

Тезисы 40-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 23–24 мая 2016 г., г. Харьков

<i>Муценко В.В., Гришков А.П., Роговская Е.Ю., Петренко Ю.А.</i> Предобработка сахарозой повышает криоустойчивость мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных на двух- и трехмерных носителях.....	158
<i>Мартынова Ю.В., Бабийчук В.Г.</i> Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (–120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс.....	159
<i>Пуговкин А.Ю., Кононенко И.С., Кононенко Р.В., Буцкий К.И., Черепнин В.А., Копейка Е.Ф.</i> Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды.....	160
<i>Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н., Останков М.В.</i> Влияние криоконсервирования на экспрессию stemness-генов в клетках фетальной печени мышей.....	161
<i>Буркова В.В.</i> Хранение штаммов вируса бешенства <i>L. Pasteur</i> и CVS при низких температурах под защитой криопротекторов.....	162
<i>Огурцова В.В.</i> Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів миші для води та криопротекторів.....	163
<i>Тарусин Д.Н., Муценко В.В., Зайков В.С.</i> Причины толерантности инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток к краткосрочному хранению.....	164
<i>Таранник А.К., Останкова Л.В., Гриша И.Г., Сокол Л.В., Луценко Е.Д., Бондарович Н.А., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Лиофилизированный лейкоконцентрат кордовой крови человека как корректор состояния иммунного статуса при лечении атопического дерматита (экспериментальное исследование).....	165
<i>Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Волина В.В., Сандомирский Б.П.</i> Структура сердца после терапевтической гипотермии и введения МСК при экспериментальном инфаркте миокарда.....	166
<i>Юрчук Т.А., Петрушко М.П., Пиняев В.И.</i> Эффективность криоконсервирования экспандированных бластоцист человека методом витрификации с использованием коллапсирования.....	167
<i>Бабинец О.М., Буряк И.А.</i> Лечение экспериментальной кишечной инфекции иммобилизованными в геле антибактериальными препаратами, хранившимися при низких температурах.....	168
<i>Юхта М.С., Волкова Н.А., Степанюк Л.В., Чернышенко Л.Г., Гольцев А.Н.</i> Криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки в терапии экспериментального оофорита.....	169
<i>Власов А.А., Ковалев Г.А., Белочкина И.В., Тыныныка Л.Н., Сандомирский Б.П.</i> Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи.....	170
<i>Чернявская Е.А., Бабийчук В.Г.</i> Влияние криоконсервированной кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс с алиментарным ожирением.....	171
<i>Панов С.И., Белочкина И.В., Сандомирский Б.П.</i> Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови и фуллерена C ₆₀ на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крыс с некрозом миокарда.....	172
<i>Кисель А.В., Киروشка В.В., Бондаренко Т.П., Петрова В.А., Баклагина Ю.Г., Черняков Д.Д., Скорик Ю.А.</i> Характер распада и структура цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при культивировании на хитозановых матрицах.....	173
<i>Нарожный С.В., Розанова С.Л.</i> Влияние низких температур на протекторное действие экстрактов плаценты человека по отношению к эритроцитам в условиях окислительного стресса.....	174
<i>Васькович А.М., Кондаков И.И., Репин Н.В.</i> Влияние криоэкстракта плаценты на морфофункциональное состояние почек при экспериментальном нефрите Хеймана.....	175
<i>Чуб О.В., Шевченко М.В., Прокопюк В.Ю.</i> Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения на клетки головного мозга новорожденных крыс в модели глутамат-индуцированной токсичности.....	176
<i>Трутаева И.А., Киروشка В.В., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П.</i> Морфологические и биохимические характеристики овариальной ткани при разных режимах криоконсервирования.....	177
<i>Новикова О.Ю., Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Лаврик А.А., Божок Г.А., Бондаренко Т.П.</i> Сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных.....	178



<i>Али С.Г., Лаврик А.А., Божок Г.А.</i> Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов.....	179
<i>Третьяк Д.В., Гулевский А.К.</i> Исследование количественного и качественного состава низкомолекулярных веществ белково-пептидной природы из личинок <i>Tenebrio molitor</i> до и после холодной акклимации.....	180
<i>Севастьянов С.С., Осецкий А.И., Гурина Т.М.</i> Термомеханический анализ кластерной кристаллизации водных растворов полиэтиленгликоля с м. м. 1500.....	181
<i>Семионова Е.А., Ершова Н.А.</i> Постгипертонический лизис эритроцитов человека в присутствии хлорпромазина.....	182
<i>Макашова Е.Е., Зубова О.Л., Зубов П.М.</i> Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при криоконсервировании ядродержащих клеток кордовой крови.....	183
<i>Улізко П.Ю., Боброва О.М.</i> Вплив криопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика.....	184
<i>Кулик В.В., Бабийчук В.Г.</i> Ультраструктурные перестройки гипоталамуса старых крыс после ритмических экстремальных холодových воздействий.....	185
<i>Первушина О.А.</i> Применение криоконсервированной эритроцитарной массы при коррекции анемического синдрома у собак, вызванного <i>Babesia canis</i>	186
<i>Роечко А.А., Пасиешвили Н.М.</i> Назначение иммуномодуляторов при материнско-плодовой инфекции снижает инфицированность плаценты и ее оболочек.....	187
<i>Плакшина Е.М., Сидоренко О.С., Легач Е.И., Божок Г.А.</i> Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии.....	188
<i>Гребенюк А.И., Чиж Н.А., Бызов Д.В., Рогоза Л.А., Антоненко Е.А., Лукьяненко П.Г., Сандомирский Б.П.</i> Разработка установки для эндоскопических операций на экспериментальных животных.....	189
<i>Мотко А.В., Долгопятенко А.Д., Чиж Н.А., Аврунин О.Г., Сандомирский Б.П.</i> Разработка инфулятора для проведения эндоскопических операций на экспериментальных животных.....	190
<i>Богуславский К.И., Алабедалькарим Н.М., Пахомов А.В., Божок Г.А.</i> Влияние инкубации с криопротекторами на присутствие эпитопа Gal-alpha-1,3-Gal в клетках линии РК-15.....	191

cold in biology and medicine

current issues of cryobiology,
transplantology and biotechnology



Abstracts of the 40th Annual Conference of Young Scientists 'Cold in Biology and Medicine. Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology' May 23–24, 2016, Kharkov, Ukraine

<i>Mutsenko V.V., Gryshkov A.P., Rogulskaya E.Yu., Petrenko Yu.A.</i> Pretreatment with Sucrose Increases Cryoresistance of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved on Two- and Three-Dimensional Carriers.....	158
<i>Martynova Yu.V., Babiichuk V.G.</i> Influence of Repeated Cycles of Rhythmic Extreme Whole-Body Cooling (–120°C) on Myocardium Structure in Dynamics of Rats' Aging.....	159
<i>Puhovkin A.Yu., Kononenko I.S., Kononenko R.V., Butskiy K.I., Cherepnin V.A., Kopeika E.F.</i> Cryopreservation of Sterlet Sperm: Optimization of Cryoprotective Medium Composition.....	160
<i>Borysov P.A., Dimitrov A.Yu., Goltsev A.N., Ostankov M.V.</i> Effect of Cryopreservation on Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells.....	161
<i>Burkova V.V.</i> Storage of Rabies Virus Strains <i>L. Pasteur</i> and CVS at Low Temperatures Using Cryoprotectants.....	162
<i>Ogurtsova V.V.</i> Permeability Coefficients of Murine Enterocyte Membranes for Water and Cryoprotectants.....	163
<i>Tarusin D.N., Mutzenko V.V., Zaikov V.S.</i> Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage.....	164
<i>Tarannik A.K., Ostankova L.V., Grisha I.G., Sokol L.V., Lutsenko E.D., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Frozen-Dried Human Cord Blood Leukoconcentrate as Correcting Agent of Immune Status when Treating Atopic Dermatitis (Experimental Study).....	165



<i>Trofimova A.V., Chizh N.A., Belochkina I.V., Volina V.V., Sandomirsky B.P.</i> Therapeutic Hypothermia and Injection of MSCs Improve Heart Structure under Experimental Myocardial Infarction.....	166
<i>Yurchuk T.A., Petrushko M.P., Pinyaev V.I.</i> Efficiency of Human Expanded Blastocyst Cryopreservation using Vitrification and Collapsing.....	167
<i>Babinets O.M., Buryak I.A.</i> Therapy of Experimental Intestinal Infection with Gel-Immobilized Antibacterial Drugs, Stored at Low Temperatures.....	168
<i>Yukhta M.S., Volkova N.A., Stepanjuk L.V., Chernyshenko L.G., Goltsev A.N.</i> Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells In Experimental Oophoritis Therapy.....	169
<i>Vlasov A.A., Kovalev G.A., Belochkina I.V., Tynnyka L.N., Sandomirsky B.P.</i> Effect of Extracts of Cryopreserved Piglet Skin Fragments on State of Pro- and Antioxidant Systems Following Skin Cryodestruction.....	170
<i>Chernyavskaya E.A., Babijchuk V.G.</i> Influence of Cryopreserved Cord Blood on Heart Rate Autonomic Regulation in Rats with Alimentary Obesity.....	171
<i>Panov S.I., Belochkina I.V., Sandomirsky B.P.</i> Influence of Cryopreserved Cord Blood Serum and Fullerene C ₆₀ on Indices of Prooxidant-Antioxidant System in Rats with Myocardial Necrosis.....	172
<i>Kisil A.V., Kiroshka V.V., Bondarenko T.P., Petrova V.A., Baklagina Yu.G., Chernyakov D.D., Skorik Yu.A.</i> Character of Spreading and Cytoskeleton Structure of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cultured on Chitosan Scaffolds.....	173
<i>Narozhnyi S.V., Rozanova S.L.</i> Low Temperature Influence on Human Placenta Extract Protective Action Towards Erythrocytes Against Oxidative Stress.....	174
<i>Vaskovich A.M., Kondakov I.I., Repin N.V.</i> Effect of Placental Cryoextract on Morphofunctional State of Kidneys in Heymann Nephritis.....	175
<i>Chub O.V., Shevchenko M.V., Prokopyuk V.Yu.</i> Neuroprotective Effect of Placental Factors in Model of Glutamate Induced Toxicity in Newborn Rat Brain Cells.....	176
<i>Trutaieva I.A., Kiroshka V.V., Gurina T.M., Bondarenko T.P.</i> Morphological and Biochemical Features of Ovarian Tissue at Various Cryopreservation Modes.....	177
<i>Novikova O.Yu., Plaksina E.M., Sidorenko O.S., Lavrik A.A., Bozhok G.A., Bondarenko T.P.</i> Comparative Morphological Characteristics of Primary Cultures of Neonatal Animal Adrenal Cells.....	178
<i>Ali S.G., Lavrik A.A., Bozhok G.A.</i> Morphological Characteristics of Primary Cultures of Neonatal Rabbit Dorsal Root Ganglia Cells.....	179
<i>Tretyak D.V., Gulevsky A.K.</i> Study of Quantitative and Qualitative Composition of Low-Molecular Protein-Peptide Compounds of <i>Tenebrio molitor</i> Larvae before and after Cold Acclimation.....	180
<i>Sevastianov S.S., Osetsky A.I., Gurina T.M.</i> Thermomechanical Analysis of Cluster Crystallization of PEG-1500 Aqueous Solutions.....	181
<i>Semionova E.A., Ershova N.A.</i> Posthypertonic Lysis of Human Erythrocytes in Chlorpromazine Presence.....	182
<i>Makashova E.Ye., Zubova O.L., Zubov P.M.</i> Use of N-Acetyl-L-Cysteine Antioxidant in Cryopreservation of Cord Blood Nucleated Cells.....	183
<i>Ulizko P.Yu., Bobrova O.N.</i> Effect of Cryoprotectants and Low Temperatures on Survival of Bovine, Equine and Rabbit Erythrocytes.....	184
<i>Kulik V.V., Babijchuk V.G.</i> Ultrastructural Re-Arrangements in Hypothalamus of Aged Rats After Rhythmic Extreme Cold Exposures.....	185
<i>Pervushina O.A.</i> Application of Cryopreserved Packed Red Blood Cells to Treat Anaemic Syndrome in Canine Babesiosis.....	186
<i>Royenko A.A., Pasieshvili N.M.</i> Administration of Immunomodulators to Treat Maternal and Fetal Infection Reduces Placental and Membrane Contamination.....	187
<i>Plaksina K.M., Sidorenko O.S., Legach E.I., Bozhok G.A.</i> Neuroblast-Like Cell Culture Derivation from Newborn Piglet Adrenal Glands Using Selective Adhesion Method.....	188
<i>Grebenyuk A.I., Chizh N.A., Byzov D.V., Rohoza L.A., Antonenko E.A., Lukyanenko P.G., Sandomirsky B.P.</i> Designing of Device for Endoscopic Surgery In Experimental Animals.....	189
<i>Moiko A.V., Dolgopyatenko A.D., Chizh N.A., Avrunin O.G., Sandomirsky B.P.</i> Designing of Insufflator for Endoscopic Surgery in Experimental Animals.....	190
<i>Bohuslavskiy K.I., Alabedalkarim N.M., Pakhomov A.V., Bozhok G.A.</i> Effect of Incubation of PK-15 Cells with Cryoprotectants on Presence of Gal-alpha-1,3-Gal Epitope.....	191

Предобработка сахарозой повышает криоустойчивость мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных на двух- и трехмерных носителях

В.В. Муценко¹, А.П. Гришков², Е.Ю. Рогульская¹, Ю.А. Петренко¹

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

²Институт мультифазных процессов, Университет Лейбница, Ганновер, Германия

Pretreatment with Sucrose Increases Cryoresistance of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved on Two- and Three-Dimensional Carriers

V.V. Mutsenko¹, A.P. Gryshkov², E.Yu. Rogulskaya¹, Yu.A. Petrenko¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Multiphase Processes, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

Широкое использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в тканевой инженерии создает предпосылки для разработки методов криоконсервирования тканевых эквивалентов на их основе, позволяющих обеспечить высокую жизнеспособность клеток. Ранее нами было показано положительное действие предобработки сахарозой на выживаемость МСК в суспензии после криоконсервирования без добавления диметилсульфоксида (ДМСО) и эмбриональной сыворотки.

Целью данной работы было определить влияние предобработки сахарозой на эффективность криоконсервирования МСК на двух- и трехмерных носителях в присутствии ДМСО.

