою очередь, избежать многих этических проблем, а также проблем иммунной совместимости и донорства. Данные экспериментальные исследования доказывают, что МСК – это мультипотентные клетки, способные дифференцироваться *in vitro* в остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном направлениях. Также доказана способность МСК дифференцироваться в кардиомиоцитарном, миоцитарном направлениях, а также в нейроны, астроциты и олигодендроциты.

В данной работе было изучено влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление двигательных и когнитивных функций после острой экспериментальной ишемии головного мозга крыс.

Исследование было проведено на 49 крысах-самках инбредной линии Вистар-Киото. Все животные разделены на 4 группы: I – животные, которым была произведена трепанация черепа без других хирургических манипуляций; II – особи, которым была произведена трепанация черепа с последующей окклюзией средней мозговой артерии СМАО и внутривенным (IIА) и интравентрикулярным (IIВ) введением 0,9% NaCl; III – особи, которым проводилась инъекция МСК внутривенно (IIIА) и интравентрикулярно (IIIВ); IV – интактные животные. Для оценки результатов выполнялось тестирование в установке «открытое поле».

В тесте «открытое поле» по параметру «количество пересеченных квадратов» восстановление функций, статистически неотличимое от нормы, в группе с клеточной терапией определяется на 14-е сутки, а в группе с введением 0,9% NaCl не выявлено в течение всего периода наблюдения: 14 сутки (I – 103,5 ± 3,624; IIА – 19 ± 3,254; IIВ – 22 ± 2,33; IIIА – 98,5 ± 3,684; IIIВ – 92 ± 3,107; IV – 103,9 ± 1,078).

Результаты исследования динамики неврологического статуса крыс линии Вистар-Киото после экспериментальной фокальной ишемии в широком временном спектре при терапевтическом использовании МСК показали положительный эффект трансплантации данного вида клеточного материала.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are certain type of adult stem cells (SCs), the main source of which is bone marrow. Nowadays there have been developed and tested the methods of MSC derivation, culturing and *in vitro* growth to a required amount with preservation of most initial properties of this type of cells. The relative simplicity of sampling and sufficient amount allow to use autologous MSCs in cell therapy and, in its turn, to avoid many problems of ethics as well of immune matching and donation. The data of experimental studies demonstrate that MSCs are multipotent cells, capable of *in vitro* differentiation towards osteogenic, chondrogenic and adipocyte direction. The ability of MSCs to differentiate towards cardiomyocytes, myocytes, neurons, astrocytes and oligodendrocytes is also proved.

In this research we studied the effect of mesenchymal stem cells to recovery motor and cognitive functions after acute experimental cerebral ischemia in rats.

The study was performed in 49 Wistar-Kyoto female rats. All the animals were divided into 4 groups: the first group were the animals exposed to craniotomy without other surgical procedures; the second one – the animals exposed to craniotomy with the following occlusion of medial cerebral artery MCAo with intravenous (IIA) and intraventricular (IIB) introduction of 0.9% NaCl; the third – the animals injected intravenously of MSCs (IIIA) and intraventricularly (IIIV); the fourth group were intact animals. The evaluation of the results was made in the open field test.

According to number of crossed squares in the open field test the functional recovery statistically indistinguishable from the norm was found to the 14th day in group with cell therapy, and in group with introduction of 0.9% NaCl is was not revealed during observation: 14th day (I – 103.5 ± 3.624; IIА – 19 ± 3.254; IIВ – 22 ± 2.33; IIIА – 98.5 ± 3.684; IIIВ – 92 ± 3.107; IV – 103.9 ± 1.078).

The results of studying the dynamics of neurological status of Wistar-Kyoto rats after experimental focal ischemia in a wide time range after therapeutic application of MSCs have shown a positive effect of transplantation of this cell material.

Оценка проницаемости мембран эритроцитов с помощью осмотического шока

О.М. ДЕНИСОВА¹, Дж. М. НИЦШЕ², Л.А. ВОДОПЬЯНОВА¹, Г.Ф. ЖЕГУНОВ¹

¹Харьковская государственная ветеринарная академия

²Университет Буффало, Университет штата Нью-Йорк, Буффало

Characterization of Erythrocyte Membrane Permeability by Osmotic Shock

O.M. DENYSOVA¹, J.M. NITSCHÉ², L.A. VODOPYANOVA¹, G.F. ZHEGUNOV¹

¹Kharkov State Veterinary Academy, Kharkov, Ukraine

²University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, USA

Для проявления криозащитного эффекта молекулы криопротектора должны проникнуть внутрь клетки, поэтому количественное описание проницаемости клеточной мембраны для этих молекул давно является ключом для механистического толкования их функции. В этой работе предложено определение параметров проницаемости с использованием осмотического шока. При этом считается, что: (I) кренация происходит главным образом мгновенно после погружения эритроцитов в концентрированный раствор криопротектора, с последующим медленным проникновением криопротектора через мембрану в течение определенного периода t , а (II) гемолиз происходит при последующем переносе эритроцитов из концентрированного раствора криопротектора в солевой раствор, если t был достаточно велик, для того чтобы в клетку проникло столько криопротектора, чтобы конечный осмотически равновесный объем клетки превысил порог механической прочности мембраны.

Классические подходы опираются на отдельный эксперимент для определения «критического» порогового объема, при котором 50% эритроцитов подвергаются гемолизу. Мы вместо этого ввели вероятностное распределение для суммарного значения гемолиза (в процентах) в зависимости от объема клетки с регулируемым параметром ширины. Как коэффициент проницаемости криопротектора, так и ширина распределения определяются независимо, исходя только из процедуры подбора соответствующих данных о выраженных в процентном значении гемолиза в зависимости от времени проникновения t . Мы обнаружили, что начальная кренация, по видимому, делает эритроциты более хрупкими, а критический объем достигается меньшими значениями осмотического шока, по сравнению с определяемыми ранее. Новые данные, полученные с помощью более последовательного анализа, дают меньшие величины проницаемости по сравнению с классическими определениями вплоть до порядка величины. В докладе представлены данные экспериментов по определению проницаемости мембраны для глицерина и ДМСО на эритроцитах крупного рогатого скота и лошадей при различных температурах от 0 до 37°C. Приводятся механистические выводы путем сравнения собственных результатов с новой детальной критической оценкой свойств проницаемости, присущих бислойным мембранам.

Insofar as cryoprotectant molecules must enter erythrocytes to be effective, quantitative understanding of the permeability of the cell membrane to these molecules has long been key to the mechanistic understanding of their function. This talk describes a novel revisitation of permeability determinations by osmotic shock, in which: (i) crenation occurs essentially instantaneously upon immersion of erythrocytes in a concentrated cryoprotectant solution, followed by slow membrane penetration of the cryoprotectant over a specific period t , and (ii) hemolysis occurs upon subsequent removal of the erythrocytes from the concentrated cryoprotectant solution and immersion in saline if t was long enough for so much cryoprotectants to have entered that the final osmotically equilibrated cell volume exceeds the mechanical threshold of the membrane.

Classical approaches rely on a separate experiment to determine the 'critical' threshold volume at which 50 percent of erythrocytes undergo hemolysis. We instead introduce a probability distribution for cumulative percentage hemolysis as a function of cell volume with an adjustable width parameter. Both the cryoprotectant permeability coefficient and the width of the distribution are determined in a self-contained manner from best fits to osmotic shock data alone expressed in terms of percentage hemolysis as a function of permeation time t . We find that the initial crenation apparently renders erythrocytes more fragile and makes the critical volume applicable to the actual osmotic shock experiment smaller than usually determined separately. The new, more self-consistent data analysis yields permeabilities smaller than classical determinations by up to an order of magnitude. We demonstrate our procedure with reference to glycerol and DMSO membrane permeability for bovine and equine erythrocytes at various temperatures between 0 and 37°C. Mechanistic conclusions are suggested by comparing our results with a detailed new critical assessment of the intrinsic permeability properties of bilayer membranes.

Динамика уровня тестостерона при применении препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» в комплексном лечении сочетанной патологии

В.Н. ЖДАН, А.А. КАПУСТЯНСКАЯ, В.И. ШЕПИТЬКО, А.Л. ЧЕЛИШВИЛИ, Л.Е. БОБЫРЕВА

Высшее государственное учебное заведение Украины

«Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

Dynamics of Testosterone Level After Applying 'Cryocell – Placental Cryoextract' Preparation in Combined Treatment of Associated Pathology

V.N. ZHDAN, A.A. KAPUSTYANSKAYA, V.I. SHEPITKO, A.L. CHELISHVILI, L.E. BOBYREVA

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Оценено влияние препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» на уровень тестостерона при обострении подагрического артрита у больных с ожирением. Под наблюдением находились 107 мужчин, больных подагрическим артритом с ожирением. Средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 0,75$ года. Длительность заболевания в среднем была $6,0 \pm 0,66$ года. Согласно поставленной задачи и по характеру лечения больные были разделены на следующие группы: 1 (основная) – 52 (48,6%) больных подагрическим артритом с ожирением, которые на фоне базисной терапии дополнительно получали препарат группы «Криоцелл – криоконсервированный экстракт плаценты» (ККЭП) в дозе 1,8 мл внутримышечно через день трижды; 2 (сравнительная) – 55 (51,4%) больных подагрическим артритом с ожирением, получавших только базисную терапию.

У всех мужчин с ожирением наблюдается снижение уровня тестостерона, что подтверждает важность определения уровня тестостерона у больных подагрическим артритом с ожирением. Так, снижение уровня тестостерона, особенно при наличии ожирения II и III степеней, характеризуется максимальной гиперурикемией и подтверждает связь абдоминального ожирения с уровнем тестостерона у больных подагрическим артритом. Сниженный уровень концентрации тестостерона приводит к повышению уровня маркеров воспаления и может способствовать развитию и прогрессированию ожирения. При комплексной терапии с использованием ККЭП не отмечалось супрафизиологических пиковых концентраций тестостерона в течение всего периода наблюдения. Эффективность лечения больных основной группы значительно превышала таковую в группе сравнения. Наибольший эффект от предложенной комплексной терапии с ККЭП наблюдался через 12 недель после начала лечения. Уровень тестостерона достоверно увеличился (59,57%) у больных группы 1 ($p < 0,05$) по сравнению с группой 2 (9,07%, $p < 0,05$).

Установлено, что после использования ККЭП в комплексном лечении уровень тестостерона в течение 12 недель поддерживается в физиологических пределах. Комплексная терапия с ККЭП имеет значительное преимущество перед другими схемами лечения, которые в среднем предполагают 22 инъекции тестостерона в год.

Использование препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» в комплексном лечении обострения подагрического артрита у больных с ожирением способствует повышению и нормализации уровня тестостерона на фоне клинического улучшения состояния больных с сочетанной патологией.

The influence of 'Cryocell – placental cryoextract' preparation on testosterone level under gouty arthritis aggravation in the patients with obesity was estimated. We observed 107 men with gouty arthritis and obesity. The average age of the patients was 48.8 ± 0.75 years. The disease duration was in average 6.0 ± 0.66 years. According to the task set and by the treatment origin, the patients were divided into the following groups: group 1 (main) – 52 (48.6%) patients with gouty arthritis and obesity, received at the background of basic therapy the preparation of 'Cryocell' group: cryopreserved placental extract (CPPE) in 1.8 ml dose intramuscularly thrice in a day, and group 2 (control) – 55 (51.4%) patients with gouty arthritis and obesity, received only basic therapy.

In all men with obesity we observe a decrease in testosterone level, that confirms the importance of testosterone level determining for the patients with gouty arthritis and obesity. Thus a decrease in testosterone level, especially in presence of obesity of the 2nd and 3rd degrees, is characterized by the maximum hyperuricemia and confirms the link of abdominal obesity with testosterone level in the patients with gouty arthritis. Reduced testosterone level results in an increased level of inflammatory markers and may contribute to obesity development and progression. Under a combined treatment with CPPE use no supraphysiological peaks of testosterone concentrations within the whole observation period were observed. The treatment efficiency in patients of the main group greatly exceeded that one in the control group. The highest effect of the proposed complex therapy with CPPE was observed in 12 weeks after treatment beginning. The testosterone level was statistically and significantly increased (59.57%) in patients of group 1 ($p < 0.05$) compared with the group 2 (9.07%, $p < 0.05$).