Двухмерная культура МСК была представлена монослоем клеток, растущих на покровных стеклах, трехмерная – клетками в хитиновых носителях. Образцы культивировали в 0,1–0,2 М сахарозе, замораживали со скоростью 1 град/мин в среде, содержащей сахарозу в концентрации 0,1–0,5 М и/или 10% ДМСО. Для оценки сохранности клетки окрашивали трипановым синим (монослой, суспензия), а для определения метаболической активности использовали Alamar Blue тест (носители).

Установлено, что криоконсервирование с применением 10% ДМСО позволило сохранить (92,0 ± 2,0)% клеток в суспензии. В то же время при криоконсервировании МСК, адгезированных и распластанных на покровных стеклах, сохранность составляла (15,8 ± 5,8)%, а метаболическая активность клеток в составе хитиновых матриц – (40,1 ± 8,9)%. Предобработка МСК сахарозой и последующее их криоконсервирование в присутствии 0,3 М сахарозы и 10% ДМСО повышали указанные показатели в монослое до (53,0 ± 8,2)% и составе трехмерных матриц – до (56,0 ± 12,2)%.

С целью выяснения механизмов действия предобработки исследовали проникновение [¹⁴C]-сахарозы в МСК, поведение клеток в культуре и экспрессию митоген- и стресс-индуцируемой киназы фосфо-p38. Показано, что сахароза проникает внутрь клеток, где, очевидно, оказывает криозащитное действие. Присутствие сахарозы в среде культивирования не влияет на морфологию МСК и характер их движения на поверхности пластика. Кроме того, в условиях предобработки установлена временная активация киназы p38, что указывает на возможное участие стресс-белков в реализации криозащитного действия сахарозы.

Таким образом, предобработка сахарозой является перспективным подходом для дальнейшей разработки методов криоконсервирования МСК на двух- и трехмерных носителях.

The widespread use of mesenchymal stromal cells (MSCs) in tissue engineering requires the development of the cryopreservation methods for MSC-based tissue equivalents, which would provide a high cell viability. We have previously shown the positive effect of pretreatment with sucrose on the post-thaw survival of MSCs in the suspension without dimethyl sulfoxide (DMSO) and fetal calf serum.

The aim of this study was to examine the effect of sucrose pretreatment on the efficiency of MSCs cryopreservation in two- and three-dimensional carriers in presence of DMSO.

Two-dimensional culture of MSCs was a cell monolayer on coverslips, three-dimensional one was represented by the cells in the chitin carriers. The samples were cultured in 0.1–0.2 M sucrose and frozen with 1 deg/min rate in a medium with 0.1–0.5 M sucrose and/or 10% DMSO. The survival of the cells was assessed by trypan blue staining (monolayer or suspension), the metabolic activity was estimated by Alamar Blue test (carriers).

It has been found that cryopreservation using 10% DMSO enabled to preserve (92.0 ± 2.0)% of cells in suspension. Cryopreservation of the MSCs adhered and spread on the coverslips allowed to preserve (15.8 ± 5.8)% cells, the metabolic activity of cells within chitin matrices made (40.1 ± 8.9)%. Pretreatment of MSCs with sucrose and subsequent cryopreservation in the presence of 0.3 M sucrose and 10% DMSO allowed to increase these values for the cells in monolayer up to (53.0 ± 8.2)% and in the three-dimensional matrix up to (56.0 ± 12.2)%.

In order to elucidate the mechanisms of pretreatment effect we have studied the penetration of [¹⁴C]-sucrose into MSCs, the behavior of cells in culture and the expression of mitogen- and stress-activated p38 kinase. It has been shown that sucrose penetrates into cells, where it obviously renders a cryoprotective effect. The presence of sucrose in the culture medium does not affect the MSC morphology and their movement on the tissue culture plastic surface. Moreover, the pretreatment results in a time-dependent change in p38 activation, indicating a possible involvement of stress proteins into sucrose cryoprotective effect.

Thus, the pretreatment with sucrose is a promising approach which could be used for further development of the methods to cryopreserve the MSCs on two- and three-dimensional carriers.



Влияние повторных циклов ритмических экстремальных холодовых воздействий (-120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс

Ю.В. Мартынова, В.Г. Бабийчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Repeated Cycles of Rhythmic Extreme Whole-Body Cooling (-120°C) on Myocardium Structure in Dynamics of Rats' Aging

Yu.V. Martynova, V.G. Babijchuk

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

Проблема старения населения имеет глобальный характер, при этом сердечно-сосудистая патология лидирует среди причин смерти в пожилом возрасте [Hariharan N., Sussman M.A., 2015]. В настоящее время общая криотерапия широко используется в практическом здравоохранении и спортивной медицине с целью улучшения функционального состояния организма [Miller E. *et al.*, 2016], в том числе и для модуляции активности сердца [Louis J. *et al.*, 2015].

Ранее нами показано, что применение ритмических экстремальных холодовых воздействий (РЭХВ; -120°C , 2 мин), начиная с молодого возраста, улучшает состояние внутриклеточных органелл клеток миокарда в более поздние возрастные периоды [Martynova Yu.V. *et al.*, 2015], однако картина морфологических преобразований на тканевом уровне остается нераскрытой.

Цель исследования – изучение влияния повторных циклов РЭХВ (-120°C) на структурное состояние миокарда в динамике старения крыс.

Исследования проводили на 40 нелинейных белых крысах-самцах в процессе естественного старения, начиная с молодого возраста (6 месяцев) до 24-х месяцев, с контрольными сроками в 12 и 18 месяцев. Животные были разделены на группы: 1 – интактные крысы ($n=20$); 2 – крысы, которым в процессе естественного старения применяли РЭХВ каждые 6 месяцев ($n=20$). Всего цикл охлаждения состоял из 9 процедур (-120°C): три в день по 2 мин с 5-минутными интервалами. На 3-и и 5-е сутки сеансы РЭХВ повторяли. Объектом исследования было структурное состояние миокарда, которое оценивали с помощью основных морфометрических показателей (количество ядер кардиомиоцитов на мм^2 , площадь поперечного сечения ядер мкм^2 , количество капилляров на мм^2) на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином.

При естественном старении у крыс отмечалось постепенное уменьшение количества ядер кардиомиоцитов с 6900 ± 720 (в начале эксперимента) до 6600 ± 120 (к 24 месяцам) на мм^2 , площади ядер с $(16,2 \pm 0,8)$ до $(13,5 \pm 1,5)$ мкм^2 . При этом количество капилляров значимо по срокам эксперимента не изменялось. В ходе естественного старения на фоне применения РЭХВ количество ядер на единицу площади также уменьшалось с 7100 ± 510 до 6100 ± 710 на 1 мм^2 , однако сопровождалось значимым увеличением размеров ядер с $(12,4 \pm 1,1)$ в срок 18 месяцев до $(16 \pm 1,2)$ мкм^2 к 24 месяцам. При этом количество капилляров на 1 мм^2 также не изменялось.

Таким образом, РЭХВ (-120°C) компенсируют возрастные изменения в миокарде у крыс за счет увеличения площади ядер кардиомиоцитов, не влияя на его трофику. Установлено, что применение РЭХВ способно повышать компенсаторные возможности миокарда в 24-месячном возрасте: структура миокарда соответствовала состоянию молодых животных.

Population aging is a global problem and cardiovascular diseases lead among the lethal causes in elderly people [Hariharan N., Sussman M.A., 2015]. Nowadays, whole-body cryotherapy is widely used to improve an individual's health in general and sport medicine [Miller E. *et al.*, 2016], including heart rate modulation [Louis J. *et al.*, 2015].

We have previously shown that the use of the rhythmic extreme whole-body cooling (RE WBC, at -120°C for 2 min), starting from a young age, improves the myocardium ultrastructure in later age periods [Martynova Yu.V. *et al.*, 2015], but the morphological features of the tissues have remained undiscovered.

The goal of the investigation was to study the influence of repeated cycles of RE WBC (-120°C) on myocardium structure in dynamics of rats' aging.

The study was performed in 40 white male rats during their natural aging, starting from young age (6 months) up to 24-month-age with the control points at 12 and 18 months. The animals were divided into 2 groups: 1 – the intact one ($n=20$) and 2 – the rats, treated with RE WBC every 6 months during their natural aging ($n=20$). The whole cooling cycle included 9 procedures (-120°C): 3 times a day with 2 min duration and 5 min rest. To the 3rd and 5th days the RE WBC series were repeated. The object of the study was the myocardium structure, evaluated by the main morphometric parameters (number of nuclei per square millimeter of cardiomyocytes, cross-sectional area of nuclei in square micrometer and number of capillaries per square millimeter) in histological specimens stained with hematoxylin and eosin.

Natural aging in rats was accompanied with a gradual decrease of the number of cardiomyocyte nuclei from $6,900 \pm 720$ (at the beginning of the experiment) down to $6,600 \pm 120$ (at 24-month-age) per мм^2 and the nuclei area from 16.2 ± 0.8 down to $13.5 \pm 1.5 \text{ }\mu\text{m}^2$. The number of capillaries did not change significantly during the experiment. Using the RE WBC in animals during natural aging resulted in a decrease in the number of nuclei per unit area from $7,100 \pm 510$ down to $6,100 \pm 710 \text{ }\mu\text{m}^2$, however, there was a significant increase in the nuclei size from 12.4 ± 1.1 (in 18-month-age) up to $16 \pm 1.2 \text{ }\mu\text{m}^2$ (at 24-month-age). The number of capillaries per 1 мм^2 did not change as well.

Thus, the application of RE WBC compensated the age-related changes in the rat's myocardium in terms of the increase in the cross-sectional area of cardiomyocyte nuclei, without affecting the myocardium trophism. It has been found that the use of RE WBC could enhance the myocardium compensatory capabilities in 24 month-old animals: the myocardium structure did not differ from the young animals.



Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды

А.Ю. Пуговкин¹, И.С. Кононенко², Р.В. Кононенко²,
К.И. Буцкий¹, В.А. Черепнин³, Е.Ф. Копейка¹

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

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

³Институт рыбного хозяйства НААН Украины, г. Киев

Cryopreservation of Sterlet Sperm: Optimization of Cryoprotective Medium Composition

A.Yu. Puhovkin¹, I.S. Kononenko², R.V. Kononenko²,
K.I. Butskiy¹, V.A. Cherepnin³, E.F. Kopeika¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

³Institute of Fisheries of the National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Kiev

Криоконсервирование спермы является приоритетным методом сохранения биоразнообразия осетровых рыб. Для получения успешных воспроизводимых результатов необходима разработка новых и совершенствование существующих технологий низкотемпературного консервирования спермы. Цель настоящей работы – криоконсервирование спермы стерляди *Acipenser ruthenus*.

Самцов выдерживали в термоконтейнере с искусственным подогревом воды. Температуру на протяжении 21 суток повышали на 0,5°C в сутки, имитируя таким образом природные условия нереста. На момент проведения стимулирующих инъекций и получения половых продуктов температура воды составляла 14,3°C. Качество спермы определяли по уровню подвижности сперматозоидов: нативной спермы, после разбавления ее криозащитным раствором и после отогрева. Сперму криоконсервировали в гранулах (0,05–0,1 мл) и ампулах (0,5 и 1,5 мл) по трехэтапной программе [Копейка Е.Ф., 1986] с использованием сред различного состава.

Высокие показатели выживаемости сперматозоидов (подвижность на уровне 75–80%) были получены при использовании криозащитного раствора, в состав которого входили KCl, сахароза, глицин, ДМСО (конечная концентрация 9%). В связи с установленным негативным влиянием ДМСО на генетический аппарат [Horvath A., 2005] он был заменен на метанол. При использовании среды, содержащей KCl, сахарозу, глицерин, метанол в конечной концентрации 5%, подвижность отогретой спермы составляла 40–45%. При повышении концентрации метанола до 7,5% подвижность увеличилась до 50–55%. Положительный эффект был получен после замены KCl на KHCO₃ и добавления в среду креатина: подвижность достигла 60–65%. Более высокие показатели были отмечены после модификации среды плазмой крови карася, полученной в зимнее время; модификация среды антифризными белками, выделенными из личинки морозостойкого хрущака *Tenebrio molitor*, не оказала заметного влияния. Результаты оплодотворения, оцененные на стадии 2–3-го деления, во всех опытных образцах составили 50–55% и осеменения нативной спермой – 80–85%.

Таким образом, показана целесообразность использования криозащитных сред на основе метанола для низкотемпературного консервирования спермы стерляди.

Cryopreservation of sperm is of importance to preserve the biodiversity of sturgeons. For successful reproducible results it is necessary to develop the new technologies of sperm low-temperature preservation and improve the existing ones. The purpose of this work was to cryopreserve the sperm of *Acipenser ruthenus* sterlets.

The males were kept in the insulated container with artificial heating of water. Over 21 days the temperature was increased by 0.5°C a day, thus mimicking the natural spawning conditions. At the time of stimulating injections and obtaining the sexual products the water temperature was 14.3°C. Semen quality was determined by the level of sperm motility in native sperm, the sperm after diluting with cryoprotectant solution and after thawing. Sperm were cryopreserved in granules (0.05–0.1 ml) and vials (0.5 and 1.5 ml) according to a three-stage program [Kopeika Ye.F., 1986] using the media of various compositions.

High rates of sperm survival (75–80% motility) were obtained using a cryoprotective solution composed of KCl, sucrose, glycine, DMSO (final concentration of 9%). In view of the known DMSO adverse effect on the genetic apparatus [Horvath A., 2005] it was replaced by methanol. When using a medium containing KCl, sucrose, glycerol, methanol at a final concentration of 5%, the motility of frozen-thawed sperm made 40–45%. After increasing the methanol concentration up to 7.5% the motility increased up to 50–55%. Positive effect was obtained after replacing KCl by KHCO₃ and adding creatine into the medium. This resulted in reaching the motility of 60–65%. Higher rates were obtained after supplementing the medium with the crucian carp blood plasma obtained in winter; while modification of the medium with antifreeze proteins isolated from larvae of cold-resistant beetle *Tenebrio molitor* had no noticeable effect. Fertilization assessed at the stage of 2nd–3rd division in all the tested samples made up to 50–55%; in case of fresh sperm insemination it was 80–85%.

Thus, the expediency of using the cryoprotective media based on methanol for low temperature preservation of sterlet sperm has been shown.