It was established, that after using CPPE in a combined treatment the testosterone level during 12 weeks was kept within physiological limits. Combined therapy with CPPE has a significant advantage over other treatment protocols, suggesting 22 testosterone injections per year in average.

Application of 'Cryocell – placental cryoextract' preparation in a combined treatment of aggravation of gouty arthritis in patients with obesity contributes to the augmented and normalized testosterone level at the background of clinical improvement of patients' state with associated pathology.

Вивчення токсичного впливу різних синтезованих сполук на життєздатність *Saccharomyces cerevisiae*

Н.Г.КАДНІКОВА, А.М.КОМПАНІЄЦЬ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Study of Toxic Effect of Various Synthesized Compounds on Viability of *Saccharomyces cerevisiae*

N.G. KADNIKOVA, A.M. KOMPANIETS

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

Пошук ефективних способів кріозахисту біологічних об'єктів залишається актуальною задачею кріобіології. Одним із вивчених модельних об'єктів досліджень є дріжджі.

Метою нашого дослідження було з'ясування впливу різних кріопротекторів – формаміду (ФА), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та диметилацетаміду (ДМАц), у тому числі синтезованих у відділі кріопротекторів ІПКіК НАН України ацетилморфоліну (АМ), N-(β -оксиетил) ацетаміду (АА) на життєздатність дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Культуру *S. cerevisiae* отримували в стаціонарній стадії розвитку на стандартному середовищі UERD за умов безупинного аерування при 30°C. Вплив синтезованих сполук у кінцевих концентраціях 1, 5, 10 і 15% на життєздатність дріжджів досліджували протягом 5, 10 або 30 хв при кімнатній температурі та при 30°C.

При температурі експозиції 30°C 1%-й АМ не впливав на життєздатність клітин дріжджів. Концентрації ДМАц і ФА 1, 5, 10% та 1%-й 1,2-ПД також не впливали на життєздатність дріжджів при експозиції клітин у цих розчинах протягом 5 хв. Додавання розчинів цих сполук до кінцевої концентрації 1% у клітинних суспензіях з подальшою 15-хвилинною експозицією також не впливало на життєздатність *S. cerevisiae*. Збільшення концентрації ДМАц, 1,2-ПД, ФА або терміну експозиції призводило до загибелі клітин дріжджів, але достовірно менше порівняно з еквілібрацією клітинної суспензії з АМ та АА протягом 30 хв.

При кімнатній температурі експозиції (20°C) протягом 30 хв тільки АМ і ФА у концентрації 10% виявили тенденцію зниження кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) дріжджів. Це дозволяє нам зробити висновок, що розчини сполук ДМАц, 1,2-ПД, ФА при тривалій експозиції (30°C) були менш токсичні для культури *S. cerevisiae*, а при зниженні температури експозиції кількість КУО дріжджів достовірно не змінювалась порівняно з контролем.

Таким чином, використання ДМАц, 1,2-ПД, ФА є перспективним для подальшої розробки методичних підходів у створенні кріозахисних сумішей, які менш токсичні і більш ефективні, ніж один кріопротекторний агент.

Searching effective ways of biological objects' cryoprotection has remained an actual problem in cryobiology. Yeasts are ones of the well studied model objects of research.

The research aim was to determine effect of different cryoprotectants such as: formamide (FA), 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethylacetamide (DMAc), including synthesized at the Department of cryoprotectants of the IPC&C of the NAS of Ukraine acetylmorpholin (AM), N-(β -oxyethyl) acetamide (AA) on viability of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts.

Culture *S. cerevisiae* was kept at stationary stage in UERD standard medium under continuous aeration at 30°C. Effect of the synthesized compounds in final concentrations of 1, 5, 10 and 15% on the viability of yeasts was studied for 5, 10 or 30 min at room temperature and 30°C.

At exposure temperature 30°C 1% AM did not affect the viability of yeast cells. Concentrations of DMAc and FA of 1, 5, 10% and 1% 1,2-PD also did not affect the viability of yeast cells at cell exposure in these solutions for 5 min. Addition of these compounds solutions to final concentration of 1% to cell suspensions with the following 15-min exposure also did not affect the viability of *S. cerevisiae*. Increasing concentrations of DMAc, 1,2-PD, FA or exposure term resulted in the death of yeast cells, but significantly less than equilibration of cell suspension with AM and AA for 30 min.

Reduction of the colony forming units (CFUs) number of yeasts was revealed at room temperature exposure (20°C) for 30 min only with 10% AM and FA. This allows us to conclude that DMAc, 1,2-PD, FA solutions at long-term exposure (30°C) were less toxic to *S. cerevisiae* culture, and when decreasing exposure temperature a number of yeast CFUs was not significantly changed if compared with the control.

Thus, use of DMAc, 1,2-PD, FA is perspective for further development of methodological approaches in creating cryoprotective mixtures less toxic and more effective than one cryoprotective agent.

Консервирующие растворы для замораживания клеток крови на основе комбинаций криопротекторов

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

Preserving Solutions Based on Combinations of Cryoprotectants for Freezing Blood Cells

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

В последние годы активно разрабатываются новые подходы к созданию более эффективных консервирующих растворов для низкотемпературного консервирования различных клеток и тканей. Один из них – создание криоконсервантов, содержащих комбинации двух, трех и более криопротекторов.

При разработке криоконсервантов для замораживания клеток крови (эритроциты, тромбоциты) нами использован принцип сочетания в криозащитном растворе двух криопротекторов в различных комбинациях. При замораживании тромбоцитов исследованы растворы, содержащие комбинации ДМАц с 1,2-ПД, глицерином и ОЭГ_{n=5}, а также 1,2-ПД с глицерином и ОЭГ_{n=5} в 5, 10 и 15%-й суммарной концентрации; при замораживании эритроцитов исследована криозащитная эффективность растворов, содержащих разные комбинации ОЭГ_{n=25} с 1,2-ПД, ДМАц и ДМСО в суммарной концентрации 30%.

Экспериментально показана целесообразность создания криоконсервантов для замораживания тромбоцитов на основе использования в растворе комбинации двух криопротекторов, относящихся к разным классам химических соединений – амидов и полиолов. Такой подход позволяет применять эффективную для криозащиты суммарную концентрацию криопротекторов в криоконсерванте без увеличения цитотоксического действия, что рассматривается как один из факторов существенного повышения результатов криоконсервирования тромбоцитов.

Установлено, что введение в состав криозащитных растворов на основе непроникающего ОЭГ_{n=25} низкомолекулярных проникающих криопротекторов 1,2-ПД, ДМСО или ДМАц в разных соотношениях способствует уменьшению осмотической хрупкости криоконсервированных эритроцитов. Наиболее высокий уровень сохранности эритроцитов по данному показателю получен при использовании криозащитного раствора, содержащего комбинацию ОЭГ_{n=25} и ДМАц.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований по разработке комбинированных криоконсервантов для замораживания клеток крови.

Recently new approaches to design more effective preserving solutions for low-temperature preservation of various cells and tissues have been actively developed. One of them is the designing of the cryopreservatives containing combinations of two, three or more cryoprotectants.

When developing cryopreservatives for freezing of blood cells (red blood cells, platelets), we used the principle of combining cryoprotective solutions of two cryoprotectants in various combinations. When freezing platelets there were studied the solutions containing the combinations of DMAc with 1,2-PD, glycerol and OEG_{n=5} and 1,2-PD with glycerol and OEG_{n=5} in 5, 10 and 15% total concentration; when freezing erythrocytes there was investigated a cryoprotective efficiency of the solutions containing different combinations of OEG_{n=25} with 1,2-PD DMAc and DMSO in total concentration of 30%.

It was shown the expediency of creation of cryopreservatives for the freezing of platelets using a combination of two cryoprotectants, belonging to different classes of chemicals, amides and polyols. Such an approach allows the application of effective for cryoprotection total concentration of cryoprotectants in a cryopreservative solution without increasing the cytotoxic effect, that could be considered as one of the factors of significant improving the platelet cryopreservation results.

It has been found that the introduction into the composition of cryoprotective solutions based on non-penetrating OEG_{n=25} of low molecular penetrating cryoprotectants 1,2-PD, DMSO or DMAc in different ratios contributes to the lessening of osmotic fragility of cryopreserved red blood cells. The highest integrity level by this index for erythrocytes was obtained using cryoprotective solution containing the combination of OEG_{n=25} and DMAc.

The findings indicate the expediency of following research on the development of combined cryopreservatives for freezing blood cells.

Криоконсервирование клеток крови и их долгосрочное хранение в низкотемпературных банках

А.М. КОМПАНИЕЦ, А.В. НИКОЛЕНКО, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Blood Cells and Their Long-Term Storage in Low Temperature Banks

A.M. KOMPANIETS, A.V. NIKOLENKO, A.N. GOLTSEV

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

Криоконсервирование и создание запасов клеток крови в низкотемпературных банках предоставляет возможность решения ряда проблем, связанных, прежде всего, с обеспечением стандартов качества обследования и долгосрочного (десятилетия) хранения, инфекционной безопасности и рационального использования компонентов донорской крови в повседневной медицинской практике и непредусмотренных критических ситуациях.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины (ИПККиК) НАН Украины с первых дней его основания (1972 г.) выполняются фундаментальные и прикладные исследования, направленные на решение проблемы долгосрочного хранения компонентов донорской крови человека для клинической практики. На протяжении 40 лет ИПКиК НАН Украины принимал непосредственное участие в разработке методологических и технологических подходов к созданию криобанков клеток крови и других биологических объектов на основе глубокого теоретического обоснования и экспериментально подтвержденных данных. Институт совместно с Специальным конструкторско-технологическим бюро с опытным производством имеет многолетний опыт создания специального криогенного оборудования для криобанков крови.

В докладе представлены методы и технологии криоконсервирования компонентов донорской крови человека, автором и разработчиком которых является ИПКиК НАН Украины. В частности, это оригинальная технология криоконсервирования эритроцитов донорской крови с криоконсервантом «Пропандиосахароль» при температуре $-150...-196^{\circ}\text{C}$. Эта технология отличается упрощением процедуры обработки клеток перед замораживанием, стабильным воспроизведением результатов криоконсервирования, возможностью ограничения количества отмываний размороженных эритроцитов (1- или 2- кратное отмывание) и, следовательно, упрощением и удешевлением процесса их криоконсервирования при высокой его эффективности.

Обсуждаются результаты создания новых эффективных криозащитных сред для криоконсервирования тромбоцитов донорской крови человека.

Cryopreservation and storage of blood cells in low-temperature banks allow to solve some problems associated, first of all, with ensuring the quality standards of testing and long-term (decades) storage, infectious safety and efficient application of donor blood components in everyday medical practice and unforeseen emergencies.

At the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (IPC&C) of the NAS of Ukraine since the early days of its foundation (1972) the fundamental and applied researches directed to solving the problem of long-term storage of human donor blood components for clinical practice have been performed. For 40 years IPC&C of the NAS of Ukraine has been directly involved in the development of methodological and technological approaches to establish the cryobanks of blood cells and other biological objects based on a profound theoretical substantiation and experimentally confirmed data. The Institute in cooperation with the Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit has had a long-term experience of creating a special cryogenic equipment for blood cryobanks.

We would present the methods and technologies of cryopreservation of human donor blood components, the author and developer of which is IPC&C of NAS of Ukraine. Particularly, this is original cryopreservation technology of donor blood erythrocytes with Propandiosakharol cryoprotectant at $-150...-196^{\circ}\text{C}$. This technology is characterized by simplifying the procedures of cell treatment before freezing, stable reproducibility of cryopreservation results, possible limiting the quantities of washings for frozen-thawed erythrocytes (1- and 2-fold washings) and, therefore, simplification and cheapening of their cryopreservation with high efficiency.