Влияние криоконсервирования на экспрессию stemness-генов в клетках фетальной печени мышей

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев, М.В. Останков
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation on Expression of Stemness-Genes in Mouse Fetal Liver Cells

P.A. Borysov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev, M.V. Ostankov
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

В настоящее время в клеточной и тканевой терапии используются мезенхимальные (МСК) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) фетальной печени (ФП). Применение биообъектов в клинической практике предусматривает их криоконсервирование. Самообновление и плюрипотентность стволовых клеток находятся под контролем транскрипционных факторов, из которых наиболее значимыми являются *nanog*, *oct4* и *sox2*. Анализ состояния stemness-генов позволяет раскрыть механизмы функционирования генетического аппарата клетки после замораживания-отогрева, а также оптимизировать существующие протоколы криоконсервирования.

Цель данного исследования – сравнительный анализ изменения экспрессии генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки ФП мышей линии C57BL. Суспензию клеток получали из гомогената фетальной печени мышей 14 суток гестации в среде 199. Фракции CD105⁺ (МСК) и CD117⁺ (ГСК) выделяли методом иммуномагнитного сортирования с помощью моноклональных антител к CD105 и CD117 («BD», США). Клетки ФП криоконсервировали под защитой 10% ДМСО на программном замораживателе со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот. Затем образцы отогревали на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием пропидий йодидом. Экспрессию генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в нативных и криоконсервированных выделенных фракциях оценивали с помощью РТ-ПЦР.

Показано, что используемый метод выделения и криоконсервирования позволяет сохранить высокую жизнеспособность клеток. Уровень экспрессии исследуемых генов в суспензии клеток ФП и выделенных фракциях CD105⁺ и CD117⁺ отличался до и после криоконсервирования.

Таким образом, криоконсервирование влияет на экспрессию stemness-генов в исследуемых фракциях и, следовательно, изменяет функциональное состояние генетического аппарата клетки.

Nowadays mesenchymal (MSCs) and hematopoietic (HSCs) stem cells of fetal liver (FL) are used in cell and tissue therapy. The important part of application of biological objects in clinical practice is cryopreservation. Stem cells self-renewal and pluripotency are controlled by transcription factors, the most principal are *nanog*, *oct4* and *sox2*. The analysis of stemness-genes state could clear up the principles of cell genomic apparatus functioning after cryopreservation, and improve existing cryopreservation protocols. The aim of research was to carry out a comparative analysis of changes in the expression of *nanog*, *oct4* and *sox2* genes in mouse fetal liver cells before and after cryopreservation.

Fetal liver cells from C57BL mice were the research object. Cell suspension was obtained by homogenization of mouse fetal livers in 199 medium at the 14th day of gestation. Fractions CD105⁺ (MSCs) and CD117⁺ (HSCs) were separated by immunomagnetic sorting using monoclonal antibodies to CD105 and CD117 (BD, USA). Fetal liver cells were cryopreserved under protection of 10% DMSO with a programmed freezer with 1 deg/min cooling rate down to –25°C and then immersed into liquid nitrogen. After storage the samples were thawed in a water bath at 37°C. Cell viability was assayed by propidium iodide staining. Gene expression in isolated fresh and cryopreserved cell subpopulations was estimated by RT-PCR.

It has been shown, that the used method of isolation and cryopreservation allowed to preserve a high cell viability. The expression of target genes in fetal liver suspension and its isolated fractions was different before and after cryopreservation.

Thus, cryopreservation affected the expression of stemness-genes in the studied fractions and therefore changed the functional state of genetic apparatus of a cell.



Хранение штаммов вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS при низких температурах под защитой криопротекторов

В.В. Буркова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков
ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

Storage of Rabies Virus Strains *L. Pasteur* and CVS at Low Temperatures Using Cryoprotectants

V.V. Burkova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
Public Joint-Stock Company Pharmstandard-Biolik, Kharkiv, Ukraine

Технология производства антирабических препаратов предусматривает долгосрочное хранение вирусной суспензии при низких температурах. В предыдущих исследованиях было показано, что в ходе хранения вируса бешенства в поддерживающих средах при низких температурах его активность снижается [Буркова В.В. и др., 2014]. В связи с этим целью данного исследования было изучение сохранности вируса бешенства после хранения при температурах -20 и -80°C под защитой различных криопротекторов.

Объектами исследования были фиксированные штаммы вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS. К вирусной суспензии в поддерживающие среды добавляли следующие криозащитные вещества: желатин (1 и 3%), сахарозу (2,5; 5; 7,5 и 10%), глицерин (2,5; 5; 7,5 и 10%), диметилсульфоксид (ДМСО) (2,5; 5; 7,5 и 10%), альгинат Na (1, 2, 3%), пептон (2,5; 5; 7,5 и 10%). Образцы вносили в пластиковые криопробирки с рабочим объемом 1,8 мл и замораживали в морозильных камерах при -20 , -80°C без контроля скорости охлаждения, размораживали через неделю, 1, 3, 6 месяцев хранения (срок наблюдения). Титр вируса выражали в десятичном логарифме 50%-й фокусформирующей инфицирующей дозы (lg FFD₅₀).

Было установлено, что при хранении вирусов в течение 6 месяцев (срок наблюдения) в поддерживающих средах без криопротекторов инфекционная активность образцов снижалась. Более выраженную гибель вируса наблюдали в ходе хранения при температуре -20°C .

После хранения (при -20°C) образцов вируса штамма *L. Pasteur* с криопротекторами обнаружено защитное действие желатина (1–3%), сахарозы (5–10%), глицерина (5–10%) и ДМСО (5%). Гель альгината Na криопротективного действия не оказывал. В образцах с пептоном происходила значимая гибель вируса. В процессе хранения данного штамма при -80°C значимым криопротективным эффектом обладали все исследованные вещества, за исключением пептона: желатин (в концентрации 3%), сахароза (10%), глицерин (2,5–10%), ДМСО (2,5–10%), гель альгината Na (2–3%).

В ходе хранения штамма CVS при температуре -20°C защитное действие оказывали желатин (в концентрации 3%), сахароза (2,5–10%), глицерин (2,5–10%), ДМСО (5–7,5%). В образцах с альгинатом Na и пептоном наблюдали дополнительную гибель вируса. Во время хранения данного штамма при -80°C изученные криопротекторные вещества защитного эффекта не оказывали.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения криопротекторных веществ для хранения фиксированных штаммов вируса бешенства при температурах -20 , -80°C с учетом индивидуальной чувствительности штаммов к замораживанию в различных консервирующих средах.

Technology of anti-rabies drug production involves a long-term storage of viral suspension at low temperatures. Previously it was shown that storage of rabies virus in the supporting media at low temperatures was accompanied with a decrease in its activity [Burkova V.V. *et al.*, 2014]. The aim of this study was to examine the survival of rabies virus after storage at temperatures of -20 and -80°C under the protection of various cryoprotectants.

The research objects were the fixed rabies virus strains *L. Pasteur* and CVS. The viral suspension in supporting media were supplemented with the following cryoprotective agents: gelatin (1 and 3%), sucrose (2.5, 5, 7.5 and 10%), glycerol (2.5, 5, 7.5 and 10%) dimethyl sulfoxide (DMSO) (2.5, 5, 7.5 and 10%), sodium alginate (1, 2, 3%), peptone (2.5, 5, 7.5 and 10%). The samples were transferred into plastic cryovials with 0.8 ml handling volume and frozen in a freezer at -20 or -80°C without cooling rate control; thawed in a week, 1, 3 and 6 months of storage (observation time). The virus titer was expressed in decimal logarithm of 50% focus-forming infective dose (lg FFD₅₀).

It has been found that during storage of viruses for 6 months (observation time) in the supporting media with no cryoprotectants, an infectious activity of the samples decreased. More pronounced virus death was observed during storage at -20°C .

Following storage (at -20°C) of the strain *L. Pasteur* virus samples with cryoprotectants a protective effect was found after using gelatin (at 1.3% concentration), sucrose (5–10%), glycerol (5–10%) and DMSO (5%). Sodium alginate gel had no cryoprotective action. In the samples with peptone a crucial death of the virus took place. During storage of the strain at -80°C all the investigated substances except peptone rendered a significant cryoprotective effect: gelatin (3%), sucrose (10%), glycerol (2.5–10%), DMSO (2.5–10%) and sodium alginate gel (2–3%).

Storage of CVS strain at -20°C revealed a protective effect of gelatin (3%), sucrose (2.5–10%), glycerol (2.5–10%), and DMSO (5–7.5%). In the samples with sodium alginate and peptone an extra death of the virus was observed. During storage of this strain at -80°C the studied cryoprotective agents had no protective effect.

The findings indicate the expediency of applying the cryoprotective agents for storage of fixed rabies virus strains at temperatures of -20 , -80°C , taking into account the sensitivity of individual strains to freezing in various preserving media.



Коефіцієнти проникності мембран еритроцитів миші для води та криопротекторів

В.В. Огурцова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Permeability Coefficients of Murine Enterocyte Membranes for Water and Cryoprotectants

V.V. Ogurtsova

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

Заморожування-відтавання залишається основним методом консервування клітин. Вивчення осмотичної реакції клітин і транспортних властивостей їх мембран є необхідним етапом кріобіологічних досліджень і розробки оптимальних умов кріоконсервування конкретних видів клітин [Dumont F. *et al.*, 2003].

Мета роботи – визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів миші для води та криопротекторів, які часто використовуються під час кріоконсервування клітинних суспензій. Для експериментів було вибрано наступні криопротекторні речовини: етиленгліколь (ЕГ), гліцерин, 1,2-пропандіол (1,2-ПД) та диметилсульфоксид (ДМСО).

Досліджувався вплив криопротекторів на еритроцити кишечника мишей. Клітини виділяли за методикою Carter J.H. та співавт. (1986). Коефіцієнти фільтрації та проникності мембран еритроцитів для криопротекторів визначали воломометричним методом. Клітини вміщували у бінарний розчин (0,15 М NaCl – 1 М криопротектора), об'єм якого значно перевищував початковий об'єм клітинної суспензії. Досліджували кінетику зміни розмірів клітин у розчинах чотирьох криопротекторів при температурі 25°C за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» (масляно-імерсійний об'єктив $\times 63$). Об'єм клітин апроксимували об'ємом зрізаного конуса. Лінійні розміри клітин (висоту, малий і великий діаметри зрізаного конуса) визначали за допомогою програми «AxioVision Rel. 4.6». Експериментально визначені часові залежності об'єму клітин під час їхнього контакту з гіпертонічними розчинами криопротекторів апроксимували чисельними рішеннями системи нелінійних рівнянь, які описують цю залежність у наближенні лінійної термодинаміки необоротних процесів [Gordiyenko E.A. *et al.*, 1994].

Отримані коефіцієнти фільтрації вірогідно не відрізняються між собою в розчинах криопротекторів 1,2-ПД, ДМСО та гліцерину ((1,42 \pm 0,17), (1,3 \pm 0,13) та (1,24 \pm 0,14) $\times 10^{14}$ м³/Н·с відповідно), у той же час коефіцієнт фільтрації еритроцитів миші у розчині ЕГ майже у 2 рази більший, ніж у розчинах названих криопротекторів ((2,4 \pm 0,32) $\times 10^{14}$ м³/Н·с). Найбільший коефіцієнт проникності мембран еритроцитів миші спостерігали у ЕГ ((4,79 \pm 0,99) $\times 10^7$ м/с), проникність для 1,2-ПД та ДМСО становить (0,672 \pm 0,11) та (0,530 \pm 0,1) $\times 10^7$ м/с відповідно, а найменший коефіцієнт проникності мають мембрани еритроцитів для гліцерину ((0,134 \pm 0,05) $\times 10^7$ м/с). За тривалістю виживання клітин у розчинах криопротекторів можна розгашувати як 1,2-ПД > ДМСО > гліцерин > ЕГ. Показано, що ЕГ негативно впливає на мембрани еритроцитів, порушуючи їх проникні властивості. Отримані дані можуть бути використані для підбору оптимального режиму кріоконсервування цих клітин.

Freeze-thawing has remained the main method of preserving the cells. Study of osmotic response of cells and transport properties of their membranes is a mandatory step of cryobiological researches and development of optimal conditions for cryopreservation of specific cell types [Dumont F. *et al.*, 2003].

The research aim was to determine the permeability coefficients for murine enterocytes for water and cryoprotectants, usually applied for the cryopreservation of cell suspensions. The experiments were done with the following cryoprotective agents: ethylene glycol (EG), glycerol, 1,2-propanediol (1,2-PD) and dimethyl sulfoxide (DMSO).

The cells were isolated by the method reported by J.H. Carter (1986). The coefficients of enterocyte membrane filtration and permeability for cryoprotectants was determined with volumetric method. The cells were placed into a binary solution (0.15 M NaCl – 1 M cryoprotectant) with the volume significantly exceeding the one of the cell suspension. The kinetics of the cell size changes was studied with Axio Observer Z1 microscope (oil-immersion, $\times 63$). The volume of cells was approximated with a truncated cone. Linear dimensions of cells (height, small and large diameters of a truncated cone) was found using AxioVision Rel. 4.6. Experimentally determined time dependencies of cell volume during their contact with solutions of 0.15 M NaCl and 1 M cryoprotectant were approximated with numerical solutions of the nonlinear equations system describing the dependence in terms of linear thermodynamics of irreversible processes [Gordiyenko E.A. *et al.*, 1994].

The obtained filtration coefficients did not significantly differ between the solutions of cryoprotectants 1,2-PD, DMSO and glycerol ((1.42 \pm 0.17); (1.3 \pm 0.13) and (1.24 \pm 0.14) $\times 10^{14}$ m³/N·s, respectively), meanwhile the filtration coefficient of mouse enterocytes in EG solution was almost 2 times higher than in the solutions of other cryoprotectants ((2.4 \pm 0.32) $\times 10^{14}$ m³/N·s). The highest permeability coefficient of murine enterocyte membranes was observed for EG ((4.79 \pm 0.99) $\times 10^7$ m/s), the coefficients for 1,2-PD and DMSO were (0.672 \pm 0.11) and (0.530 \pm 0.1) $\times 10^7$ m/s, respectively, and the lowest permeability coefficient of enterocyte membranes was found for glycerol ((0.134 \pm 0.05) $\times 10^7$ m/s). The duration of cell survival in the solution the cryoprotectants can be arranged as 1,2-PD > DMSO > glycerol > ethylene glycol. It has been shown that EG negatively affects the membranes of enterocytes, breaking their penetrating properties. The data can be used for further selection of the most optimal method of cryopreservation of these cells.