The results of development of new effective cryoprotective media for cryopreservation of human donor blood platelets are also discussed.

Использование криоконсервированных клеток плаценты для снижения аутореактивности иммунокомпетентных клеток при адьювантном артрите

Е.Д. ЛУЩЕНКО, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, М.В. ОСТАНКОВ, Л.В. ОСТАНКОВА, Н.А. БОНДАРОВИЧ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Cryopreserved Placenta Cells for Decreasing Autoreactivity of Immunocompetent Cells during Adjuvant Arthritis

E.D. LUTSENKO, A.N. GOLTSEV, M.V. OSTANKOV, L.V. OSTANKOVA, N.A. BONDAROVICH
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Способность различных структур плаценты воздействовать на иммунную систему является предпосылкой использования криоконсервированных клеток плаценты (КП) в терапии аутоиммунных заболеваний. Вопрос изменения иммуномодулирующих свойств КП после замораживания мало изучен.

Целью работы было определение аутореактивности клеток селезенки животных с адьювантным артритом после применения суспензии нативных и криоконсервированных КП.

Адьювантный артрит (АА) индуцировали у мышей линии СВА/Н субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. КП выделяли из хориального участка на 18–19-е сутки гестации. Криоконсервирование КП осуществляли под защитой 10%-го раствора димексида или пропандиосахарола (ПДС) и вводили в дозе 1×10^6 клеток на мышь на 7-е сутки развития патологии. На 28-е сутки клетки селезенки животных исследованных групп были введены внутривенно вторичным реципиентам – интактным мышам той же линии. У вторичных реципиентов (группа 1 – введение клеток селезенки интактных животных; 2 – введение клеток селезенки животных с АА; 3 – введение клеток селезенки животных с АА, которых лечили нативными КП; 4 – введение клеток селезенки животных, которых лечили КП, криоконсервированными с ПДС) были оценены иммунологические и гематологические показатели развития патологии.

Отечность суставов и состояние популяций иммунокомпетентных клеток (ИКК) после применения нативных или криоконсервированных в различных режимах КП определялись видом вводимого материала и сроками наблюдения. После введения нативных КП наблюдали снижение индекса артрита только до 14-х суток. После применения КП, криоконсервированной с ПДС, ряд показателей восстанавливался в более ранние сроки, чем после применения клеток, криоконсервированных с ДМСО. На 28-е сутки различия в уменьшении отечности сустава после применения препаратов криоконсервированных КП не были выражены. У вторичных реципиентов группы 2 установлены потеря массы тела, развитие отека суставов, ухудшение клинических показателей крови. У животных группы 3 гематологические показатели сохранялись на уровне интактных животных. В группе 4 отмечены нормализация содержания ЦИК, отсутствие отечности суставов.

На основании анализа фенотипического и функционального состояния ИКК установлено, что введение криоконсервированных КП обуславливает снижение выраженности клинических проявлений АА, минимизируя функциональную активность аутореактивных клеток.

The ability of different placenta structures to affect the immune system is the foreground for using cryopreserved placenta cells (PCs) in therapy of autoimmune diseases. The question of changes of PC immunomodulating properties after freeze-thawing has remained insufficiently studied.

Research aim was to assess the spleen cells autoreactivity in animals with adjuvant arthritis after application of native and cryopreserved PC suspension.

Adjuvant arthritis (AA) was induced in CBA/H mice by subplantar introduction of complete Freund adjuvant. PCs were isolated from chorial region to the 18–19th days of gestation. PCs were cryopreserved under protection of 10% dimethylsulfoxide or propandiosaccharol (PDS) and introduced in dose of 1×10^6 cells per mouse to the 7th day of pathology development. To the 28th day the spleen cells of animals of investigated groups were introduced intravenously into secondary recipients, intact mice of the same line. Immunological and hematological indices of pathology development were evaluated in secondary recipients (group 1 – introduction of spleen cells of intact animals, 2 – introduction of spleen cells of animals with AA; 3 – introduction of spleen cells of animals with AA treated with cryopreserved with PDS PCs).

Swelling joints and the state of immunocompetent cells (ICC) population after the use of native and cryopreserved in various regimens PCs were dependent on the type of the introduced material and observation terms. After introduction of native PCs the decrease of arthritis index was observed only to the 14th day. After application of PCs cryopreserved with PDS some indices restored in earlier terms than after application of cells cryopreserved with DMSO. To the 28th day the differences in decrease of swelling joints after the use of cryopreserved PC preparations were not pronounced. Secondary recipients were established to have the loss of body weight, development of swelling joints, aggravating of clinical blood counts. The animals of group 3 had their hematological indices preserved at the level of intact animals. Normalization of ICC content and absence of swelling joints were noted in group 4.

Basing the analysis of ICC phenotypic and functional state we have established that introduction of cryopreserved PCs stipulates the pronounced decrease of AA clinical implications minimizing a functional activity of autoreactive cells.

Вплив «Сандіму» на розвиток імунної відповіді при внутрішньоочеревинному введенні алогенних фетальних нейроклітин у мишей

Л.Д. Любич, М.І. Лісяний

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад.А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ

Effect of Sandimmun on Development of Immune Response Under Intraperitoneal Injection of Allogeneic Fetal Neural Cells in Mice

L.D. LYUBICH, M.I. LISYANY

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Успішність трансплантації нейральних стовбурових клітин (НСК) та нейральних клітин-прекурсорів (НКП) для заміщення втрачених або порушених функцій ЦНС визначається тривалим виживанням пересаджених клітин, інтеграцією з системою реципієнта, а також відсутністю імунообумовлених ускладнень. Згідно з даними [Ubiali F. *et al.*, 2007; Wang X.J. *et al.*, 2007; Ideguchi M. *et al.*, 2008] НСК розпізнаються і викликають імунну відповідь в ало-і ксеногенних системах *ex vivo*, тобто рівень їх імунологічного потенціалу є достатнім для активації периферичних лімфоцитів реципієнта. Для пригнічення імунних реакцій при трансплантації застосовують різні підходи: призначення імуносупресивних препаратів, моделювання імунологічної толерантності у реципієнта, застосування для трансплантації генетично модифікованих НСК.

Метою даної роботи була оцінка можливості пригнічення імунної відповіді при системному введенні фетальних нейроклітин за допомогою препарату «Сандімум» (циклоспорин А для парентерального введення) – циклічного поліпептиду з вираженою імуносупресивною дією, який інгібує розвиток реакцій клітинного типу і Т-залежне утворення антитіл.

Клітинні суспензії фетальних НКП (E13–15) від мишей-донорів лінії СВА вводили внутрішньоочеревинно мишам-реципієнтам C57BL/6 у кількості 1×10^6 клітин на тварину ($n=42$). Частині тварин ($n=18$) проводили імуносупресію «Сандімумом» у кількості 100 мкг на тварину на 0, 3, 6-у доби. Контролем були інтактні тварини ($n = 12$). Через 6, 12, 18 та 37 діб після введення клітин проведено дослідження алоімунних та антигенспецифічних реакцій.

Клітинні алоцитотоксичні імунні реакції генерувалися у відповідь на внутрішньоочеревинне введення фетальних НКП (E13–15) з максимальним проявом на 6–12-у доби після імунізації і подальшим поступовим зниженням до 37-ї доби. Призначення «Сандімуму» зменшувало ці прояви, починаючи вже з 12-ї доби. Гуморальні алоцитотоксичні імунні реакції досягали максимуму на 12–18-у доби і зменшувалися з 18-ї по 37-у добу дослідження. Рівень алоцитотоксичних антитіл знижувався до норми під впливом «Сандімуму» до 37-ї доби.

Після системного введення фетальних НКП (E13–15) зафіксовано підвищений рівень антитіл до ОБМ (18 доба) та S-100 (37 доба). Корекція «Сандімумом» в дозі 100 мкг на 0, 3 та 6-у доби зменшувала рівень нейроаутоантитіл на 37-у добу до норми.

Використання імуносупресорного препарату «Сандімум» дозволяє значно знизити прояви реакцій трансплантаційного імунітету та рівень гуморальної нейросенсибілізації, це обґрунтовує показання до обов'язкового застосування імуносупресії при клінічній нейротрансплантації клітин фетального мозку.

Successful transplantation of neural stem cells (NSCs) and neural precursor cells (NPCs) for the replacement of lost or damaged functions of CNS is determined by long-term survival of transplanted cells, integration with the recipient system, as well as absence of immune-mediated complications. According to Ubiali F. *et al.* (2007), Wang X.J. *et al.* (2007), Ideguchi M. *et al.* (2008), NSCs are recognized and initiate an immune response in allo- and xenogeneic systems *ex vivo*, i.e. the level of their immunological potential is sufficient to activate peripheral lymphocytes of the recipient. For suppression of immune responses after transplantation there are used various approaches such as prescription of immunosuppressive preparations, initiation of immunological tolerance in the recipient, the use for transplantation of genetically modified NSCs.

The research aim was to evaluate the possibilities of suppression of immune response by systemic injection of fetal neural cells with preparation Sandimmun (cyclosporin A for parenteral introduction) that is cyclic polypeptide with a pronounced immunosuppressive effect, which inhibits the development of cell-type reactions and T-dependent anti-body formation.

Cell suspensions of fetal NPCs (E13–15) from donor CBA mice were injected intraperitoneally in mice-recipients S57BL/6 in amount of 1×10^6 cells per animal ($n = 42$). Part of animals ($n = 18$) were subjected to immunosuppression with Sandimmun of 100 μ g per animal in 0, 3, 6th day. The control were intact animals ($n = 12$). In 6, 12, 18 and 37 days after injection of cells the study of alloimmune and antigen reactions.

Cellular alocytotoxic immune reactions generated as a response to intraperitoneal introduction of fetal NPCs (E13–15) with maximum expression to the 6–12th day after immunization and following gradual decrease to the 37th day. Prescription of Sandimmun reduced these manifestations starting from the 12th day. Humoral alocytotoxic immune responses reached their maximum to the 12–18th day and decreased from the 18th to 37th day of the study. The level of alocytotoxic antibodies decreased to the norm under the influence of Sandimmun to the 37th day.

After systemic introduction of fetal NPCs (E13-15) an elevated level of antibodies to myelin basic protein (18th day) and S-100 (37th day) was reported. Correction with Sandimmun in the dose of 100 μ g in 0, 3 and 6th days decreased the level neuroautoantibodies to the 37th day to the norm.

The use of immunosuppressive preparation Sandimmun enables to significantly reduce the manifestation of transplantation immunity reactions and the level of humoral neurosensibilization. This substantiates the indications for mandatory use of immunosuppression in the clinical neurotransplantation in fetal brain cells.

Влияние растворов криопротекторов на выживаемость эмбрионов карася

К.Б. МИКСОН, В.В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryoprotectant Solutions on Survival of Crucian Carp Embryos

K.B. MIKSON, V.V. CHEREPANOV

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

Подготовка биообъекта к замораживанию включает экспозицию в криозащитных средах, содержащих как проникающие, так и непроникающие компоненты. Криопротекторы добавляют в среду, где проводится инкубация эмбрионов на этапе, предшествующем глубокому охлаждению, что может нарушать осмотическое равновесие в системе «клетка – окружающий раствор», а также оказывать токсичное воздействие.

Цель исследования – оценить влияние криопротекторов на эмбрионы карася, что позволит рекомендовать их для введения в состав многокомпонентной криозащитной среды.

Эксперименты проводили на эмбрионах карася (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) на стадии развития, соответствующей образованию 32–64 сомитов. Процедуру гонадотропной инъекции самкам и самцам, а также получение половых продуктов и осеменение осуществляли в соответствии с рекомендациями рыбоводных хозяйств. Инкубацию эмбрионов проводили в чашках Петри по 100–150 шт в каждой при температуре $(18–21,5) \pm 0,1^\circ\text{C}$. Оценка состояния эмбрионов на всех стадиях развития определяли визуально с помощью микроскопа МБС-9 в соответствии с картами эмбрионального развития. За эмбрионами в исследуемых группах и контроле наблюдали до стадии выклева. В экспериментах исследовалось влияние растворов криопротекторов 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 1,3-пропандиола (1,3-ПД), 1,3-бутандиола (1,3-БД), 1,4-бутандиола (1,4-БД), диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-диметаоксиэтана (ДМОЭ), глицерина, этиленгликоля (ЭГ), метанола, полиэтиленоксида (ПЭО-1500) и раствора сахарозы с 10%-й концентрацией в течение 60 мин на выживаемость эмбрионов карася на стадии развития 32–64 бластомеров.