Причина толерантности инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток к краткосрочному хранению

Д.Н. Тарусин, В.В. Муценко, В.С. Зайков

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cause of Encapsulated Mesenchymal Stromal Cells Tolerance to Short-Term Storage

D.N. Tarusin, V.V. Mutsenko, V.S. Zaikov

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

Инкапсуляция в альгинатные микросферы (АМС) является перспективным подходом клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. Ранее было установлено, что инкапсуляция в альгинатные микросферы способствовала сохранению клетками жизнеспособности в процессе хранения при положительных температурах. Однако причины этого влияния остаются не изученными.

Цель данной работы – изучение влияния инкапсуляции в альгинатные микросферы на метаболическую активность и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

Мезенхимальные стромальные клетки, в составе АМС и в виде суспензии, хранили при 4, 22 и 37°C в герметично закрытых пробирках, содержащих 1 мл культуральной среды. Жизнеспособность МСК определяли по МТТ-тесту. В данной работе был выполнен сравнительный анализ метаболической активности и дифференцировочного потенциала МСК дермы человека в составе АМС и в виде монослоя в процессе их культивирования. Метаболическую активность определяли по тесту с AlamarBlue (АВ). Для оценки митохондриального потенциала использовали флуоресцентный краситель JC-1. Дифференцировочный потенциал оценивали после индукции клеток в остеогенном и адипогенном направлениях.

Инкапсуляция МСК в АМС предотвращала агрегацию и позволяла сохранить жизнеспособность при 37 и 22°C на уровне 60–85% до 3-х суток инкубации, а также приводила к снижению метаболической активности клеток. Так, через 2 ч культивирования интенсивность флуоресценции восстановленной формы АВ в группе инкапсулированных МСК была на 28,3% ниже, чем в группе с монослоем МСК. Митохондриальный потенциал инкапсулированных МСК был ниже, чем у монослойной культуры МСК. При этом после высвобождения МСК из АМС и последующего монослойного культивирования клетки сохраняли способность к мультилинейной дифференцировке.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что одной из причин устойчивости инкапсулированных в альгинатные микросферы МСК к повреждающим факторам краткосрочного хранения является снижение метаболической активности, при этом инкапсуляция не оказывает влияния на их дифференцировочный потенциал.

Encapsulation into alginate microspheres (AMSs) is a promising approach in cell biotechnology, tissue engineering and transplantation. Previously it was found that encapsulation in alginate microspheres contributed to maintain cell viability during storage at positive temperatures. However, the mechanism of this effect is still unclear.

The aim of this work was to study the effect of encapsulation in alginate microspheres on the metabolic activity and differentiation potential of mesenchymal stromal cells (MSCs).

Encapsulated MSCs were stored at 4°C, 22°C and 37°C in sealed tubes containing 1 mL of culture medium. Cell viability was determined by MTT-test. In this study we compared metabolic activity and differentiation potential of human dermal mesenchymal stromal cells stored in AMSs and cultured in a monolayer. Metabolic activity was measured by AlamarBlue (AB) test. Fluorescent dye JC-1 was used to assess mitochondrial potential. Differentiation potential was evaluated after cells induction to osteogenic and adipogenic directions.

Encapsulation of MSCs in AMS prevented their aggregation and allowed to preserve the viability at the level of 60–85% up to 3 days of incubation at 37 and 22°C. Metabolic activity of the cells decreased. In particular, the fluorescence intensity of the AB reduced form in the group of encapsulated MSCs after 2 hrs of culture was 28.3% lower if compared to the group of MSCs monolayer culture. Mitochondrial potential of encapsulated MSCs was lower versus the MSCs monolayer culture. The MSCs maintained the ability for multilineage differentiation after release from AMSs and subsequent monolayer culture.

The results of this work indicate that a reason, why MSCs encapsulated in alginate microspheres tolerate short-term storage, could be their reduced metabolic activity, moreover, encapsulation has no effect on their differentiation potential.



Лиофилизированный лейкоконцентрат кордовой крови человека как корректор состояния иммунного статуса при лечении атопического дерматита (экспериментальное исследование)

А.К. Таранник, Л.В. Останкова, И.Г. Гриша, Л.В. Сокол,
Е.Д. Луценко, Н.А. Бондарович, М.В. Останков, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Frozen-Dried Human Cord Blood Leukoconcentrate as Correcting Agent of Immune Status when Treating Atopic Dermatitis (Experimental Study)

A.K. Tarannik, L.V. Ostankova, I.G. Grisha, L.V. Sokol,
E.D. Lutsenko, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

В настоящее время одной из актуальных проблем здравоохранения является поиск новых биологически активных веществ и разработка лекарственных препаратов на их основе, нормализующих иммунную систему (ИС) человека.

Одним из возможных подходов для решения проблемы регуляции иммунных нарушений у человека при атопическом дерматите (АД) может быть использование кордовой крови. Лиофилизация этого биообъекта может расширить область ее применения.

Цель работы – экспериментальное обоснование возможности применения лиофилизированного лейкоконцентрата кордовой крови человека (ЛЛККЧ) для восстановления показателей ИС при аутоиммунной патологии на примере АД.

Эксперименты были проведены на 6-месячных крысах линии Вистар. Атопический дерматит моделировали по ранее описанному методу [Залкан П.М. и Ивлева Е.А., 1965]. Очаг воспаления формировали на участке спины крысы (9–10 см²) ежедневным втиранием 5%-го спиртово-ацетонового раствора динитрохлорбензола в течение 21-х суток. Вводили ЛЛККЧ внутривентриально по 0,5 мл в дозе 5×10^6 кл на 22-е сутки развития АД. Субпопуляционный состав клеток селезенки определяли методом проточной цитофлуориметрии («FACS Calibur», «BD», США) с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD25-молекулам («BD»). Концентрацию циркулирующего иммунного комплекса (ЦИК) определяли в сыворотке крови. Анализ показателей до и после лечения проводили на 3-и, 7-е, 14-е сутки развития патологии.

Была доказана эффективность применения ЛЛККЧ при лечении экспериментального атопического дерматита. Показано, что у крыс с индукцией АД происходят изменения в ИС уже с 3-х суток после индукции патологии. Применение для лечения ЛЛККЧ обуславливало восстановление количества Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) и иммунно-регуляторного индекса на 14-е сутки. К этому сроку наблюдали снижение концентрации ЦИК, IgE и Т-рег (CD4⁺CD25⁺).

Таким образом, ЛЛККЧ проявляет иммунокорректирующую активность при лечении экспериментального АД, что является перспективным для его применения в клинической практике.

Nowadays one of the most pressing public health problems is the search for new biologically active substances and using them in the development of the medicinal products, able to restore the immune system (IS). One of the possible approaches to regulate the immune disorders in humans with atopic dermatitis (AD) could be the use of cord blood. Freeze-drying of the biological object may expand the possibility of its application.

The purpose of this work was the experimental substantiation of possible using of frozen-dried human cord blood leukoconcentrate (fHCBL) to restore the IS parameters at AD, as an example of autoimmune pathology.

The experiments were performed in 6-month-old Wistar rats. Atopic dermatitis was modeled as previously described [Zalkan P.M. and Ivlev E.A., 1965]. The inflammation focus was created at the site of rat's back (9–10 cm²) by daily rubbing of 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzene during 21 days. The fHCBL was intraperitoneally injected by 0.5 ml in a dose of 5×10^6 cells to day 22 of AD development. Subpopulations of spleen cells were examined by flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA) using monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, CD25-molecules (BD, USA). The concentration of circulating immune complexes (CIC) was determined in the serum. The indices before and after treatment were analyzed to day 3, 7, 14 of the pathology development.

The fHCBL efficiency when treating an experimental atopic dermatitis has been proven. It has been shown that in the rats with induced AD the changes in IS occur already in 3 days after the disease induction. Application of the fHCBL stipulated the recovery of T-lymphocyte content (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) and immuno-regulatory index to day 14. By that time, there was the reduction observed in the concentration of CIC, IgE and T-reg (CD4⁺CD25⁺).

Thus, the fHCBL demonstrated an immune correcting activity when treating experimental AD, which could be promising for clinical practice.

**Структура сердца после терапевтической гипотермии
и введения МСК при экспериментальном инфаркте миокарда**
А.В. Трофимова, Н.А. Чиж, И.В. Белочкина, В.В. Волина, Б.П. Сандомирский
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Therapeutic Hypothermia and Injection of MSCs Improve
Heart Structure under Experimental Myocardial Infarction**
A.V. Trofimova, N.A. Chizh, I.V. Belochkina, V.V. Volina, B.P. Sandomirsky
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Заболелания сердечно-сосудистой системы занимают первое место среди причин смертности и инвалидизации населения. В настоящее время активно разрабатываются новые способы воздействия на регенерацию поврежденного миокарда. Предполагается, что трансплантация мезенхимальных стромальных клеток (МСК) способствует замещению некротизированного участка вновь образованными кардиомиоцитами и стимулирует неоангиогенез в ишемизированной зоне [Гринь В.К., 2014]. В последнее десятилетие широко применяется метод терапевтической гипотермии с целью защиты клеток сердца и головного мозга от кислородного голодания в условиях острой коронарной и мозговой недостаточности [Holzer M., 2005].

Цель работы – исследование морфологических особенностей развития некроза и ремоделирования сердца при экспериментальном инфаркте миокарда (ИМ) после терапевтической гипотермии и введения МСК.

Эксперимент проводили на 70 белых беспородных 6-месячных крысах-самцах массой 250–300 г. Животные ($n = 60$) после моделирования ИМ путем перевязки левой коронарной артерии были разделены на 4 группы, по 15 крыс в каждой: 1 – контроль (ИМ), 2 – ИМ и гипотермия в течение 60 мин, 3 – ИМ и однократное внутривенное введение 0,5 мл суспензии аллогенных криоконсервированных МСК (концентрация $1,2 \times 10^6$ кл/мл), 4 – ИМ и сочетанное использование гипотермии и МСК. Группу нормы составили 10 животных. Морфологическое исследование ткани сердца проводили на 7-, 14- и 30-е сутки эксперимента. Гистологические срезы окрашивали пикрофуксином по Ван Гизон, а также гематоксилином и эозином.

В группе контроля к 7-м суткам зона инфаркта была представлена очагами разрушенных безъядерных кардиомиоцитов и окружена широким клеточным валом из нейтрофилов и макрофагов, обнаруживались спавшиеся вены и капилляры. В группе 4, в отличие от других групп животных с ИМ, уже на 7-е сутки эксперимента репаративные процессы в миокарде преобладали над деструктивными. О репарации миокарда свидетельствовали стимуляция ангиогенеза, развитие коллатерального кровообращения, а также восстановление сократительных элементов кардиомиоцитов периинфарктной зоны. Результаты морфометрического исследования показали, что на 30-е сутки у животных группы 4 была наименьшая площадь соединительнотканного рубца.

Таким образом, комбинированное использование терапевтической гипотермии и введения МСК при инфаркте миокарда ускоряет репаративные процессы в сердце и снижает степень ремоделирования миокарда левого желудочка.

Cardiovascular morbidity is still one of the top causes of death and disability in humans. Currently, the novel methods to improve the regeneration of damaged myocardium are actively developing. It is assumed that the transplantation of mesenchymal stromal cells (MSCs) can promote the replacement of necrotic areas by newly formed cardiomyocytes and stimulate angiogenesis in the ischemic area [Grin V.K., 2014]. In the last decade, the application of therapeutic hypothermia in order to protect heart and brain cells from oxygen starvation under acute coronary and cerebral insufficiency has become widespread [Holzer M., 2005].

The purpose of this work was to study the morphological features of necrosis development and cardiac remodeling under experimental myocardial infarction (MI) and following the induction of therapeutic hypothermia and injection of MSCs.

The experiment was carried out in 70 white outbred male rats weighing 250–300g and aged of 6 months. Infarction was caused by ligation of the left coronary artery, thereafter all the animals were divided into 4 groups of 15 rats in each. The 1st group was the control (MI), the 2nd one comprised the MI and induction of hypothermia for 60 min, the 3rd one was MI and single intravenous injection of 0.5 ml of the suspension of cryopreserved allogeneic MSCs (concentration 1.2×10^6 cells/ml), the 4th group consisted of animals with MI and combined the use of hypothermia and injection of MSCs. The norm group included 10 animals. Heart tissue for morphological studies was taken to days 7, 14 and 30 of the experiment. Histological sections were stained with picrofuchsin by Van Gieson as well as with hematoxylin and eosin.

In group 4, in contrast to other groups with MI, at day 7 day of the experiment the reparative processes in myocardium prevailed over destructive ones. Reparation of myocardium was manifested in the stimulation of angiogenesis, the development of collateral circulation and also in the recovery of contractile elements of cardiomyocytes of the peri-infarction zone. The data of morphometric study in group 4 showed the smallest area of connective-tissue scar to day 30 of the experiment.

Thus, the combined use of therapeutic hypothermia and injection of MSCs in myocardial infarction accelerated the reparative processes in heart and reduced the remodeling of left ventricle myocardium.



Эффективность криоконсервирования экспандированных бластоцист человека методом витрификации с использованием коллапсирования

Т.А. Юрчук¹, М.П. Петрушко^{1,2}, В.И. Пиняев^{1,2}

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

²Медицинский центр «ВРТ-клиника репродуктивной медицины», г. Харьков

Efficiency of Human Expanded Blastocyst Cryopreservation using Vitrification and Collapsing

T.A. Yurchuk¹, M.P. Petrushko^{1,2}, V.I. Pinyaev^{1,2}

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

²Medical Center ART Clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv

Витрификация эмбрионов человека является наиболее перспективным методом криоконсервирования. Однако существующие протоколы не учитывают особенности стадий развития. Доимплантационные эмбрионы на стадии экспандированной бластоцисты представляют собой многоклеточную структуру с наличием бластоцели, заполненной большим количеством жидкости. В связи с этим целесообразно применение процедур, позволяющих уменьшить полость бластоцели, перед витрификацией.

Цель данного исследования – оценка эффективности применения коллапсирования перед криоконсервированием эмбрионов человека на стадии экспандированной бластоцисты методом витрификации.

Витрификацию бластоцист проводили с использованием среды на основе этиленгликоля, диметилсульфоксида и сахарозы на носителях («CryoTech», Япония). Коллапсирование бластоцист осуществляли химическим, механическим и лазерным методами. Выживаемость бластоцист после отогрева оценивали по морфологическим критериям [Gardner D. *et al.*, 1999], восстановлению их объема и развитию *in vitro*. Эффективность криоконсервирования определяли по частоте наступления беременности. Бластоцисты были разделены на две группы: 1 – без коллапсирования (контроль), 2 – с коллапсированием полости бластоцисты. Клинические показатели пациенток в исследуемых группах (возраст, продолжительность бесплодного брака, количество аспирированных ооцитов) частота оплодотворения, морфологические характеристики эмбрионов и скорость их морфогенеза не имели статистически значимых отличий во всех исследуемых группах.

Выживаемость бластоцист после витрификации и отогрева группы 1 составила $(88,2 \pm 11,1)\%$, а группы 2 – $(92,1 \pm 10,3)\%$. Через 2 ч культивирования *in vitro* $(92,3 \pm 5,8)\%$ бластоцист группы 1 и $(53,8 \pm 9,1)\%$ бластоцист группы 2 восстанавливали клеточный объем. Через 3 ч культивирования этот показатель в группе 2 увеличился до $(97,3 \pm 3,5)\%$. Количество бластоцист, перенесенных в полость матки, составило $1,9 \pm 0,2$ и $2,2 \pm 0,4$ для групп 1 и 2 соответственно. Частота наступления беременности в группе с коллапсированием (64%) была статистически значимо выше, чем в группе контроля (58%).

Коллапсирование экспандированных бластоцист перед витрификацией приводит к повышению показателя выживаемости эмбрионов, морфологических характеристик и частоты наступления беременности. Увеличение времени культивирования коллапсированных экспандированных бластоцист перед эмбриопереносом является одним из условий их восстановления после витрификации-отогрева.

Vitrification of human embryos is the most promising method of cryopreservation. However, current protocols do not address the specificity of developmental stages. Preimplantation embryos at the expanded blastocyst stage represent multicellular structure with the presence of blastocoel filled with plenty of fluids. In this connection, it is advisable to use the procedures reducing the blastocoel cavity prior to vitrification.

The purpose of this study was to assess the effectiveness of collapsing prior to cryopreservation of human embryos at the stage of expanded blastocyst by means of vitrification method. Blastocysts were vitrified on the carriers (CryoTech, Japan) using the media based on ethylene glycol, sucrose and dimethyl sulfoxide. Collapsing of blastocysts was carried out by chemical, mechanical or laser methods. Survival of blastocysts after thawing was examined by morphological criteria [Gardner D. *et al.*, 1999], recovery of their volume and *in vitro* development. Cryopreservation efficiency was determined by the frequency of pregnancy onset.

Blastocysts were divided into two groups: 1 – with no collapsing (control), 2 – with collapsing of the blastocyst cavity. Clinical scores of patients in the studied groups (age, duration of infertility, number of aspirated oocytes) fertilization rate, morphological characteristics of embryo and the rate of their morphogenesis had no statistically significant differences.

The survival of blastocysts after vitrification and warming for group 1 made $(88.2 \pm 11.1)\%$ and $(92.1 \pm 10.3)\%$ for group 2. After 2 hours of *in vitro* culturing (92.3 ± 5.8) and $(53.8 \pm 9.1)\%$ blastocysts of group 1 of group 2, respectively, recovered the cell volume. After 3 hours of culturing, this value in group 2 blastocysts increased up to $(97.3 \pm 3.5)\%$. Number of blastocysts transferred into the uterine cavity was 1.9 ± 0.2 and 2.2 ± 0.4 for group 1 and 2, respectively. Pregnancy rate in the group with collapsing (64%) was significantly higher than in the control group (58%).

Thus, collapsing of the expanded blastocysts before vitrification increased the survival rate of embryos, their morphological characteristics and pregnancy rate. Extending the cultivation period of collapsed expanded blastocysts prior to the embryo transfer is one of the conditions for their recovery after vitrification-warming.



Лечение экспериментальной кишечной инфекции иммобилизованными в геле антибактериальными препаратами, хранившимися при низких температурах

О.М. Бабинец, И.А. Буряк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Therapy of Experimental Intestinal Infection with Gel-Immobilized Antibacterial Drugs, Stored at Low Temperatures

O.M. Babinets, I.A. Buryak

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

Наиболее перспективными среди систем доставки лекарств направленного действия (Drug Delivery Systems; DDS) являются системы доставки лекарств перорального применения с использованием в качестве носителей солей альгиновых кислот (альгинатов). В связи с этим актуальна разработка технологий долгосрочного хранения DDS на основе альгинатов.

Цель данного исследования – изучение терапевтической эффективности препаратов, которые используют при лечении бактериальных инфекций, после иммобилизации в альгинатном геле и хранения при низких температурах (–80 и –196°C).

Эксперименты проводили на беспородных белых крысах. Животные были разделены на три группы: 1 – контроль (крысы, не получавшие лечение); 2 – крысы, которым вводили стандартные препараты; 3 – крысы, которым вводили иммобилизованные препараты после хранения при низких температурах. У животных моделировали кишечную инфекцию внутрижелудочным введением культуры *Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603) на фоне иммуносупрессии гидрокортизона ацетатом. Препараты иммобилизовали в гранулах геля альгината натрия (1%), замораживали до –80 и –196°C согласно ранее разработанному методу [Высеканцев И.П. и др., 2015], размораживали в термостате при температуре воздуха 37°C перед использованием. Терапию проводили препаратами «Ампиокс», смесью «Ампиокса» с натрия нуклеинатом, смесью «Ампиокса» с препаратом «Бактериофаг клебсиелл поливалентный», смесью «Ампиокса» с натрия нуклеинатом и «Бактериофагом». Дозы препаратов рассчитывали в соответствии с регламентными документами по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Все препараты вводили перорально.

Установлено, что в контрольной группе животных, не получавших терапию, все крысы погибли. В группах 2 и 3 погибла часть животных. Во всех группах, получавших иммобилизованные препараты, у выживших животных сроки эрадикации *K. pneumonia* из кишечника и восстановления кишечной микрофлоры значительно сокращались. Хранение при –80 и –196°C в течение года (срок наблюдения) не влияло на терапевтическую эффективность иммобилизованных препаратов.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке комплексных иммобилизованных препаратов для лечения кишечных инфекций у больных с иммуносупрессивными состояниями.

The most prospective targeted drug delivery systems (DDS) are developed for oral supplementation using salts of alginic acid (alginates) as carriers. Therefore the task of designing the technologies for long-term storage of alginate-based DDS is important today.

This research was aimed to study a therapeutic efficiency of drugs, used in therapy of bacterial infections after immobilization in alginate gel and storage at low temperatures (–80 and –196°C).

Experiments were performed in outbred white rats. Animals were divided into 3 groups: the group 1 was the control (untreated rats); the group 2 comprised the rats, treated with the standard drugs; the rats which received the immobilized drugs after storage at low temperatures were in the group 3. Intestinal infection was simulated in animals by intragastric administration of *Klebsiella pneumonia* culture (ATCC 700603) at the background of immune suppression with hydrocortisone acetate. Preparations were immobilized in granules of sodium alginate gel (1%), frozen down to –80 and –196°C according to the previously developed technique [Vysekantsev I.P. *et al.*, 2015], thawed in thermostat at 37°C before use. The therapy involved Ampiox drug, the mixture of Ampiox with sodium nucleinate, the mixture of Ampiox with Bacteriophage *Klebsiellae polyvalentum* drug, and the mixture of Ampiox with sodium nucleinate and Bacteriophage. The drug doses were calculated according to the protocols on pre-clinical studies of drugs. All the drugs were administered *per os*.

It was established that in the control group of untreated animals all the rats died. In the groups 2 and 3 some animals died. In all the groups, treated with immobilized preparations, the survived animals had significantly reduced terms of *K. pneumonia* eradication from the intestine and terms of intestinal microflora recovery. The storage at –80 and –196°C within a year (observation term) did not affect a therapeutic efficiency of immobilized preparations.

Our findings could be used in designing the combined immobilized preparations to treat intestinal infections in patients with immunosuppressive states.



Криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки в терапии экспериментального оофорита

М.С. Юхта, Н.А. Волкова, Л.В. Степанюк, Л.Г. Чернышенко, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells In Experimental Oophoritis Therapy

M.S. Yukhta, N.A. Volkova, L.V. Stepanjuk, L.G. Chernyshenko, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Проблема лечения воспалительных заболеваний органов малого таза на протяжении многих лет остается одной из наиболее актуальных в клинической практике. Многочисленные исследования показали, что мезенхимальные стромальные клетки благодаря уникальным способностям к хоумингу, регенерации поврежденных тканей, регуляции иммунных и воспалительных реакций имеют потенциал для лечения воспалительных процессов.

Целью работы было изучение эффективности внутривенного введения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток (кМСК) костного мозга при экспериментальном хроническом воспалении яичников.

Для моделирования хронического оофорита самкам мышей внутрибрюшинно вводили инактивированную вакцину *Staphylococcus aureus* штамм 209 (50×10^6 микробных тел). На 21-е сутки животным контрольной группы внутривенно вводили физиологический раствор; опытной – $0,5 \times 10^6$ аллогенных кМСК костного мозга. Животные без воздействия составили группу интактного контроля. Эффективность терапии оценивали гистоморфометрически на 10- и 21-е сутки после введения клеток. Функцию яичников определяли путем мониторинга качества ооцитов и относительного количества оплодотворенных яйцеклеток при суперовуляции, а также по частоте наступления беременности в естественном эстральном цикле и среднему количеству мышат в потомстве.

На 10-е сутки наблюдения морфометрический анализ показал статистически значимое уменьшение количества фолликулов в яичниках мышей контрольной и экспериментальной групп ($10,6 \pm 2,5$ и $9,4 \pm 2,6$ соответственно) по сравнению с интактными животными ($18,3 \pm 4,5$).

На 21-е сутки у животных с терапией кМСК этот показатель увеличился ($15,3 \pm 1,8$) по сравнению с контрольной группой ($7,4 \pm 2,2$) и достиг уровня интактных животных.

Введение кМСК приводило к увеличению относительного количества оплодотворенных ооцитов после стимуляции суперовуляции (на 38%), частоты наступления беременности в естественном эстральном цикле (на 20%) и среднего количества мышат в потомстве (на 98%) по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, внутривенное введение кМСК костного мозга оказывало модулирующее действие на течение воспалительного процесса в яичниках, способствовало восстановлению фолликулогенеза без активации процессов апоптоза в ооцитах, увеличению относительного количества эмбрионов, полученных после стимуляции суперовуляции, а также частоты наступления беременности в естественном эстральном цикле и среднего количества мышат в потомстве.

For many years, treatment of pelvic inflammatory diseases remains among the most crucial in clinical practice. Numerous investigations have shown that mesenchymal stromal cell have therapeutic potential for the treatment of inflammation due to their unique properties of specific homing, regeneration of damaged tissue, regulation of immune and inflammatory responses.

The research aim was to investigate the effectiveness of intravenous administration of cryopreserved mesenchymal stromal cells (cMSCs) of bone marrow in treatment of experimental chronic inflammation of the ovaries.

Chronic oophoritis in the female mice was initiated by intraperitoneal injection of inactivated vaccine of *Staphylococcus aureus* strain 209 (50×10^6 microbial bodies). At the 21st day the control group had intravenous injections with a physiological saline, and the animals of experimental group were injected with 0.5×10^6 allogeneic cMSCs of bone marrow. Non-treated animals served as the intact control. The cell therapy efficiency was histomorphometrically evaluated at the 10th and 21st days after cell administration. Ovarian function was assessed by monitoring the quality of oocytes and relative number of fertilized cells under superovulation condition; pregnancy rate and average litter size in natural estrous cycle were calculated.

Morphometric analysis to day 10 demonstrated the statistically significant reduction in follicular number in murine ovaries of the control and experimental groups (10.6 ± 2.5 and 9.4 ± 2.6 , respectively) if compared to the intact animals (18.3 ± 4.5). To the day 21, this value increased (15.3 ± 1.8) in the animals with cMSCs therapy in comparison to the control group (7.4 ± 2.2) and reached the level of intact animals. Administration of cMSCs led to an increase in relative number of fertilized oocytes after stimulation of superovulation (by 38%), the pregnancy rate in natural estrous cycle (by 20%) and the average size of the offspring (by 98%) compared with the control animals.

Thus, an intravenous injection of cMSCs produced a modulatory effect on the course of inflammation, restored folliculogenesis without activation of apoptosis in oocytes, and increased the relative number of embryos obtained after stimulation of superovulation as well as the pregnancy rate and average litter size in natural estrous cycle.



Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи

A.A. Vlasov, G.A. Kovalov, I.V. Belochkina, L.N. Tynnyka, B.P. Sandomirsky
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Extracts of Cryopreserved Piglet Skin Fragments on State of Pro- and Antioxidant Systems Following Skin Cryodestruction

A.A. Vlasov, G.A. Kovalov, I.V. Belochkina, L.N. Tynnyka, B.P. Sandomirsky
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Криодеструкция кожи сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Одним из показателей интенсивности перекисидации липидов является содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов (ТБК-АП)) и диеновыми конъюгатами (ДК). Состояние антиоксидантной системы можно оценить по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. С помощью показателей про- и антиоксидантной системы в сыворотке крови можно оценить выраженность воспалительного процесса. Известно, что экстракты криоконсервированных фрагментов кожи поросят (ЭКП) ускоряют заживление холодовых ран.

Цель работы – определение влияния ЭКП на интенсивность ПОЛ в организме животных с холодowymi ранами.

Раны моделировали у крыс линии «Сфинкс» медным аппликатором, охлажденным до температуры -196°C (диаметр – 10 мм, экспозиция – 120 с). Животные разделены на 3 группы: экспериментальная – введение ЭКП (0,5 мг/кг) [Пат. 64381А, Украина, МПК7 А61К35/12], контрольная – введение 0,9% раствора NaCl, норма – интактные животные. Инъекции проводили внутривентрально, ежедневно в течение всего эксперимента. Интенсивность ПОЛ определяли по содержанию ТБК-АП, ДК, а также активности СОД и каталазы в сыворотке крови.