Было установлено, что растворы глицерина, метанола и ДМОЭ значительно снижают уровень выживаемости эмбрионов карася ($13,6 \pm 2,7$; $28,8 \pm 4,6$ и $26,25 \pm 4,2\%$ соответственно) по сравнению с контролем. Выживаемость эмбрионов в растворах сахарозы и криопротекторов 1,2-ПД, 1,3-ПД не имеет статистически значимых отличий от контроля ($79,7 \pm 5,7$; $70,1 \pm 6,7$, $68 \pm 7,0$ и 90% соответственно) и могут быть непосредственно использованы в криозащитных средах. Растворы криопротекторов 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО-1500 не имеют статистически значимых отличий от перечисленных выше растворов ($57,1 \pm 4,3$; $50,3 \pm 6,1$; $61,3 \pm 6,3$ и $57,9 \pm 4,9\%$ соответственно) и также могут быть рекомендованы после соответствующих исследований влияния их концентраций на выживаемость.

Таким образом, полученные данные показывают возможность дальнейшего использования растворов сахарозы, 1,2-ПД, 1,3-ПД, 1,3-БД, 1,4-БД, ЭГ, ПЭО-1500 в различных комбинациях, как базовых, при создании комплексных криозащитных сред.

Preparing a biological object to freezing involves exposure in cryoprotective media containing both penetrating and non-penetrating components. Cryoprotectants are added to the medium for incubation of embryos at the stage prior to deep cooling, that can disorder an osmotic balance in the 'cell-environment' system as well as affect toxically.

The research aim was to evaluate the effect of cryoprotectants on crucian carp embryos to choose multi-component cryoprotective media composition.

Experiments were carried-out in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch, 1783) embryos at the stage of development corresponding to the formation of 32–64 somites. The procedure of gonadotropic injection to males and females, as well as obtaining of reproductive products and insemination were performed in accordance with fish-breeding recommendations. Embryos were incubated in Petri dishes by 100–150 embryos in each at $(18–21.5) \pm 0.1^\circ\text{C}$. The embryos at all stages of development were visually assessed using microscope MBS-9 in accordance with the maps of embryonic development. Embryos in the studied and control groups were observed up to the stage of hatching. In the experiments, the influence of 60 min exposure in solutions of cryoprotectants 1,2-propane diol (1,2-PD), 1,3-propane diol (1,3-PD), 1,3-butane diol (1,3-BD), 1,4-butane diol (1,4-BD), dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,2-dimethoxyethane (DMOE), glycerol, ethylene glycol (EG), methanol, polyethylene oxide (PEO-1500) and sucrose solution with 10% concentration on survival of crucian carp embryos at development stage of 32–64 blastomeres.

It was found that solutions of glycerol, methanol and DMOE significantly reduced the survival rate of crucian carp embryos (13.6 ± 2.7 ; 28.8 ± 4.6 and $26.25 \pm 4.2\%$, respectively) if compared with the control. Survival rate of embryos in the solutions of sucrose and cryoprotectants 1,2-PD, 1,3-PD has no statistically significant differences from the control (79.7 ± 5.7 ; 70.1 ± 6.7 , 68 and $90 \pm 7.0\%$ respectively), *i. e.* they can be used as the cryoprotective media component. Cryoprotective solutions of 1,3-BD, 1,4-BD, EG, PEO-1500 do not have statistically significant differences from the above solutions (57.1 ± 4.3 ; 50.3 ± 6.1 ; 61.3 ± 6.3 and $57.9 \pm 4.9\%$, respectively) and may also be recommended after appropriate studies of the effect of their concentrations on a survival.

Thus, the data indicate the possibility of future use of the solutions of sucrose, 1,2-PD, 1,3-PD, 1,3-BD, 1,4-BD, EG, PEO-1500 in various combinations, as components to develop combined cryoprotective media.

Исследование криоконсервированных клеток эмбриональной печени и мультипотентных стромальных клеток тимуса мышей в регенерации иммунной системы летально облученных животных

В.В. Никольская, Е.И. Никольская

Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, г. Киев

Investigation of Cryopreserved Embryonic Liver Cells and Mice Thymus Multipotent Stromal Cells in Regeneration of Immune System of Lethally Irradiated Animals

V.V. NIKOLSKAYA, E.I. NIKOLSKAYA

*Institute of Genetic and Regenerative Medicine
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

В экспериментах использовали криоконсервированные клетки эмбриональной печени (КЭП) и мультипотентные стромальные клетки (МСК) мышей линии СВА, поскольку нативные клетки практически не могли быть собраны в необходимом количестве и качестве по длительности культивирования ко сроку постановки опыта. Клетки криоконсервировали в среде DMEM/F12 с 20% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% ДМСО с использованием программного замораживателя «Кryo 560-16» («Planer»).

На следующий после облучения (9 Гр) день мышам вводили сингенные КЭП 14-го дня гестации или эти же клетки, преинкубированные *in vitro* с растущими в виде колоний МСК в количестве $0,5 \times 10^6$ клеток, которое, как известно, является минимальным при лечении костно-мозгового радиационного синдрома. Иммунную систему исследовали через 30 дней после облучения.

О радиозащитном действии КЭП свидетельствовало увеличение выживаемости животных, которая была почти в 2 раза выше.

КЭП, преинкубированные с МСК тимуса, оказывали более выраженное радиозащитное действие, регистрируемое по выживаемости животных и средней продолжительности жизни, вычисленной методом линейной регрессии, а также по восстановлению массы тела, тимуса, селезенки и клеточности лимфоидных органов. Гуморальный иммунный ответ под влиянием введенных КЭП нормализовался лишь частично, а трансплантация КЭП, преинкубированных с МСК тимуса, приводила практически к полному восстановлению антителогенеза.

Представленные данные свидетельствуют, что в результате контактного взаимодействия с МСК тимуса КЭП приобретают повышенную радиозащитную, регенеративную и иммунобиологическую активность, которая практически не нарушает функции, необходимые для контактного взаимодействия клеток и их участия в процессах, происходящих в иммунной системе.

Cryopreserved embryonic liver cells (ELCs) and multipotent stromal cells (MSCs) of CBA mice were used in experiments, because native cells could not be collected in needed quantity and quality for culturing duration to the term of experiment set-up. The cells were cryopreserved in DMEM/F12 with 20 % of fetal bovine serum and 5 % DMSO with programmable freezer Kryo 560-16 (Planer).

On the following day after irradiation (9 Gy) the mice were injected with syngeneic ELCs of the 14th gestation day or the same cells, which were pre-incubated *in vitro* with growing MSC colonies in quantity of 0.5×10^6 cells which is known as the minimum one during the treatment of bone marrow radiation syndrome. Immune system was investigated in 30 days after irradiation.

The increase in survival rate of animals which was almost twice higher testified to the radiation-protective effect of CELCs.

ELCs pre-incubated with thymus MSCs had more expressed radioprotective effect which was recorded on the survival rate of animals and average life span, calculated by the method of a linear regression, and also on recovery of body weight, thymus, spleen and cell concentration in lymphoid organs. Humoral immune response under the influence of the injected CELCs was normalized just partially and transplantation of CELCs pre-incubated with thymus MSCs, led practically to complete recovery of antibody response.

Presented data testify to the fact that as a result of contact interaction with thymus MSCs the ELCs gain an increased radio-protective, regenerative and immune biological activity which almost does not disorder the functions needed for the contact interaction of cells and their participation in the processes, occurring in immune system.

Влияние криотерапии на показатели гуморального иммунитета

О.А. ПАНЧЕНКО, Н.Л. КОРНИЕНКО, Е.В. ПАВЛОВА, Е.П. ЕВКЛЕВСКАЯ
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

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

Cryotherapy Effect on Humoral Immunity Indices

O.A. PANCHENKO, N.L. KORNIENKO, E.V. PAVLOVA, E.P. EVKLEVSKAYA
M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk, Ukraine
Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center
of Ministry of Health Care of Ukraine, Donetsk, Ukraine

В процессе эволюции человек приобрел способность существования в широких пределах колебаний внешней температуры, сохраняя постоянство температуры ядра. Действие низких температур на организм человека приводит к возникновению реакций во всех физиологических системах организма, в том числе и в иммунной. Механизм действия криотерапии на иммунный статус основан на перестройке физико-химических процессов, обеспечивающей усиленное теплообразование и способность переносить значительные охлаждения без повреждающего действия на организм. Цель исследования – оценить влияние курса криотерапии на показатели гуморального звена иммунитета. Задача работы – исследовать изменение показателей Ig после курса криотерапии.

Исследование проведено на базе ГУ «НПМ РДЦ МЗ Украины» с использованием криокамеры «Zimmer Medizin Systeme» (Германия), создающей низкие температуры до -110°C . Курс криотерапии составлял 20 сеансов, их продолжительность в первый день составляла 0,5 мин, затем увеличивалась на 0,5 мин ежедневно и достигала 3,0 мин к 6-му дню курса. В исследовании приняли участие 80 лиц: 60 женщин (75%) и 20 мужчин (25%) в возрасте 26–50 лет. Для оценки влияния криотерапии на показатели гуморального звена иммунитета проводили исследования: IgA, M, G, E.

Во время обследования выявлено снижение уровня IgE после курса криотерапии до $234,26 \pm 51,87$ г/л ($p < 0,002$), что достоверно ниже, чем исходные значения до курса криотерапии $294,16 \pm 74,0$ г/л ($p < 0,002$), уровень IgA в сыворотке крови обследуемых лиц до начала криотерапии составлял $1,17 \pm 0,02$ г/л, а после проведения курса криотерапии он в среднем повысился до $1,40 \pm 0,05$ г/л ($p < 0,001$). Содержание Ig M в крови после курса криотерапии незначительно изменилось ($0,89 \pm 0,06$ г/л) до курса криотерапии – $0,90 \pm 0,05$ г. Уровень Ig G до начала криотерапии составил $9,25 \pm 0,06$, после – $8,82 \pm 0,06$ г/л ($p < 0,001$).

Клиническая эффективность криотерапии выражается в повышении иммунологической реактивности организма. Благодаря иммуномодулирующему воздействию возрастает уровень иммунной защиты организма, что сопровождается снижением синтеза IgE и проявляется в перестройке иммунного ответа.

During evolution the human has acquired the capability to exist within a wide range of external temperature variations, by keeping a constant core temperature. Low temperature effect on human organism results in the occurrence of responses in all the physiological systems of an organism, including immune one. The mechanism of cryotherapy influence on immune status is based on the rearrangement of physical and chemical processes, providing an enhanced heat production and capability to endure significant cooling without any damaging effect on organism. The research was aimed to assess the effect of cryotherapy course on the humoral immunity indices. The work task was to investigate a change in Ig indices after cryotherapy course.

The research was performed on the base of the State Enterprize Scientific and Practical Medical Rehabilitation and Diagnostic Center of Ministry of Health Care of Ukraine using cryochamber Zimmer Medizin Systeme (Germany), producing low temperatures of about -110°C . The cryotherapy course was 20 sessions, their duration to the first day was 0.5 min, then increased by 0.5 minutes daily and reached 3.0 min to the 6th day of the course. The experiment involved 80 persons: 60 women (75%) and 20 men (25%) aged from 26 to 50 years. To assess the cryotherapy effect on humoral immunity indices we measured content of Ig A, M, G, and E.

During examination there was revealed a decrease in IgE level after cryotherapy course down to 234.26 ± 51.87 g/l ($p < 0.002$), that was statistically and significantly lower than the initial values before cryotherapy 294.16 ± 74.0 g/l ($p < 0.002$), the IgA level in blood serum of examined persons before cryotherapy beginning was 1.17 ± 0.02 g/l, but increased up to 1.40 ± 0.05 g/l ($p < 0.001$) in average after cryotherapy performance. The IgM content in blood after cryotherapy course slightly changed and made 0.89 ± 0.06 g/l, before cryotherapy this index was 0.90 ± 0.05 g/l. The levels of IgG prior to and after cryotherapy were 9.25 ± 0.06 and 8.82 ± 0.06 g/l ($p < 0.001$), correspondingly.

Clinical efficiency of cryotherapy is manifested in an increased immunological reactivity of an organism. Due to immune modulating effect the level of organism immune protection augments, which is accompanied by reduced IgE synthesis and manifests in immune response rearrangement.

Изучение внеклеточного матрикса свиных сердечных клапанов, прошедших этап децеллюляризации

М.В. ПЕТРОВА, И.Ю. МОКРИК, Д.Л. ЮДИЦКИЙ

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины», г. Донецк

Study of Extracellular Matrix of Pig Heart Valves Passed a Decellularization Stage

M.V. PETROVA, I.YU. MOKRIK, D.L. YUDITSKY

V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

Ежегодно в мире проводится около 275 000 операций по протезированию сердечных клапанов. При этом наряду с механическими протезами применяются биологические заменители сердечных клапанов и сосудов. Материалы, используемые при их изготовлении, не должны вызывать хроническое воспаление; не проявлять канцерогенный эффект; не подвергаться кальцификации; сохранять физико-химические свойства, обеспечивающие функционирование имплантатов (в том числе сохранять адгезивность для клеток реципиента).

Данное исследование было посвящено оценке целостности и физиологической интактности внеклеточного матрикса, полученного в ходе децеллюляризации сердечных клапанов.

В работе использовали сердечные свиные клапаны, прошедшие обработку апоптоз-вызывающим раствором (раствор ЭДТА («Sigma», США) в концентрации 10 мМ) в течение 2-х суток. По истечении данного времени экспозиции образцы тщательно отмывали в среде, содержащей соли в концентрации, близкой к физиологической, и подвергали дальнейшему гистологическому анализу. Серийные гистологические срезы толщиной 5 мкм изготавливали по стандартной методике и затем окрашивали по Вергофу для оценки состояния эластических волокон, а также производилась постановка ШИК-реакции с целью исследования состояния коллагеновых волокон.

Согласно результатам гистологического анализа в области аорты и фиброзного кольца наблюдается ШИК-положительная реакция, которая наиболее интенсивно выражена в области створки клапана. После окраски эластических волокон по Вергофу участок стенки аорты имел темно-бордовый цвет, в области створки клапана – малиновый.

Результаты гистологического анализа дают основание полагать, что физиологическая целостность внеклеточного матрикса в ходе децеллюляризации сердечных клапанов не нарушена. Матрикс сохраняет свои физико-химические свойства, поэтому пригоден для дальнейшего использования в качестве каркаса сердечно-сосудистого протеза.

Annually about 275,000 surgeries on prosthesis of heart valves are performed. Herewith the biological substitutes of heart valves and blood vessels are used along with mechanical prostheses. The materials used during their production shall not cause a chronic inflammation, not to show a carcinogenic effect, not to be exposed to calcification; but preserve physical and chemical properties providing implants functioning (including preserving the adhesion for recipient cells).

This investigation was directed to evaluation of integrity and physiological intactness of extracellular matrix obtained during decellularization of heart valves.

In the work we used pig heart valves treated with apoptosis-caused solution (solution EDTA (Sigma, USA) with 10 mM concentration) during 2 days. After the exposure the samples were thoroughly washed in a medium containing salts in concentration close to physiological one and underwent further histological analysis. Serial histological sections of 5 μm thickness were made by standard methods and then stained according to Verhoeff to evaluate the state of elastic fibers, as well as PAS-reaction was performed to study the state of collagen fibers.

According to the results of histological analysis in aorta and fibrous ring the observed PAS-positive reaction was most intensively expressed in the valve leaflet. After staining of elastic fibers the aortic wall had a maroon color in the valve leaflet it was crimson.

The results of histological analysis allow suggesting that the physiological integrity of the extracellular matrix during decellularization of heart valves is not affected. Matrix preserved its physical and chemical properties, therefore was applicable for the further use as a framework for cardiovascular prostheses.

Сравнительное изучение влияния режимов охлаждения на свободные и иммобилизованные в альгинатном геле клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В.А. ПОНОМАРЕВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Т.М. ГУРИНА, Е.С. ОНАСЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Study of Cooling Regimen Effect on Free and Alginate Gel-Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts

V.L. PONOMAREVA, I.P. VYSEKANTSEV, T.M. GURINA, E.S. ONASENKO

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

Применение иммобилизованных клеток дрожжей в биотехнологических производствах обеспечивает повышение рентабельности производства и улучшение качества готовой продукции. Повышенный интерес вызывает использование иммобилизованных клеток микроорганизмов в фармацевтической и пищевой промышленности. Для хранения микроорганизмов, иммобилизованных в гелях, применяют различные низкие температуры. Использование для этих целей криоконсервирования изучено мало. Цель исследования – сравнительное изучение влияния режимов охлаждения на свободные и иммобилизованные в альгинатном геле клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Экспериментальные образцы, состоящие из клеточных суспензий, клеток, иммобилизованных в альгинатных гранулах и в массе геля, замораживали со скоростями: 1; 5; 10 и 15 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Часть образцов непосредственно погружали в жидкий азот. Жизнеспособность клеток оценивали «чашечным» методом Коха. Средний размер гранул составлял 1200 мкм. Альгинатные гранулы, стабилизированные в растворе 0,1 М хлорида кальция, дезинтегрировали в 4%-м водном растворе ЭДТА.

Установлено, что после замораживания со скоростями 1, 5, 10, 15 град/мин сохранялись жизнеспособными 30,5; 30,1; 17,0; 9,7% соответственно клеток, суспендированных в дистиллированной воде. При замораживании клеток, иммобилизованных в массе геля, количество жизнеспособных клеток составляло 90,8; 74,5; 38,1; 16,1% соответственно. Жизнеспособность иммобилизованных в гранулах клеток дрожжей была достоверно выше и составляла 96,6; 93,3; 82,5; 56,1%. Замораживание погружением в жидкий азот во всех случаях приводило к значительной гибели клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о высоких криозащитных свойствах геля альгината натрия при замораживании клеток дрожжей с низкими скоростями охлаждения. Достоверно установлены более высокие показатели жизнеспособности иммобилизованных в гранулах клеток дрожжей по сравнению с жизнеспособностью дрожжей, замороженных в массе геля. Низкие показатели жизнеспособности иммобилизованных в гранулах клеток при высоких скоростях охлаждения, очевидно, связаны с повреждением гелевой матрицы.

Полученные результаты помогут разработать оптимальные протоколы криоконсервирования клеток микроорганизмов, иммобилизованных в гелевых носителях, расширить возможности их практического использования в различных биотехнологических процессах.

Application of immobilized yeast cells in biotechnological industry provides a rise in profitability of the production and quality improvement of ready product. The use of immobilized microorganism cells in pharmaceutical and food industries is of great interest. Low temperatures are applied to store the microorganisms immobilized in gels. The use of cryopreservation for these aims has been poorly studied. The research aim was to comparatively investigate the effect of cooling regimens on free and immobilized in alginate gels cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts.

Experimental samples: cell suspensions, cells immobilized in alginate granules and in gel mass, were frozen with the rates 1, 5, 10 and 15 deg/min down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen. The part of the samples was directly plunged into liquid nitrogen. Cell viability was assessed according Koch's plate method. Average size of granules was 1,200 μm . Alginate granules stabilized in 0.1 M calcium chloride solution were disintegrated in 4% EDTA aqueous solution.

It has been found that after freezing with the rates of 1, 5, 10 and 15 deg/min there were preserved correspondingly 30.5, 30.1, 17.0 and 9.7% of the cells, suspended in a distilled water. When freezing the cells immobilized in gel mass the number of viable cells made 90.8, 74.5, 38.1 and 16.1, correspondingly. Viability of immobilized in granules yeast cells was statistically and significantly higher and made 96.6, 93.3, 82.5 and 56.1%. Freezing by means of plunging into liquid nitrogen in all the cases resulted in a high death of cells.

The findings testify to high cryoprotective properties of sodium alginate gel when freezing the yeast cells with low cooling rates. Higher indices of viability of immobilized in granules yeast cells if compared with the viability of yeasts frozen in gel mass have been statistically and significantly found. Low indices of viability of immobilized in granules cells at high cooling rates are likely related to the damage of gel matrix.

The findings will help to design the optimal protocols for cryopreservation of microorganism cells immobilized in gel carriers, to extend the possibilities of their practical use in different biotechnological processes.

Пептиди серця свиней та поросят і їх взаємодія з альбуміном

Л.А. РОГОЗА, Т.С. ДЮБКО, С.Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б.П. САНДОМИРСЬКИЙ
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Heart Peptides of Pigs and Piglets and Their Interaction with Albumin

L.A. ROGOZA, T.S. DYUBKO, S.YE. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Відомо, що тканинноспецифічні пептиди можуть проявляти високу біологічну активність, зокрема стимулювати процеси фізіологічної та репаративної регенерації. Тому дослідження складу пептидних комплексів, одержаних з органів тварин, важливе для визначення механізму їх дії та стандартизації препаратів на їх основі. Очевидно, що набір пептидів може залежати від фізіологічного стану організму, зокрема від віку тварин.

Пептидні комплекси серця свиней (ПКСЦС) та новонароджених поросят (ПКСЦП) отримували з кріоконсервованих із швидкістю охолодження 1 град/хв в присутності 10% ПЕО-1500 фрагментів сердець шляхом їх інкубації у фізіологічному розчині 60 хв та видалення термолабільних білків. Молекулярно-масовий розподіл низькомолекулярних фракцій пептидної природи досліджували методом вискоєфективної гелпроникаючої хроматографії. Взаємодію екстрактів з альбуміном визначали спектрофлуориметричним методом на спектрофлуориметрі «Varian Cary Eclipse». Для визначення м.м. пептидів також використали прилад «MALDI MS Autoflex II».

З хроматограм ПКСЦС та ПКСЦП видно, що молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах залежить від віку тварин. Характерними особливостями молекулярно-масового розподілу пептидів в них є різна кількість піків: 3 – в ПКСЦС і 6 – в ПКСЦП. При цьому загальним для обох пептидних комплексів є тільки один пік, який відповідає середній м. м. 1784.

В результаті мас-спектрометричного дослідження методом MALDI виявлено ряд спільних для обох екстрактів пептидів з м. м. 3218 ± 5 ; 5734 ± 5 ; 8454 ± 5 і 8568 ± 5 . Інші виявлені пептиди специфічні для кожного з пептидних комплексів. Отже, склад досліджених пептидних комплексів пов'язаний із віковими особливостями розвитку серцевого м'яза і вони можуть проявляти різну біологічну активність.

Також були одержані спектри флуоресценції та синхронні спектри ПКСЦС і ПКСЦП. Встановлено, що пептиди, які входять до складу комплексів, зв'язуються з альбуміном сироватки крові. Дослідження, проведені з використанням альбумінспецифічного зонда K-35, показали, що квантовий вихід флуоресценції цього зонда в екстрактах у декілька разів нижче, ніж в розчині альбуміну або в сироватці крові і фактично такий же, як в буферному розчині.

Титрування пептидних комплексів зондом K-35 виявляє відмінності в їх зв'язуючих властивостях. Встановлений ефект проявляється також при титруванні комплексами сироватки крові або розчину альбуміну, до яких був задалегідь доданий флуоресцентний зонд.

It is known that tissue specific peptides can manifest a high biological activity, in particular stimulate the processes of physiological and reparative regeneration. Therefore the studies of composition of peptide complexes derived from the animal organs are important for revealing the mechanisms of their effect and standardizing of the preparations based on them. The peptide composition is evidently dependent on physiological state of an organism, in particular on animal's age.