Установлено, что криодеструкция кожи сопровождается существенным нарушением баланса про- и антиоксидантной системы. На 7-е сутки эксперимента содержание ТБК-АП и ДК повышалось в 1,7, на 14 сутки – в 1,5, на 21-е сутки – в 1,4 раза. Активация ПОЛ сопровождалась снижением активности СОД и каталазы: на 7-е сутки – в 2,3 и 2,0 раза, на 14-е сутки – в 2,0 и 1,9, на 21-е сутки – в 1,7 и 1,8 раза. У животных экспериментальной группы на 7- и 14-е сутки уровень ТБК-АП и ДК статистически значимо не отличался от показателей в контрольной группе. Его снижение (до нормальных значений) отмечено на 21-е сутки. Активность каталазы на 7-е сутки не изменялась, ее увеличение зафиксировано на 14-е (в 1,4 раза) и 21-е (до уровня нормы) сутки эксперимента. Показатели активности СОД на 7- и 14-е сутки превышали значения в контрольной группе в 1,3 и 1,2 раза соответственно. На 21-е сутки наблюдалась их нормализация.

Таким образом, применение ЭКП способствует восстановлению баланса про- и антиоксидантной системы у животных с холодowymi ранами, что проявляется снижением содержания ТБК-АП и ДК, а также повышением активности СОД и каталазы в сыворотке крови.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения ЭКП для регуляции раневого процесса.

Skin cryodestruction is accompanied by strengthening of lipid peroxidation (LPO) processes. One of indices of lipid peroxidation intensity is the content of products, reacting with thiobarbituric acid (TBA-AP) and diene conjugates (DC). The state of antioxidant system may be assessed by superoxide dismutase (SOD) and catalase activity. By using the indices of pro- and antioxidant system in blood serum we may assess the degree of inflammatory process manifestation. Extracts of piglet skin cryopreserved fragments (PSE) are known to accelerate the cold wound healing.

The research aim was to determine the PSE effect on LPO intensity in animals with cold wounds.

Wounds were modeled in Sphinx rats using copper applicator, cooled down to the temperature of -196°C (10 mm diameter, 120 s exposure). Animals were divided into 3 groups: experimental group was treated with PSE (0.5 mg/kg) [Patent of Ukraine 64381 A, IPC7 A61K35/12]; the control animals were injected with 0.9% NaCl solution; and the intact animals were the norm. The intraperitoneal injections were done daily through the whole experiment period. The LPO intensity was determined by the content of TBA-AP, DC, as well as SOD and catalase activity in serum.

Skin cryodestruction was established as accompanied by a significant disorder in balance of pro- and antioxidant systems. To days 7, 14 and 21 of the experiment the content of TBA-AP and DC increased in 1.7, 1.5 and 1.4 times, respectively. The LPO activation was accompanied with a decreased activity of SOD and catalase: to days 7, 14 and 21 it was in 2.3 and 2.0, 2.0 and 1.9, 1.7 and 1.8 times, respectively. In animals of experimental group to days 7 and 14 the level of TBA-AP and DC did not significantly differ from the indices in the control group. Its decrease (down to the normal values) was observed to day 21. The catalase activity remained unchanged to day 7, its augmentation was recorded to days 14 (in 1.4 times) and 21 (up to the norm). The indices of SOD activity to days 7 and 14 exceeded the values in the control group in 1.3 and 1.2 times, respectively. Their normalization was observed to day 21.

Thus, the PSE application contributes to recovery the balance of pro- and antioxidant systems in animals with cold wounds, manifested in a decreased content of TBA-AP and DC, as well as in increased activity of SOD and catalase in blood serum. Our findings testify to the prospects of PSE application for wound process controlling.



Влияние криоконсервированной кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс с алиментарным ожирением

Е.А. Чернявская, В.Г. Бабийчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Cryopreserved Cord Blood on Heart Rate Autonomic Regulation in Rats with Alimentary Obesity

Е.А. Chernyavskaya, V.G. Babijchuk

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

В настоящее время основную часть больных с сердечно-сосудистой патологией составляют пациенты с алиментарно-конституциональным типом ожирения [Андрианова О.Л., 2015]. Исследования в области биологии и медицины показали высокую эффективность компонентов кордовой крови при лечении различного рода патологических состояний, в том числе и заболелаваний сердечно-сосудистой системы.

Цель работы – изучение особенностей влияния криоконсервированных ядроконсодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) у животных с алиментарным ожирением (АО).

Исследования выполнены на белых 6-месячных беспородных крысах-самцах. Животные были разделены на 3 группы: интактные (здоровые) крысы; крысы с моделью АО; крысы с моделью АО, которым вводили ЯСК КК. Моделирование АО осуществляли путем содержания животных на высококалорийном рационе [Баранов В.Г., 1972]. Размороженный препарат ЯСК КК человека вводили внутривентриально, однократно в дозе 3×10^5 CD34⁺ кл/кг веса животных. Спектральный анализ ВСР проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм» («Нейро-Софт», Россия) на следующие сутки, через неделю и месяц после введения препарата.

У животных с моделью АО отмечено снижение показателей общей мощности (Total Power; TP) спектра нейрогуморальной регуляции по сравнению с группой крыс без ожирения (интактных). Состояние регуляторных систем этих животных характеризуется низким уровнем парасимпатических влияний на динамику сердечного ритма при относительно сохраняющемся тоне симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС).

На следующие сутки после применения криоконсервированных ЯСК КК показатели TP возросли по отношению к контрольным значениям за счет активации как вегетативных центров, так и гуморального звена регуляции. В отдаленные сроки наблюдения (через неделю и месяц после введения ЯСК КК) у крыс отмечался еще более существенный подъем TP на фоне контрольных значений. Ее рост был результатом повышения тонуса симпатического и парасимпатического отделов ВНС.

Таким образом, на основании проведенных нами экспериментальных исследований можно предположить, что введение препарата ЯСК КК животным с моделью АО активирует вегетативные центры, которые представляют самый высокий уровень автономной нервной системы, а она является наиболее развитым и быстрым путем реализации эффектов нейрогуморальной регуляции.

Nowadays most patients with cardiovascular pathology suffer from alimentary-constitutional obesity [Andrianova O.L., 2015]. Investigations in the field of biology and medicine have shown a high efficiency of cord blood components in therapy of different pathological states, including cardiovascular diseases.

The research aim was to study the features of the effect of cryopreserved cord blood nucleated cells (CB NCs) on indices of spectral analysis of heart rate variability (HRV) in animals with alimentary obesity (AO).

Research was performed in white 6-month-old outbred male rats. Animals were divided into 3 groups: intact (healthy) rats; rats with simulated AO; rats with simulated AO and treated with CB NCs. We simulated AO by keeping animals on a high calorie diet [Baranov V.G., 1972]. Frozen-thawed preparations of human CB NCs were intraperitoneally administered once at a dose of 3×10^5 CD34⁺ cells/kg of body weight of animals. The HRV spectral analysis was performed using the Poly-Spectrum-Rhythm software (Neurosoft, Russia) next day, in a week and a month after preparation administration.

In AO-simulated animals we observed a decrease in spectrum total power (TP) of neurohumoral regulation compared to the group of non-obese rats (intact). State of regulatory systems in these animals was characterised by a low level of parasympathetic effects on heart rate dynamics on a background of relatively persistent tone of sympathetic nervous system (SNS). Next day after applying cryopreserved CB NCs the TP indices reached the control values due to activation of both vegetative centers and humoral regulation component. Within the long-term observation (in a week and a month after CB NCs) we observed even stronger rise of TP at the background of the control values. Its growth resulted from an increased tone of sympathetic and parasympathetic nerve systems.

Thus, basing on our findings the administration of CB NCs preparation to animals with experimental AO presumably activates the autonomic centers, representing the highest level of autonomic nervous system, which is the most developed and rapid way to implement the effects of neurohumoral regulation.



Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови и фуллерена C₆₀ на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы крыс с некрозом миокарда

С.И. Панов, И.В. Белочкина, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Cryopreserved Cord Blood Serum and Fullerene C₆₀ on Indices of Prooxidant-Antioxidant System in Rats with Myocardial Necrosis

S.I. Panov, I.V. Belochkina, B.P. Sandomirsky

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

Поиск и совершенствование методов профилактики и терапии инфаркта миокарда остается одной из наиболее актуальных задач современной медицины. Среди биопрепаратов, стимулирующих регенеративно-пластические процессы, особое внимание уделяется криоконсервированной сыворотке кордовой крови (КСКК). Не меньший интерес вызывают фуллерены C₆₀ (C₆₀), что связано с их высокой антиоксидантной активностью. Использование терапевтического потенциала КСКК в сочетании с C₆₀ для коррекции постинфарктного состояния может быть результативным.

Цель исследования – определение показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности антиокислительных ферментов (АОФ) после применения КСКК и C₆₀ на фоне некроза миокарда у крыс.

Некроз миокарда (НМ) моделировали путем криовоздействия в течение 20 с на стенку левого желудочка (диаметр аппликатора 3 мм) [Слета И.В. и соавт., 2011]. Внутримышечно вводили КСКК в дозе 0,1 мл/кг массы тела раз в сутки, начиная со следующего дня после операции (пять инъекций в течение недели). Раствор C₆₀ вводили внутривенно, в суммарной дозе (три инъекции) 0,5 мг/кг массы тела раз в сутки ежедневно, начиная со дня операции. Животные с НМ были разделены на группы: 1 – контроль (НМ); 2 – НМ и введение C₆₀; 3 – НМ и КСКК; 4 – НМ, C₆₀ и КСКК. Интенсивность ПОЛ определяли по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), ТБК-активных продуктов, а также активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в сыворотке крови и ткани сердца на 7-, 14- и 28-е сутки после операции.

В группе контроля на 7-е сутки показатели ПОЛ были максимальны и превышали норму для ТБК-активных продуктов в 3,2 и 1,7 раза, для ДК – в 2,4 и в 1,5 раза в ткани миокарда и сыворотке соответственно. Активность каталазы и СОД была снижена соответственно в 1,9 и 1,6 раза в сыворотке и 2,4 и 1,8 раза в миокарде. Направленность изменений исследуемых показателей до 28-х суток во всех группах была сходной. Различия между группами обнаруживали по интенсивности изменений исследуемых показателей. В группе 4 значимое по сравнению с другими группами снижение уровня содержания продуктов ПОЛ как в сыворотке крови, так и ткани миокарда, и повышение активности АОФ наблюдали уже с 7-х суток после моделирования НМ, а нормализацию части показателей – к 14-м суткам.

Таким образом, комплексное применение КСКК и C₆₀ в первые дни после моделирования некроза миокарда способствует ускорению восстановления баланса показателей про- и антиоксидантной системы.

Search and improvement of the methods of preventing and treatment of myocardial infarction is one of the most urgent problems of current medicine. Among the biological products, stimulating the regenerative-plastic processes, a special attention is paid to cryopreserved cord blood serum (CCBS). No less interesting are the C₆₀ fullerenes (C₆₀), due to their high antioxidant activity. Using the CCBS therapeutic potential in combination with C₆₀ can be effective for the post-infarction state correction.

The purpose of this study was to determine the indices of lipid peroxidation (LPO) and the activity of antioxidant enzymes (AE) after applying the CCBS and C₆₀ on the background of myocardial necrosis in rats.

Myocardial necrosis (MN) was simulated by 20 second-long cryoexposure in the left ventricular wall (3 mm diameter applicator) [Sleta I.V. *et al.*, 2011]. CCBS was intramuscularly administered in a dose of 0.1 ml/kg body weight once a day starting from the next day after surgery (five injections in a week). The C₆₀ solution was intraperitoneally administered in a total dose (three injections) of 0.5 mg/kg of body weight once a day daily starting on the day of surgery. The animals with MN were divided into the groups: 1 – control (NM); 2 – NM and the introduction of the C₆₀; 3 – NM and CCBS; 4 – NM, C₆₀, and CCBS. The intensity of lipid peroxidation was determined by the content of diene conjugates (DC), TBA-active products, as well as the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase in blood serum and heart tissue to days 7, 14 and 28 after the surgery.

In the control group to day 7 the LPO indices were maximal and exceeded the norm in case of TBA-active products in 3.2 and 1.7 times, in case of DCs they were 2.4 and 1.5 times higher in myocardial tissue and serum, respectively. The activity of SOD and catalase was reduced respectively in 1.9 and 1.6 times in serum and in 2.4 and 1.8 times in myocardium.

The direction of changes in the studied indices till the day 28 in all the groups was similar. The groups differed by the intensity of the studied parameters changes. In group 4 the significant versus other groups reduction of LPO products in blood serum and myocardial tissue as well as an increased AE activity were observed starting from day 7 after NM modeling and the normalization of the part of the indices was found to day 14.

Thus, the combined application of CCBS and C₆₀ in the first days after experimental myocardial necrosis contributes to the restoration of the balance of the indices of pro- and antioxidant systems.



Характер распластывания и структура цитоскелета мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при культивировании на хитозановых матрицах

А.В. Кисель¹, В.В. Киروشка², Т.П. Бондаренко^{1,2}, В.А. Петрова³,
Ю.Г. Баклагина³, Д.Д. Черняков⁴, Ю.А. Скорик^{3,4}

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков

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

³Институт высокомолекулярных соединений РАН, Россия

⁴Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия

Character of Spreading and Cytoskeleton Structure of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cultured on Chitosan Scaffolds

A.V. Kisil¹, V.V. Kiroshka², T.P. Bondarenko^{1,2}, V.A. Petrova³,
Yu.G. Baklagina³, D.D. Chernyakov⁴, Yu.A. Skorik^{3,4}

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

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

³Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, Russia

⁴St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Russia

В настоящее время биополимерные матрицы на основе хитозана широко применяются в области тканевой инженерии. Микроструктура таких матриц – один из факторов, определяющих адгезивные характеристики, скорость пролиферации и направленность дифференцировки клеток. Цель данной работы – исследование характера распластывания, структуры цитоскелета и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) при культивировании на хитозановых матрицах (ХМ) с различной микроструктурой.