Pig heart peptide complexes (PHPC) and those of newborn piglets (NPHPC) were obtained from cryopreserved with the cooling rate of 1 deg/min in presence of 10% PEO-1500 heart fragments. To do this the fragments were incubated in physiological solution for 60 min and then thermolabile proteins were removed. Molecular mass distribution of low molecular fractions of peptide origin was studied by the method of highly effective gel-penetrating chromatography. The interaction of extracts with albumin was found by spectrofluorimetric method with Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. To find the peptide molecular mass we also used MALDI MS Autoflex II device.

The chromatograms of PHPC and NPHPC show that molecular mass distribution of peptides in extracts depends on animal's age. The characteristic features of molecular mass distribution of peptides in them are the different numbers of peaks: 3 in PHPC and 6 in NPHPC. Herewith a common one for both peptide complexes is just only one peak, referred to average molecular mass 1784.

As a result of mass spectrometric study by means of MALDI there were revealed some common peptides in both extracts with molecular mass of 3.218 ± 5 ; 5.734 ± 5 ; 8.454 ± 5 and 8.568 ± 5 . Other revealed peptides were specific for each for peptide complexes. Thus, composition of the studied peptide complexes is specific to age peculiarities of the development of heart muscle and they may manifest different biological activity.

As well there were obtained the fluorescent and synchronous spectra for PHPC and NPHPC. It has been found that peptides being the part of the complexes bind with albumin of blood serum. Investigations performed with the albumin specific probe K-35 have shown that quantum yield of this probe fluorescence in the extracts was several times lower if compared with those in the solution of albumin or blood serum and actually was the same as in buffer solution.

Titration of peptide complexes with K-35 probe reveals the differences in their binding properties. The established fact is also manifested during titration with the complexes of blood serum or albumin solution to which the fluorescent probe was pre-added.

Эффективность использования криоконсервированных и лиофилизированных гепатоцитов при острой печеночной недостаточности

Н.П.СУББОТА, Е.Е.МАКАШОВА, П.П.ПАШИНСКИЙ

Харьковский национальный педагогический университет имени Г.С. Сковороды
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Efficiency of Application of Cryopreserved and Frozen-Dried Hepatocytes at Acute Hepatic Insufficiency

N.P. SUBBOTA, E.E. MAKASHOVA, P.P. PASHINSKIY

G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University, Kharkov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В последние годы клинической практикой лечения ряда патологических состояний организма, в частности острой печеночной недостаточности, подтверждена эффективность применения клеточно-тканевой терапии препаратами, выделенными из клеток и тканей ранних сроков развития. Такие препараты имеют выраженное антиоксидантное, биостимулирующее действие, низкую иммуногенность. Вместе с тем особенности и эффективность использования, а также механизм действия при патологических состояниях, связанных с острыми нарушениями функции печени, в настоящее время во многом остаются не выясненными.

В экспериментах, выполненных на 4-месячных крысах-самцах линии Вистар массой 200,0–250,0 г, моделировали острую печеночную и полиорганную недостаточность методом перевязки гепатодуоденальной связки на 60 мин сроком на 1–3 суток или перевязкой желчного протока и печеночной артерии на 5–9 суток. Показано, что морфофункциональные и лабораторные изменения зависят от длительности желтухи, скорости восстановления желчеоттока. Выживаемость животных с желтухой при острой 30-минутной и постепенно нарастающей 3-суточной ишемии печени составляла 100%, тогда как после снятия лигатуры при 60-минутной острой и 5-суточной постепенной ишемии – 71,4%, а при 7-суточной – 42,9%. Острая 3-суточная и пролонгированная 1-суточная желтуха сопровождалась 100%-й летальностью.

Введение крысам лиофилизированных (ЛГ) или криоконсервированных (КГ) гепатоцитов печени новорожденных поросят, особенно при их сочетанном использовании, показало выраженную способность к детоксикации, иммуностимулирующее, иммуномодулирующее, органозамещающее, антиоксидантное действие. Они также оказывали антицитолитический, мембраностабилизирующий эффекты, корректировали пигментосинтезирующую, липидообменную и белоксинтезирующую функции. Особенно выражена органозаместительная функция у КГ, о чем свидетельствовали увеличение показателей антиоксидантной защиты в 1,5 раза, снижение показателей перекисного окисления липидов в 2 раза, билирубина и трансаминаз в 1,5 раза.

При экспериментальной желтухе со снятием лигатуры введение крысам сочетанных препаратов КГ и ЛГ позволяет на 3 сутки сохранить функциональный резерв печени. При полиорганной недостаточности (9-е сутки желтухи) комбинация препаратов позволила выжить 83,4% экспериментальных животных.

Полученные положительные результаты дают возможность продолжить исследования в данном направлении.

Recently the clinical practice of treating some pathological states of an organism, in particular acute hepatic insufficiency, confirmed the efficiency of cell and tissue therapy application using the preparations from cells and tissues of early gestation terms. These preparations possess manifested antioxidant, bio-stimulating effect, and low immunogenicity. Along with this the peculiarities and efficiency of the application as well as acting mechanisms at pathological states, related to acute disorders of liver function nowadays have been mainly non-elucidated.

In the experiments performed in 4-month-old Wistar male rats of 200–250g there was modeled acute hepatic and polyorgan insufficiency by vertical ligation of hepatoduodenal ligament for 1–2–3 days or ligation of bile duct and hepatic artery for 5–9 days. It has been shown that morphofunctional and laboratory changes depend on jaundice duration, and recovery of bile outflux rate. The survival of animals with jaundice at acute 30 min-long liver ischemia and gradually aggravating 3 day-long one made 100%, while after ligation removal under 60 min-long acute and 5 day-long gradual ischemia it was 71.4% and under 7 day-long one this was 42.9%. Acute 3 day-long and prolonged 24 hr-long jaundice was accompanied with 100% lethality.

Administration to rats of frozen-dried (FDH) or cryopreserved hepatocytes (CH) of newborn piglet liver especially their combined application had shown a manifested ability to detoxication, immune stimulating, immune modulating, organ substituting, antioxidant effects. They also rendered anticytolytic, membrane stabilizing effects, corrected pigment synthesizing, lipid exchange and protein synthesizing functions. There was especially manifested organ substituting function by CH that was confirmed with the rise in the indices of antioxidant defence in 1.5 times, reduction of the indices of lipid peroxidation twice, bilirubin and transaminases in 1.5 times.

At experimental jaundice with ligation removal the administration to rats of the combined preparations of CH and LH enables to preserve a functional reserve of the liver to 3rd day. At polyorgan insufficiency (9 days of jaundice) the combination of preparations allowed the survival of 83.4% of experimental animals.

The obtained positive results allow the possibility of continuing the studies in this direction.

Влияние путресцина и гомокарнозина на активность аминотрансфераз больших полушарий мозга крыс при глубокой гипотермии

Д.У. ЧЕРКЕСОВА, А.Н. РАБАДАНОВА, И.С. МЕЙЛАНОВ
Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

Effect of Putrescine and Homocarnosine on Activity of Aminotransferases of Rat Cerebral Hemispheres under Deep Hypothermia

D.U. CHERKESOVA, A.N. RABADANOVA, I.S. MEYLANOV
Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Применение искусственной гипотермии в различных областях медицины с целью подавления обменных процессов при многих хирургических и терапевтических вмешательствах требует снижения риска развития гипотермической патологии на организменном и молекулярном уровнях. В этой связи поиск средств коррекции негативных последствий гипотермии является важной задачей современной медицины и экспериментальной биологии. Интерес в этом плане представляют естественные модуляторы обменных процессов – полиамин путресцин и нейропептид гомокарнозин. Эти нейроспецифические компоненты метаболически взаимосвязаны между собой и проявляют антистрессорное действие при многих патологических состояниях. Показано, что их содержание значительно изменяется при гипотермии и зимней спячке.

Важная роль в комплексной реакции организма при развитии патологии принадлежит аминотрансферазным реакциям, которые характеризуются значительной лабильностью. Аланин- и аспаратаминотрансферазы (АлТ, АсТ) участвуют в сопряжении энергетического и аминокислотного обмена в тканях. Синтез нейротрансмиттеров (глутамата, аспартата) обеспечивает АсТ мозга, АлТ принимает участие в процессах глюконеогенеза.

Целью наших исследований было изучение влияния путресцина и гомокарнозина на активность АлТ и АсТ в больших полушариях мозга крыс при глубокой гипотермии (20°C), пролонгированной в течение 1 ч.

Результаты показали, что внутривентрикулярное введение путресцина (1 мг/100 г массы тела) за 30 мин до декапитации животного при нормотермии снижает активность АсТ и АлТ на 7 и 13% соответственно. Введение гомокарнозина (1 мг/100 г массы тела) не влияет на активность АлТ и оказывает слабо модулирующее действие на АсТ, незначительно снижая (на 6%) активность фермента.

При глубокой гипотермии крыс изменения активности аминотрансфераз носят разнонаправленный характер: АсТ снижается (на 11%), а АлТ возрастает (на 19%). При гипотермии крыс на фоне путресцина снижение активности АсТ происходит в меньшей степени (на 5%), а активность АлТ при этом не отличается от интактных животных. Гомокарнозин оказывает сходное с путресцином влияние на активность АсТ при гипотермии: активность фермента снижается на 6%, а активность АлТ достоверно не отличалась от таковой у животных при гипотермии без предварительного введения гомокарнозина.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что путресцин в большей степени, чем гомокарнозин, оказывает влияние на активность аминотрансфераз при нормотермии и предотвращает существенные сдвиги активности ферментов при гипотермии.

Use of artificial hypothermia in various fields of medicine to suppress metabolic processes in many surgical and therapeutic interventions requires a reduction of hypothermic pathology risk at organism and molecular levels. Herewith searching the means to correct negative hypothermia effects is an important task of current medicine and experimental biology. Natural modulators of metabolism, polyamine putrescine and neuropeptide homocarnosine, are of interest. These neurospecific components are metabolically interrelated and manifest antistress effect in many pathological states. It is shown that their content is significantly changed during hypothermia and hibernation.

Important role in complex response of an organism during development of pathology belongs to aminotransferase reactions, characterized by considerable lability. Alanine and aspartate aminotransferases (AlT, AsT) have been involved in the coupling of energy and amino acid metabolism in tissues. Brain AsT provides a synthesis of neurotransmitters (glutamate, aspartate), AlT takes part in gluconeogenesis.

The research aim was to study the effect of putrescine and homocarnosine on AlT and AsT activity in the cerebral hemispheres of rat brain with deep hypothermia (20°C), prolonged for 1 hr.

The results showed that intraperitoneal administration of putrescine (1 mg/100 g body weight) for 30 min prior to animal decapitation during normothermia reduced activity of AsT and AlT by 7 and 13%, respectively. Administration of homocarnosine (1 mg/100 g body weight) did not affect the activity of AlT and was of low modulating effect on AsT, insignificantly decreasing (by 6%) enzyme activity.

Under deep hypothermia in rats the changes of transaminases activity are multidirectional: AsT is reduced (by 11%), and AlT is increased (by 19%). During hypothermia in rats with putrescine introduction the decrease of AsT activity occurs in lesser extent (by 5%), and AlT one does not differ from intact animals. Homocarnosine has a similar effect with putrescine on AsT activity during hypothermia: enzyme activity is reduced by 6%, and AlT activity does not significantly differ from its activity in animals during hypothermia without previous administration of homocarnosine.

Basing on the obtained results, we can conclude that putrescine in a greater extent than homocarnosine affects activity of aminotransferases at normothermy and prevents significant changes of enzyme activity during hypothermia.

Влияние замораживания на адгезивные свойства *Escherichia coli* M17

Л.Е. ШАТИЛОВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ О.В. КУДОКОЦЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Freezing on Adhesive Properties of *Escherichia coli* M17

L.E. SHATILOVA, I.P. VYSEKANTSEV, O.V. KUDOKOTSEVA

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

В комплексной терапии дисбиоза кишечника и при лечении хронических кишечных инфекций и бактерионосительства у реконвалесцентов применяют пробиотические препараты на основе различных микроорганизмов, в том числе бактерий *Escherichia coli*. В настоящее время пробиотические препараты, содержащие *E. coli*, производят как правило на основе штаммов *E. coli* M17, «Nissle 1917». Также проводят скрининг новых штаммов бактерий, отвечающих возросшим требованиям к бактериальным препаратам. Интенсивно развиваются технологии производства аутопробиотических штаммов. Среди комплекса биологических характеристик, по которым проводят отбор пробиотических штаммов микроорганизмов, одним из ключевых признаков является адгезивная активность, обеспечивающая формирование колонизационной резистентности макроорганизма.

Для хранения штаммов *E. coli*, выделенных из различных биотопов, часто используют криоконсервирование. Влияние криоконсервирования на поверхностные структуры бактериальных клеток, участвующие в сложных процессах адгезии, изучено мало.

В работе изучали жизнеспособность и адгезивную активность бактериальных клеток *E. coli* M17 после криоконсервирования в различных средах – ростовой среде М9, 5%-м растворе ДМСО, 1 и 2%-х растворах альгината натрия. Образцы замораживали погружением криопробирки «Nunc» в жидкий азот.

Максимальное количество жизнеспособных клеток наблюдали после замораживания в 5%-м растворе ДМСО (75%). В остальных образцах жизнеспособность была достоверно ниже, достигая минимума в среде М9.

Средний показатель адгезии (СПА) бактерий к энтероцитам белых лабораторных мышей после криоконсервирования во всех образцах был ниже по сравнению с контролем. Значения СПА после криоконсервирования в зависимости от криоконсервирующей среды снижались по ряду: среда М9, 1- и 2%-й растворы альгината натрия, 5%-й раствор ДМСО.

Полученные результаты свидетельствуют о различиях в криоповреждениях структур клеток *E. coli*, замороженных в различных криоконсервирующих средах. Если летальные повреждения клеток были минимальными при их замораживании в 5%-м растворе ДМСО, то криоповреждения пилей, изменения архитектоники белков и липополисахаридов наружной мембраны были максимальными при сохранении жизнеспособности клеток. Следует обратить внимание на криозащитные свойства альгината натрия, обеспечивающие относительно высокие показатели жизнеспособности и адгезивной активности бактерий после замораживания-отогрева.

Probiotic preparations based on different microorganisms including bacteria *Escherichia coli* are used in combined therapy of bowel dysbiosis and treatment of chronic bowel infections and bacteria carriers in survivors. Nowadays probiotic preparations containing *E. coli* are produced commonly on the base of strains *E. coli* M17 Nissle 1917. Screening of new bacteria strains matching the increased requirements to bacteria preparations is performed. The production technologies of autoprobiotic strains are intensively developed. Within the complex of biological characteristics, according to which the selection of microorganisms probiotic strains is performed, one of the essential features is an adhesive activity providing the formation of colonization resistance of macroorganism.

Cryopreservation is often used for storage of *E. coli* strains isolated from different probiotics. Cryopreservation effect on surface structures of bacterial cells participating in complicated adhesion processes has been studied insufficiently.

In the work we studied the viability and adhesive activity of bacterial cells *E. coli* M17 after cryopreservation in different media, growth medium M9, 5% DMSO solution, 1 and 2% sodium alginate solutions. The samples were frozen by plunging the Nunc cryovial into liquid nitrogen.

Maximal number of viable cells was observed after freezing in 5% DMSO solution (75%). In other samples the viability was significantly lower achieving the minimum in medium M9.

Average adhesion index (AAI) of bacteria to the enterocytes of laboratory white rats after cryopreservation in all the samples was lower if compared to the control. Indices of AAI after cryopreservation depending on cryopreservation medium decreased in the range: medium M9, 1 and 2% sodium alginate solutions, 5% DMSO solution.

The obtained results testify to the differences of cryodamages in the structures of *E. coli* cells frozen-thawed in various cryopreservation media. Lethal damages of cells were minimal after freeze-thawing in 5% DMSO solution, however, the cryodamages of pili, changes of protein and external membrane lipopolysaccharides' architectonics were maximal even then the cell viability was preserved. The attention should be paid to cryoprotective properties of sodium alginate providing the relatively high indices of viability and adhesive activity of bacteria after freeze-thawing.

Сравнительный анализ устойчивости клеточных культур к различным условиям заморозки

М.Н. ШЕТВИН, Е.Л. ФИРСОВА, Т.Н. ПРИТЧИНА, И.А. СУЕТИНА, Р.Я. ПОДЧЕРНЯЕВА
ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, г. Москва

Comparative Analysis of Cell Culture Resistance to Different Freezing Conditions

M.N. SCHETVIN, E.L. FIRSOVA, T.N. PRITCHINA, I.A. SUYETINA, R.YA. PODCHERNYAIEVA
D.I. Ivanovsky R&D Institute of Virology of the Ministry of Health
and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

Существенным аспектом криоконсервирования клеточных культур является сохранение жизнеспособности клеток после размораживания. Это достигается за счет минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда и предотвращения образования очагов концентрированных солей. Однако применение криопротекторов типа глицерина в высоких концентрациях, токсичных для клеток, во многом мешает сохранению их жизнеспособности. Кроме того, хранение замороженных клеток в жидком азоте при -196°C требует специальных методов транспортировки и деконсервации.

Целью данной работы являлось изучение жизнеспособности двух перевиваемых клеточных линий: клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero) и клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) при различных условиях заморозки.

Клетки Vero и ЛЭЧ после стандартного выращивания в культуральных флаконах и снятия раствором версен-трипсина помещали в стандартную среду для криоконсервирования с использованием 10% глицерина и без него. Для замораживания клеток был использован холодильный шкаф (-20°C) и программный замораживатель «Minicool 40 PC». О жизнеспособности клеток (%) судили с помощью их подсчета в камере Горяева и по окраске трипановым синим. Подсчет клеток проводили ежедневно в течение первых 6 часов.

Нами было показано, что после применения 10% глицерина в качестве криопротектора жизнеспособность клеток при -20°C сохранялась на уровне 90–98% на протяжении всего времени наблюдения. Без глицерина через 3 ч жизнеспособность клеток Vero снижалась от 76 до 30%, а клеток ЛЭЧ – от 90 до 20%. Спустя 3 ч нахождения клеток при -20°C наблюдалась гибель обеих клеточных линий.

При хранении в жидком азоте (-196°C) через 6 ч жизнеспособность клеток сохраняется при криоконсервации с 10% глицерином как у Vero (93%), так и у клеток ЛЭЧ (95%). Без добавления глицерина уже после 3 ч жизнеспособность клеток Vero снижается до 70%, а через 6 ч она составляет 60%. Тогда как у клеток ЛЭЧ без глицерина уже через 3 ч жизнеспособность резко снижается и составляет только 10%.

Следовательно, изученные перевиваемые клеточные линии различного происхождения (Vero и ЛЭЧ) отличаются по своей чувствительности к условиям замораживания, и для консервации в жидком азоте клеток ЛЭЧ необходимо применять 10% глицерин. Для деконсервации обеих клеточных линий возможно хранение их при температуре -20°C не более 2 ч до последующего пассирования.

Important aspect in cell culture cryopreservation is to preserve post-thaw cell viability. This is achieved by minimizing the formation of intracellular ice crystals and preventing that of foci of the concentrated salts. However, the application of cryoprotectants such as glycerol in high concentrations, being toxic for cells, does not provide the complete preservation of viability. In addition, the storage of frozen cells in liquid nitrogen at -196°C requires a special technique for transportation and thawing.

This research was targeted to study the viability of two inoculated cell lines: the cells of African green monkey kidney (Vero) and human embryonic lung cells (HEL) after application of various freezing conditions.

The Vero and HEL cells after the standard culturing in cultural flasks and detaching by versene-trypsin solution were placed into the standard medium for cryopreservation with 10% glycerol and the medium without glycerol. For cell freezing we used refrigerator with -20°C and a programmable freezer Minicool 40 PC. The cells viability (%) was assessed by counting in Goryaev's chamber of cells non-stained with trypan blue. Cells were counted every hour within the first 6 hrs of storage.

We demonstrated that when using 10% glycerol as a cryoprotectant, the cell viability at -20°C remained at 90–98% level within the whole observation time. Without glycerol in 3 hrs of storage the Vero and HEL cell viability reduced from 76 to 30 and from 90 to 20%, correspondingly. After cell storage at -20°C we observed a death of both cell lines in 3 hours.

After storage in liquid nitrogen (-196°C) during 6 hrs the cell viability was preserved if the cells were cryopreserved in media with 10% glycerol both in case of Vero (93%) and HEL (95%) cells. Without glycerol already in 3 hrs the Vero cell viability decreased down to 70%, and after 6 hours it made 60%. HEL cell viability sharply decreased and made only 10% in 3 hrs if cells were stored without glycerol.

Consequently, the studied inoculated cell lines (Vero and HEL) differ by their sensitivity to freezing conditions. HEL cell preservation into liquid nitrogen is provided in the case of application of 10% glycerol. During thawing of both cell lines it is possible to store them at -20°C for up to 2 hours prior to following passage.

Эффективность применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при дегенеративно-дистрофическом повреждении межпозвоночных дисков у крыс

М.С. ЮХТА, Н.А. ВОЛКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Efficiency of Application of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells During Degenerative and Dystrophic Lesion of Intervertebral Discs of Rats

M.S. YUKHTA, N.A. VOLKOVA

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

Современное развитие клеточной биологии сделало клетку не только главным объектом воздействий, но и средством лечения ряда заболеваний. Методы клеточной терапии довольно активно внедряются и с целью регенерации хрящевой ткани. Наши исследования направлены на изучение эффективности введения суспензии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при дегенеративно-дистрофическом повреждении хрящевой ткани межпозвоночных дисков (МПД).

Для моделирования дегенеративных изменений была использована компрессионная модель повреждения СсVI–VII на крысах (300–350 г) путем фиксации хвоста в изогнутом положении. Животным I ($n = 21$) и II ($n = 21$) групп в зону дефекта соответственно вводили по $0,5 \times 10^6$ неконсервированных и криоконсервированных аллогенных МСК на коллагеновой губке, которую укладывали непосредственно на поврежденный диск. Животные с введением физраствора ($n = 21$) и самовосстановлением ($n = 21$) служили контролем. Контрольными сроками были 30, 60 и 90-е сутки после терапии. Эффективность введения МСК оценивали с помощью компьютерной томографии и гистологических методов исследования.

Анализ гистологических препаратов показал, что после введения МСК происходило постепенное восстановление структуры и высоты МПД. В I группе на 30-е сутки увеличивалась клеточность фиброзного кольца (ФК), при этом фибробластоподобные клетки располагались как на протяжении, так и внутри пучков коллагеновых волокон, а на 60-е сутки наблюдалось восстановление клеточности и структуры ФК. Во II группе наблюдалось «запаздывание» эффекта, а максимальный терапевтический эффект достигался на 90-е сутки после введения криоконсервированных МСК. При этом у контрольных животных признаки дегенеративно-дистрофических изменений МПД сохранялись на всех сроках наблюдения. Высота МПД животных I и II групп на 30-е сутки составила $0,7 \pm 0,034$ и $0,63 \pm 0,046$ мм, на 60-е – $1,0 \pm 0,051$ и $0,87 \pm 0,064$ мм, на 90-е – $1,1 \pm 0,06$ и $1,1 \pm 0,051$ мм соответственно. В то время как в контроле высота МПД была достоверно ниже и равнялась $0,57 \pm 0,029$, $0,6 \pm 0,032$ и $0,58 \pm 0,046$ мм соответственно. Параллельно нормализовались денситометрические КТ-показатели хрящевой ткани МПД.

Таким образом, полученные данные указывают на достоверно положительный эффект применения суспензии МСК на процессы регенерации хрящевой ткани МПД.