Для визуализации актинового цитоскелета МСК КМ после 2-х суток культивирования на ХМ использовали метод флуоресцентного окрашивания «TRITC-conjugated Phalloidin» («Sigma», США) в концентрации 1:1000. Форму и распластывание клеток при культивировании на ХМ оценивали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «AmScope XYL-403» (Китай). Пролиферацию клеток изучали на 1-е, 3-и и 5-е сутки культивирования с помощью МТТ-теста. Исследовали ХМ («Биопрогресс», Россия) следующих групп: А – выдержанные в вакууме при 60°C в течение 6-ти суток (солевая форма); В – без термообработки, обработанные 2%-м раствором аммония и переведенные в основную форму. Хитиновые матрицы обеих групп содержали частицы nano-chit в концентрации 1 и 5%. Частицы nano-chit размером 0,1–0,2 мм получали из фракции α -хитина.

Установлено, что показатель пористости ХМ группы А был значимо выше, чем группы В (0,286 и 0,583 на см³ соответственно). При введении в состав ХМ 5% nano-chit изменялась пористость ХМ. Так, в группе А этот показатель снижался до 0,173 на см³, тогда как в группе В повышался до 0,787 см³.

При культивировании на образцах ХМ (группа А – 5% nano-chit и группа В – 5% nano-chit) МСК КМ имели веретенообразную или фибробластоподобную форму, что характерно для культивирования данного типа клеток на пластике. Микрофиламенты актина были равномерно распределены по всему объему цитоплазмы. Следует отметить, что при культивировании на ХМ площадь распластывания и форма клеток группы В были сопоставимы с контролем. Установлено, что динамика роста МСК КМ на ХМ группы А и А – 5% nano-chit была ниже, чем на ХМ группы В и В – 5% nano-chit и пластике.

Таким образом, можно сделать вывод, что поведение в культуре МСК КМ на ХМ определяется микроструктурой субстрата.

Nowadays the chitosan-based biopolymer scaffolds are widely applied in tissue engineering. The microstructure of these matrices is one of the factors, determining adhesive characteristics, proliferation rate and direction of cell differentiation. The research objective was to study the character of spreading, cytoskeleton structure and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSCs) cultured on chitosan scaffolds (CS) with different microstructure.

To visualize actin cytoskeleton after 2 days of culture on CS the BM MSCs were stained with fluorescent TRITC-conjugated Phalloidin (Sigma, USA) in 1:1000 concentration. Cell shape and spreading during culture on CS were assessed with inverted fluorescent microscope (AmScope XYL-403). Cell proliferation was studied to days 1, 3 and 4 of culture with MTT-test. We studied the CS (Bioprogress, Russia) divided to the following groups: the group A comprised the specimens, exposed in vacuum at 60°C within 6 days (salt form); the group B consisted of scaffolds without thermal processing, treated with 2% ammonium solution and thereby transformed into the basic form. Chitosan scaffolds of both groups contained the nano-chit particles in 1 and 5% concentrations. The 0.1–0.2 mm nano-chit particles were procured from α -chitin fraction.

The CS porosity index in group A was established to be much higher, than in group B (0.286 and 0.583 per cm³, respectively). When introducing 5% nano-chit into the CS its porosity was changed. In group A this index reduced down to 0.173 per cm³, and in group B it increased up to 0.787 per cm³.

During culture on CS samples (groups A and B both with 5% nano-chit) the BM MSCs were of spindle or polygonal shape, typical for cells cultured on plastic. The actin microfilaments were uniformly distributed in the entire cytoplasm. Of note was the fact, that the spreading area and the shape of cultured cells of group B were close to the control indices. The dynamics of BM MSCs growth on CS in group A and group A with 5% nano-chit was lower than in the cells of group B and group B with 5% nano-chit or cultured on plastic.

Thus the behaviour of BM MSCs during culture on CS depends on a substrate microstructure.



Влияние низких температур на протекторное действие экстрактов плаценты человека по отношению к эритроцитам в условиях окислительного стресса

С.В. Нарожный, С.Л. Розанова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Low Temperature Influence on Human Placenta Extract Protective Action Towards Erythrocytes Against Oxidative Stress

S.V. Narozhnyi, S.L. Rozanova

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

Экстракт плаценты человека (ЭПЧ) в своем составе содержит большое количество веществ, являющихся антиоксидантами, что обуславливает перспективу их применения в клинической практике при лечении заболеваний, вызванных окислительными процессами.

Область клинического применения плаценты может быть расширена за счет использования криогенных технологий. Однако хранение различных биологических объектов при низких температурах может привести к модификации их свойств. Исходя из этого изучение антиоксидантного действия экстрактов плаценты в зависимости от температуры хранения является необходимым шагом для последующего внедрения их в клиническую практику.

Водно-солевые ЭПЧ получали из плацент (39 недель гестации) путем гомогенизации и последующей экспозиции с фосфатно-солевым буфером (ФСБ; pH 7,4). Эритроциты инкубировали с экстрактами (свежевыделенными и после замораживания-оттаивания) в течение часа, после чего отмывали от ЭПЧ. Далее суспензию эритроцитов инкубировали с перекисью водорода при 20°C в течение 30 мин. Затем образцы центрифугировали, процент гемолизовавшихся клеток измеряли по выходу гемоглобина, регистрируя поглощение на длине волны 540 нм. Уровень перекисного окисления липидов определяли по содержанию продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Вызванный действием перекиси уровень гемолиза значительно снижает (на 44%) ЭПЧ из свежей плаценты. Экстракты из плаценты, замороженной до -196 и -20°C, сохраняют свое протекторное действие, но при этом наблюдается снижение эффективности относительно свежеприготовленных экстрактов на 9 и 19% соответственно. Защитное действие экстрактов связано не только с присутствующей в них каталазой, но и с более низкомолекулярными компонентами, защитное действие которых, по-видимому, обусловлено взаимодействием их с мембраной.

Human placenta extract (HPE) is a rich resource of antioxidants that makes it prospective to be applied in clinical practice to treat oxidation-induced diseases. Cryogenic technologies could be used for widening the perspectives of placenta clinical application. However, the storage of various biological tissues in a frozen state can result in the modifications of their properties. Thus, the studying of placenta extracts antioxidant effect depending on a storage temperature is a mandatory step prior to their application.

Water-saline HPEs were obtained from placentas (39 weeks of gestation), by homogenizing and following exposure with phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4). Erythrocytes were incubated with the extracts (fresh or freeze-thawed) for 1 hr, afterwards the erythrocytes were washed of HPE. Then the suspension of erythrocytes was incubated with hydroperoxide at 20°C for 30 min. The samples were centrifuged and the percentage of hemolyzed cells was measured by hemoglobin release, recording an optical density at 540 nm. The level of lipid peroxidation was assessed by the products of reaction with thiobarbituric acid.

The extracts obtained from the fresh placenta significantly lowered the level of hemolysis caused by peroxide (down to 44%). The extracts obtained from placenta thawed after freezing down to -196°C and -20°C kept their protective action, however, their efficiency lowered by 9% and 19%, correspondingly, when comparing with the fresh placenta extracts. The HPE protective action could be stipulated either by the presence of catalase in them or lower molecular mass components, the protective effect of those can be conditioned by their interaction with membranes.



Влияние криоэкстракта плаценты на морфофункциональное состояние почек при экспериментальном нефрите Хеймана

А.М. Василькович, И.И. Кондаков, Н.В. Репин

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Placental Cryoextract on Morphofunctional State of Kidneys in Heymann Nephritis

A.M. Vaskovich, I.I. Kondakov, N.V. Repin

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

При оценке состояния кровообращения в почке важно учитывать разницу между функциональными и морфометрическими параметрами состояния кровообращения в нефронах. Известно, что в норме размеры корковых клубочков превышают размеры юкстамедуллярных, поскольку в почке существуют два круга кровообращения, главным из которых является корковый [Тареев Е.М., 1983].

Цель данной работы – изучение влияния введения криоэкстракта аллогенной плаценты (КЭП) на функциональные и морфометрические показатели почек крыс при экспериментальном нефрите Хеймана (НХ).

Исследования проводили на 35 нелинейных крысах-самцах 4-месячного возраста массой 220–250 г, которым для моделирования НХ интраперитонеально вводили гомогенат почек (1 мл гомогената на 100 г массы) под местной анестезией. Животные были разделены на 3 группы: 1 – интактные; 2 – с моделью НХ; 3 – с моделью НХ, которым 3 раза в течение недели внутримышечно вводили 0,5 мл КЭП, начиная с 28-х суток после иммунизации. Животных групп 2 и 3 выводили из эксперимента на 45- и 60-е сутки. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна-Уитни.

На 45-е сутки после введения КЭП у животных группы 3 улучшались функциональные показатели по сравнению с группой 2: снижение уровня креатинина в крови с $(62,3 \pm 6,1)$ до $(47,5 \pm 5,2)$ мкмоль/л, увеличение показателя креатинина мочи с $(3,2 \pm 0,4)$ до $(3,95 \pm 0,3)$ ммоль/л и скорости клубочковой фильтрации (СКФ) – с $(0,42 \pm 0,04)$ до $(0,92 \pm 0,05)$ мл/мин. На 60-е сутки выявлено снижение уровня креатинина крови с $(63 \pm 0,5)$ до $(28 \pm 2,5)$ мкмоль/л и креатинина мочи с $(3,75 \pm 0,9)$ до $(2,9 \pm 0,32)$ ммоль/л, а также увеличение СКФ с $(0,49 \pm 0,06)$ до $(0,98 \pm 0,05)$ мл/мин по сравнению с животными группы 2.

Морфометрический анализ показал существенные различия размеров клубочков в динамике НХ. До введения КЭП площадь корковых клубочков составляла (9462 ± 1845) при норме (8887 ± 1679) мкм². После введения КЭП на 45-е сутки эксперимента отмечалось значимое уменьшение размеров юкстамедуллярных клубочков с (9049 ± 1972) до (7700 ± 1582) мкм², что не отличалось от нормы. На 60-е сутки эксперимента у животных группы 3 выявлено увеличение размеров корковых и юкстамедуллярных клубочков до (8456 ± 1605) и (8977 ± 1890) мкм² соответственно по сравнению с животными группы 2, у которых эти показатели составляли (8050 ± 889) и (8346 ± 1566) мкм².

Таким образом, введение криоэкстракта при сформировавшемся НХ может приостановить дальнейшее его прогрессирование, а также устранить нарушение почечного кровотока в корковых клубочках.

When assessing the blood flow in kidney it is important to consider the difference between functional and morphometric parameters of blood circulation in nephrons. Normally the sizes of cortical glomeruli are known to exceed those of juxtamedullary ones, since there are two circulations in kidney, and the cortical one is principal [Tareyev E.M., 1983].

The research aim was to study the effect of introduction of allogeneic placental cryoextract (PCE) on functional and morphometric indices of rat kidneys in experimental Heymann nephritis (HN).

Studies were performed in 35 4-month-old outbred male rats weighing 220–250 g. The animals were treated intraperitoneally with renal homogenate (1 ml of homogenate per 100 g of weight) under local anesthesia to simulate HN. Animals were divided into 3 groups: group 1 comprised the intact animals; group 2 consisted of those with experimental HN; group 3 included those with experimental HN injected with 0.5 ml of PCE intramuscularly 3 times within a week starting from day 28 after immunization. The animals of groups 2 and 3 were sacrificed to days 45 and 60.

To day 45 after PCE administration, the functional indices in animals of group 3 were improved as compared to group 2: creatinine level in blood decreased from (62.3 ± 6.1) down to (47.5 ± 5.2) $\mu\text{mol/l}$; urine creatinine increased from (3.2 ± 0.4) up to (3.95 ± 0.3) mmol/l and glomerular filtration rate (GFR) changed from (0.42 ± 0.04) up to (0.92 ± 0.05) ml/min . To day 60 we revealed a decrease in blood creatinine level from (63 ± 0.5) down to (28 ± 2.5) $\mu\text{mol/l}$ and urine creatinine from (3.75 ± 0.9) down to (2.9 ± 0.32) mmol/l , as well as the GFR augmentation from (0.49 ± 0.06) up to (0.98 ± 0.05) ml/min as compared with animals of group 2.

Morphometric analysis demonstrated significant differences in glomerular sizes in the course of HN development. Prior to PCE introduction the area of cortical glomeruli was $(9,462 \pm 1,845)$ while the norm was $(8,887 \pm 1,679)$ μm^2 . After PCE introduction to day 45 of the experiment we observed a significant reduction in sizes of juxtamedullary glomeruli from $(9,049 \pm 1,972)$ down to $(7,700 \pm 1,582)$ μm^2 , that did not differ from the norm. To day 60 of the experiment the animals of group 3 had an increase in sizes of cortical and juxtamedullary glomeruli up to $(8,456 \pm 1,605)$ and $(8,977 \pm 1,890)$ μm^2 , respectively, as compared with the animals of group 2 with the indices of $(8,050 \pm 889)$ and $(8,346 \pm 1,566)$ μm^2 .

Thus, the cryoextract administration during the HN may slow down its further progress, as well as eliminate the disorder of renal blood flow in cortical glomeruli.



Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения на клетки головного мозга новорожденных крыс в модели глутамат-индуцированной токсичности

О.В. Чуб, М.В. Шевченко, В.Ю. Прокопюк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Neuroprotective Effect of Placental Factors in Model of Glutamate Induced Toxicity in Newborn Rat Brain Cells

O.V. Chub, M.V. Shevchenko, V.Yu. Prokopyuk

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

Глутамат-опосредованная токсичность является одним из механизмов повреждения нейронов при различных заболеваниях, в частности ишемии, травмах головного мозга и нейродегенеративных патологиях [Coyle J.T., Puttfarcken P., 1993]. Ранее было показано нейропротекторное действие эстрогена, мезенхимальных стволовых клеток, жировой ткани, экстракта плаценты на нейроны, состоящее в сокращении количества поврежденных клеток головного мозга в результате токсического инсульта [Brinton R.D. *et al.*, 2000].

Целью работы явилось изучение влияния факторов плацентарного происхождения на метаболическую активность клеток головного мозга новорожденных крыс в модели глутамат-индуцированной токсичности.

В работе использовали модель глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга (КГМ) новорожденных крыс. Клетки повреждали путем инкубации с 10 мМ глутамата в течение суток. До и после инкубации с глутаматом КГМ культивировали в среде DMEM, кондиционированной с факторами плацентарного происхождения (ФПП): мезенхимальными стволовыми клетками плаценты, эксплантом плаценты (50 мг эксплантов плаценты инкубировали в 10 мл среды DMEM в течение суток) или обогащенным 10% экстрактом плаценты (гомогенизировали ткань плаценты в 0,9% NaCl (1:2) и центрифугировали при 7 000g в течение 10 мин). В другой серии экспериментов компоненты сред инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 95°C. Метаболическую активность клеток оценивали по МТТ-тесту. Контролем были клетки, которые культивировали в среде DMEM без добавок.