Авторы выражают благодарность и хранят память об инициаторе и вдохновителе данной работы акад. НАНУ Грищенко В.И.

Modern development of cell biology has made a cell not only the main object of influence, but also a tool of treatment for a number of diseases. Methods of cell therapy are quite actively implemented to regenerate the cartilaginous tissue as well. Our investigations are aimed to study the efficiency of the introduction of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) suspension during degenerative and dystrophic damage of cartilaginous tissue of intervertebral discs (IVDs).

The model of CcVI-VII compressive damage was used for simulation of degenerative changes in rats (300–350 g) by tail fixing in a bent position. Animals of I ($n = 21$) and II ($n = 21$) groups were injected into a defect zone with 0.55×10^6 of non-frozen-thawed and frozen-thawed allogeneic MSCs in the collagenous sponge which was laid directly on the damaged disc. Animals with the introduction of physiological solution ($n = 21$) and self-regeneration ($n = 21$) served as the controls. The test terms were 30, 60 and 90th days after therapy. The efficiency of MSCs introduction was estimated by means of a computer tomography and histologic methods of investigation.

The analysis of histological preparations showed that after the MSCs introduction there was a gradual regeneration of IVD structure and height. In the group I to the 30th day the cellularity of fibrous ring (FR) increased, herewith fibroblast-like cells were both along and inside the bundles of collagenous fibers, and to the 60th day the restoration of cellularity and FR structure was observed. In the group II a delay of effect was observed, and the maximum therapeutic effect was achieved to the 90th day after the introduction of cryopreserved MSCs. In the control animals the signs of degenerative and dystrophic changes of IVD remained during all observation terms. The height of IVDs of the animals groups I and II to the 30th day was 0.7 ± 0.034 and 0.63 ± 0.046 mm, to the 60th day it was 1.0 ± 0.051 and 0.87 ± 0.064 mm, to the 90th day it made 1.1 ± 0.06 and 1.1 ± 0.051 mm, respectively. In control animals the height of MPD was significantly lower and made 0.57 ± 0.029 , 0.6 ± 0.032 and 0.58 ± 0.046 mm, respectively. Densitometric CT-indices of cartilaginous tissue of IVDs in parallel normalized.

Thus, the obtained results indicate statistically significant positive effect of the application of MSCs suspension on the regeneration processes of cartilaginous tissue of IVDs.

The authors express gratitude and commemorate the initiator and the inspirer of this research Academician of National Academy of Sciences of Ukraine Grishchenko V. I.

Разработка нового устройства инициации кристаллизации для криомикроскопических исследований

Р. ШПИНДЛЕР, Б. ГЛАСМАХЕР

Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Development of a New Seeding Device for Cryomicroscopic Investigations

R. SPINDLER, B. GLASMACHER

Institute for Multiphase Processes, Leibniz Universitaet Hannover, Germany

При криоконсервировании клетки длительное время хранятся при криогенных температурах для поддержания их качества после оттаивания. В процессе замораживания ряд параметров влияет на поведение клеток: скорость охлаждения, скорость оттаивания, тип и концентрация криопротекторов (КП), геометрия образца и температура нуклеации. Во время замораживания-оттаивания, особенно при оптимальных параметрах, эти условия могут обеспечить высокую выживаемость клеток [2].

Была использована коммерчески доступная криомикроскопическая установка для визуализации клеток в суспензии, которая включает модуль «FDCS196 Cryostage Linkam». Образец хранили при температуре от 40 до -196°C . Главная проблема этой установки состоит в том, что ручная инициация кристаллизации требует снятия крышки для обеспечения контакта охлажденного медного стержня и переохлажденного образца. После этого пары азота будут затруднять обзор под микроскопом и наблюдение за начальным ростом кристаллов льда и перемещением образцов. В данном исследовании мы разработали новое устройство инициации кристаллизации для криомикроскопических исследований водных растворов. В данном устройстве используется медный стержень, который охлаждается с помощью теплообменника омываемого жидким азотом. USB-камера используется для определения положения медного наконечника при начальной калибровке, используя которую система сможет затем рассчитать расстояние до образца. Температура измеряется с помощью дополнительного термистора (Т-типа) в непосредственной близости от образца. Далее электрический сигнал обрабатывается с помощью оперативной схемы усилителя и карты сбора данных. Система привода с линейным шагом позволяет перемещать медный стержень автоматически к переохлажденному образцу через отверстие в крышке. Программное обеспечение контролирует положение и временные параметры движения медного стержня в процессе охлаждения образца и, следовательно, способно инициировать кристаллизацию в образце при необходимой температуре нуклеации.

Устройство позволяет контролировать температуру нуклеации вплоть до скорости охлаждения $10\text{ K}/\text{min}$ с точностью $0,2^{\circ}\text{C}$. Для визуализации роста кристаллов льда и осмотического поведения клеток при криоконсервировании используется цифровой фотоаппарат (Retiga Exi Fast 1394, QImaging). Система была протестирована с помощью различных растворов на основе диметилсульфоксида и проверена при различных скоростях охлаждения.

Для улучшения качества криоконсервирования клеток и тканей в последующих криомикроскопических исследованиях будет использоваться это новое устройство для инициации кристаллизации.

Это исследование финансируется Немецким научно-исследовательским обществом в рамках кластера передового опыта REBIRTH.

In the field of cryopreservation cells are stored at cryogenic temperatures for long term storage in order to maintain their quality after thawing. Several process parameters affect the behavior of cells during the freezing process. These involve the cooling rate, thawing rate, type and concentration of cryoprotective agents (CPA), sample geometry and the nucleation temperature. Especially under optimal parameter settings the conditions during the freeze-thaw process will lead to high cell survival rates [2].

A commercially available cryomicroscopic setup was used here to visualize cells in suspension which involved a LINKAM cryostage FDCS196. The temperature of the sample was controllable from 40 to -196°C . A general problem of this setup is that a manual seeding process requires the removal of the lid of the cryostage when a cooled copper rod touches the supercooled sample. Then, the nitrogen atmosphere will disturb the field of view under the microscope, initial ice crystal growth are hard to observe and the samples are moved. In this study we developed a new seeding device for cryomicroscopic investigation of aqueous samples. This device uses a copper rod which is cooled via a liquid nitrogen flushed heat exchanger. An USB camera is used to identify the position of the copper rod tip during an initial calibration procedure and thus the system can automatically calculate the distance to the sample. In the vicinity of the sample the temperature is measured by an additional thermistor (T-type). The electrical signal is further processed by an operational amplifier circuit and a data acquisition card. A linear step motor system allows to move the copper rod automatically to the super-cooled sample through an opening in the lid of the cryostage. The software controls the position and timing of the copper rod during the cooling process of the sample and therefore is able to seed the sample at a desired nucleation temperature.

The device allows to control the nucleation temperature up to cooling rates of $10\text{ K}/\text{min}$ with an accuracy of $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. A digital camera (Retiga Exi Fast 1394, QImaging) is used to visualize ice crystal growth and osmotic behavior of cells during the cryopreservation process. The system was tested using various test solutions based on dimethyl sulfoxide and was verified for different cooling rates.

In future studies the new seeding device will be used in cryomicroscopic investigations to improve cryopreservation protocols of cells and tissues.

Source of funding: German Research Foundation for the Cluster of Excellence REBIRTH.

Постгипертонический стресс при замораживании эритроцитов в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами

В.В. РАМАЗАНОВ, Е.Л. ВОЛОВЕЛЬСКАЯ, В.А. КОПТЕЛОВ, В.А. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Posthypertonic Stress During Freezing of Erythrocytes in Media with non-Penetrating and Penetrating Cryoprotectants

V.V. RAMAZANOV, E.L. VOLOVELSKAYA, V.A. KOPTELOV, V.A. BONDARENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В методах криоконсервирования эритроцитов используются проникающие криопротекторы (глицерин, 1,2-пропандиол) в концентрации 20–40% или полимерные непроникающие криопротекторы (ПЭГ-1500, декстран) в концентрациях 20–30%. Применение проникающих криопротекторов в высокой концентрации требует отмывания эритроцитов гипертоническими растворами NaCl для предупреждения развития постгипертонического гемолиза. Замораживание клеток с полимерами приводит к повреждению мембран в основном из-за гипертонического стресса, который также является причиной развития постгипертонического гемолиза при отогреве и отмывании криоконсерванта. Целью исследования была разработка состава сред, которые будут обеспечивать сохранение осмотических свойств эритроцитов при замораживании-отогреве и упрощать их отмывание от криоконсерванта после размораживания.

Установлено, что в условиях быстрого замораживания-отогрева в жидком азоте (–196°C) в среде, содержащей полиэтиленгликоль (10%) или декстран (15%), а также в изоосмотической сахарозо-солевой среде выявляется большая степень повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом (40%) по сравнению с низким гематокритом (0,8%). Данный эффект называется эффектом «упаковки», который в условиях быстрого замораживания-отогрева определяется приростом постгипертонического стресса при отогреве.

Включение в среду с полимерами диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 15% или в изоосмотическую сахарозо-солевую среду проникающих криопротекторов (глицерин, 1,2-пропандиол, ДМСО или глюкоза) в концентрации 5% устраняет эффект «упаковки» и соответственно ослабляет постгипертонический стресс. Эритроциты, отмываемые после замораживания изотоническим раствором NaCl, сохраняют нормальные осмотические и морфологические показатели.

Полученные результаты позволяют предположить, что указанный эффект при замораживании эритроцитов с непроникающими криопротекторами определяется вкладом их концентрирования в общий гипертонический градиент на клеточных мембранах при охлаждении. Это является одним из условий повышения чувствительности клеток к постгипертоническому стрессу при отогреве. Устранение данного эффекта в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами происходит из-за ослабления дегидратации и действия гипертонического стресса на клетки при охлаждении вследствие поступления в них проникающих криопротекторов, что является условием сохранения устойчивости эритроцитов к постгипертоническому стрессу при отогреве и отмывании криоконсерванта.

Penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propanediol) in a concentration of 20–40% or polymer non-penetrating cryoprotectants (PEG-1500, dextran) in a concentration of 20–30% are used in the protocols of erythrocyte cryopreservation. The use of penetrating cryoprotectants in a high concentration requires the washing of erythrocytes with hypertonic NaCl solutions to prevent the development of posthypertonic hemolysis. Freezing of cells with polymers leads to the damage of membranes mainly due to hypertonic stress, which is also a cause of posthypertonic hemolysis development during thawing and washing-out the cryopreservative. The research aim was to develop a composition of the media which will ensure the preservation of the erythrocytes osmotic properties during freeze-thawing and simplify their washing from cryopreservative after thawing.

We have found that a high degree of erythrocyte damage during freeze-thawing with a high hematocrit (40%) compared with low hematocrit (0.8%) is revealed after rapid freeze-thawing in liquid nitrogen (–196°C) in the medium containing polyethylene glycol (10%) or dextran (15%) as well as in isoosmotic sucrose-saline medium. This is called ‘packing’ effect, which during rapid freeze-thawing cause the growth of posthypertonic stress during thawing.

Inclusion of dimethyl sulfoxide (DMSO) in 15% concentration into the medium with the polymers or penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propanediol, DMSO or glucose) in 5% concentration into isoosmotic sucrose-saline medium eliminates the effect of ‘packing’ and therefore reduces posthypertonic stress. Erythrocytes washed after freezing with isotonic NaCl solution preserve normal osmotic and morphological indices.

The obtained results allow suggesting that mentioned effect during freezing of erythrocytes with non-penetrative cryoprotectants is determined by the contribution of their concentrating into a total hypertonic gradient on the cell membranes during cooling. This is one of the conditions to increase the sensitivity of cells to posthypertonic stress during thawing. Eliminating this effect in the combined media with non-penetrating and penetrating cryoprotectants occurs due to the weakening of dehydration and effect of hypertonic stress on the cells during cooling due to entering the penetrating cryoprotectants into them, which is a condition for maintaining the resistance of erythrocytes to posthypertonic stress during thawing and washing the cryopreservative.