После инкубации КГМ с глутаматом метаболическая активность клеток составляла ~20% от контроля. При культивировании в средах с ФПП метаболическая активность нативных клеток увеличивалась на 20–30%. При культивировании сред с ФПП до обработки клеток глутаматом отмечалось значительное нейропротекторное действие, метаболическая активность восстанавливалась до 60–95%. Культивирование с ФПП после обработки глутаматом приводило к восстановлению метаболической активности до 40–43%, т. е. нейропротекторное действие было менее выраженным. Инактивированные нагреванием среды с ФПП не оказывали влияния на метаболическую активность как нативных КГМ, так и в модели глутамат-индуцированной токсичности.

Таким образом, среды с ФПП характеризуются нейропротекторным и терапевтическим действием. Более эффективным является применение сред с ФПП до повреждающего действия глутамата. Факторы плацентарного происхождения, характеризующиеся нейропротекторным действием, являются термолabile.

Glutamate-mediated toxicity is an important mechanism of neuronal death in various pathologic conditions including ischemia, trauma, and neurodegenerative disorders [Coyle J.T., Puttfarcken P., 1993]. Estrogen, mesenchymal stem cells, adipose tissue, placental extract on neurons rendered neuroprotective effects, consisting in decreased number of damaged brain cells following toxic insult [Brinton R.D. *et al.*, 2000].

The research aim was to study the influence of placental factors on metabolic activity of newborn rat brain cells in the model of glutamate-induced toxicity.

We used a model of glutamate-induced toxicity of newborn rat brain cells (BCs) in the research. The BCs were incubated with 10 mM glutamate for 1 day. Prior to and after incubation with glutamate the BCs were cultured in DMEM conditioned with placental factors (PFs), *i. e.* placental mesenchymal cells, placental explants (50 mg of placental explants were incubated with 10 ml of DMEM for 1 day) or the medium enriched with 10% placental extract (placental tissue was homogenized with 0.9% NaCl (1:2) and centrifuged at 7000 g for 10 min). In other experiments the medium components were inactivated by heating for 10 min at 95°C. Metabolic activity of the cells was assessed using MTT assay. The cells cultured in DMEM without additives were used as the control.

After incubation of the BCs with glutamate a metabolic activity of the cells was about 20% of the control. When culturing in the media with PFs the metabolic activity of native cells increased by 20–30%. When culturing the media with PFs prior to glutamate treatment there was observed a significant neuroprotective effect, metabolic activity was recovered up to 60–95%. Culturing with PFs after glutamate treatment resulted into recovery of metabolic activity up to 40–43%, *i. e.* neuroprotective effect was less expressed. Heat-inactivated media with PFs did not affect metabolic activity of both native BCs and in the model of glutamate-induced toxicity.

Thus the media with PFs are characterised by neuroprotective and therapeutic effect. Application of media with PFs was more effective prior to damaging effect of glutamate. Placental factors possessing a neuroprotective effect are thermolabile.



Морфологические и биохимические характеристики овариальной ткани при разных режимах криоконсервирования

И.А. Трутаева, В.В. Киروشка, Т.М. Гурина, Т.П. Бондаренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological and Biochemical Features of Ovarian Tissue at Various Cryopreservation Modes

I.A. Trutaieva, V.V. Kiroshka, T.M. Gurina, T.P. Bondarenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

В настоящее время трансплантация криоконсервированной овариальной ткани является одной из наиболее перспективных технологий восстановления репродуктивной и эндокринной функции у женщин при патологиях яичников различного генеза. Эффективность данной технологии остается низкой, что связано с повреждением структуры ткани в процессе замораживания-оттаивания, поэтому оптимизация протоколов криоконсервирования является актуальной задачей.

Цель работы – исследование морфологической структуры овариальной ткани и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) при разных режимах криоконсервирования.

Объектом исследования служили фрагменты овариальной ткани крыс. В качестве криопротектора (КП) использовали 1,2-пропандиол (1,2-ПД) и диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрациях 1,5 и 3 М в среде ДМЕМ, дополненной 200 мМ сахарозы. Инкубацию ткани в растворе КП проводили при 22°C в течение 30 мин. Замораживание ткани яичника осуществлялось следующим образом: режим 1 – от 22 до –40°C со скоростью 1 град/мин с последующим погружением в жидкий азот, без использования процесса инициации кристаллообразования (ИК); режим 2 – от 22°C до температуры ИК со скоростью 2 град/мин, затем проводили ИК с последующим охлаждением образцов до –40°C со скоростью 2 град/мин и погружением в жидкий азот. Температура начала ИК зависит от вида КП и его концентрации. Оттаивание осуществляли на водяной бане при 37°C. Удаление КП проводили поэтапно с заменой среды криоконсервирования на среду ДМЕМ + маннит. Морфологические исследования проводили на срезах ткани толщиной 0,5–1 мкм, окрашенных толуидиновым синим. Интенсивность ПОЛ оценивали по концентрации продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой.

Показано, что морфологическая структура овариальной ткани и интенсивность процессов ПОЛ определялись концентрацией и типом используемого КП. Так, при криоконсервировании в 1,5 М растворах КП были отмечены различия сохранности структуры ткани в зависимости от типа КП. Использование 1,2-ПД приводило к дефрагментации ядра, повреждениям ядерной мембраны, выходу белков в перивителлиновое пространство, а применение 1,5 М ДМСО – к сохранности структуры ядра ооцита, целостности *zona pellucida* и контактов между клетками гранулезы и ооцита. Концентрация продуктов ПОЛ при использовании 1,2-ПД была значимо выше, чем после применения ДМСО. Увеличение концентрации КП до 3 М повышало уровень сохранности фолликулов до 80–90%. При этом концентрация продуктов ПОЛ оставалась в пределах нормы. Следует отметить, что уровень морфологической целостности ткани не зависел от программы замораживания для всех КП.

Now the transplantation of cryopreserved ovarian tissue is one of the most promising technologies to recover the reproductive and endocrine functions in women with ovarian pathologies of various origins. The efficiency of this technology has remained low, which is associated with damages of tissue structure occurring during freeze-thawing, so the optimizing the cryopreservation protocols is an urgent task. The research objective was to study the morphological structure of ovarian tissue and intensity of lipid peroxidation (LPO) following cryopreservation according various regimens.

The research objects were the fragments of ovarian tissue. Cryoprotective agents (CPA) were 1,2-propanediol (PROH) and dimethyl sulfoxide (DMSO) in the concentrations of 1.5 and 3 M in DMEM supplemented with 200 mM sucrose. The tissue was incubated in CPA solution at 22°C for 30 min. Ovarian tissue was frozen according the following programs: regimen 1 – from 22 down to –40°C with the rate of 1 deg/min with following plunging into liquid nitrogen without using the process of crystal formation initiation (CFI); regimen 2 – from 22°C down to the temperature of CFI with the rate of 2 deg/min and following plunging into liquid nitrogen. The temperature of CFI depended on CPA type and its concentration. Thawing was performed in a water bath at 37°C. The CPA was removed stepwise replacing the cryopreservation medium to DMEM + mannitol. Morphological studies were performed in tissue sections of 0.5–1 mm thickness, stained with toluidine blue. The intensity of lipid peroxidation was assessed by the concentration of the reaction products with thiobarbituric acid.

It has been shown that the morphological structure of ovarian tissue and intensity of lipid peroxidation processes depended on the concentration and type of the used CPA. Cryopreservation in 1.5 M CPA solutions resulted in different preservation of tissue structure depending on the CPA type. The use of PROH led to the nucleus defragmentation, damage of nuclear membrane, release of proteins into the perivitelline space; the use of 1.5 M DMSO resulted in preservation of the oocyte nucleus structure, integrity of *zona pellucida* and contacts between the oocyte and granulosa cells. The concentration of LPO products after using PROH was significantly higher than in case of DMSO. Higher CPA concentration (3 M) increased the preservation rate of the follicles up to 80–90%. The concentration of LPO products remained within the normal range. It should be noted that the level of morphological tissue integrity is not dependent on the freezing program for all the CPAs.

Thus, the maximum preservation of tissues under the studied conditions was achieved by increasing the concentration of CPA (DMSO or PROH) from 1.5 to 3M.

Сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток надпочечников неонатальных животных

О.Ю. Новикова^{1,2}, Е.М. Плаксина², О.С. Сидоренко², А.А. Лаврик¹, Г.А. Божок², Т.П. Бондаренко²

¹ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

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

Comparative Morphological Characteristics of Primary Cultures of Neonatal Animal Adrenal Cells

O.Yu. Novikova^{1,2}, E.M. Plaksina², O.S. Sidorenko², A.A. Lavrik¹, G.A. Bozhok², T.P. Bondarenko²

¹Public Joint-Stock Company Pharmstandard-Biolik, Kharkiv, Ukraine

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

В период эмбриогенеза мозговое вещество надпочечников формируется из клеток, которые являются симпатoadренальными производными нервного гребня. Ранее была показана возможность выделения и культивирования симпатoadренальных прогениторных клеток из надпочечников взрослых млекопитающих (быка, мыши). Особенностью таких культур было формирование флотирующих или прикрепленных цитосфер, клетки которых были способны дифференцироваться в нейроны.

Цель данной работы – сравнительная морфологическая характеристика первичных культур клеток, полученных из надпочечников неонатальных животных (свиньи, кролика, мыши, крысы).

Клеточную суспензию получали ферментативным методом из надпочечных желез животных. Клетки высевали в концентрации $1-2 \times 10^5$ кл/мл и культивировали при 37°C в атмосфере с $5\% \text{CO}_2$ в стандартных (адгезивных) условиях на среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки. Также была исследована возможность получения культур на низкоадгезивных подложках.

Культуры, полученные в стандартных условиях из надпочечников поросят и кроликов, формировали монослой из фибробластоподобных клеток. На 5–7-е сутки на монослой образовывались прикрепленные цитосферы, из которых при дальнейшем культивировании выселялись нейробластоподобные клетки, способные давать длинные отростки и «нейрональные сети». В культурах клеток надпочечников мышей и крыс в стандартных условиях не формировались монослой и цитосферы. Культура представляла собой прикрепленные одиночные клетки округлой формы. При культивировании клеток надпочечников поросят на низкоадгезивной подложке на 5-е сутки были получены флотирующие цитосферы. При перенесении на адгезивную подложку цитосферы прикреплялись, и из них выселялись клетки нейробластоподобной морфологии. В культуре клеток надпочечников кроликов в условиях низкой адгезии цитосферы формировались, однако у них отсутствовала способность к дифференцировке в нейробластоподобные клетки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что первичные клеточные культуры неонатальных надпочечников свиньи, кролика, мыши, крысы имеют различные морфологические характеристики, возможно, связанные с видовыми или онтогенетическими особенностями млекопитающих. Для получения симпатoadренальных прогениторных клеток, растущих в виде цитосфер, необходима разработка различных подходов, учитывающих видовые особенности животных.

During embryogenesis, the adrenal medulla is formed from the cells, being sympathetic-adrenal derivatives of neural crest. Previously there was demonstrated the possibility to isolate and culture the sympathetic-adrenal progenitor cells from adrenal glands of adult mammals (bull, mouse). The peculiarity of these cultures was the formation of either floating or attached cytospheres, the cells of which were capable to differentiate into neurons.

The research aim was to make a comparative morphological analysis of primary cultures of cells, derived from neonatal animal adrenal glands (pig, rabbit, mouse, rat).

Cell suspensions were derived from animal adrenal glands using the enzymatic method. Cells were seeded in $1-2 \times 10^5$ cells/ml concentration and cultured at 37°C in $5\% \text{CO}_2$ atmosphere under the standard (adhesive) conditions in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The possibility to obtain the cultures on low adhesive surfaces was also studied.

The cultures, derived under the standard conditions from pig and rabbit adrenal glands formed the monolayer consisting of fibroblast-like cells. To days 5–7 the attached cytospheres were formed on the monolayer. During further culture we observed the neuroblast-like cells migration from the spheres, which produced long processes and 'neural networks'. Under the standard conditions neither monolayer nor cytospheres were formed in cell cultures of murine and rat adrenal glands. The cultures were represented by attached single round-shaped cells. In the culture of piglet adrenal cells on a low adhesive surface the floating cytospheres were obtained to day 5. After being transferred to adhesive surface the cytospheres were attached, and the cells with neuroblast-like morphology migrated from them. The cytospheres were formed in rabbit adrenal cell culture under low adhesion conditions, but no signs of neuroblast-like cells were observed there.

Our findings testify to the fact, that the primary cell cultures of pig, rabbit, murine and rat neonatal adrenal glands have different morphological characteristics, likely associated either with species or ontogenetic peculiarities of mammals. In order to obtain the sympathetic-adrenal progenitor cells forming the cytospheres it is necessary to find different approaches taking into account species peculiarities of animals.



Морфологические характеристики первичных культур клеток спинномозговых узлов неонатальных кроликов

С.Г. Али^{1,2}, А.А. Лаврик², Г.А. Божок²

¹ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

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

Morphological Characteristics of Primary Cultures of Neonatal Rabbit Dorsal Root Ganglia Cells

S.G. Ali^{1,2}, A.A. Lavrik¹, G.A. Bozhok²

¹Public Joint-Stock Company Pharmstandard-Biolik, Kharkiv, Ukraine

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

Прогениторные клетки – производные нервного гребня (ПНГ) – присутствуют в центральной нервной системе в постнатальном периоде и обеспечивают пластичность нервной ткани в физиологических и патологических условиях. Результаты исследований, проведенных на половозрелых животных, свидетельствуют о возможности получения ПНГ из спинномозговых узлов (СУ) *in vitro* при культивировании. Одним из свойств подобных культур является формирование цитосфер, клетки которых дифференцируются в нейрональном и глиальном направлениях. Нами была предпринята попытка получения культуры клеток из СУ неонатальных животных, содержащей ПНГ-образованные цитосферы.

Цель данной работы – сравнительное изучение морфологических особенностей культур клеток СУ неонатальных кроликов, полученных в обычных и низкоадгезивных условиях.

Клеточную суспензию получали из СУ ферментативным методом. Клетки высевали в концентрации 5×10^5 кл/мл и культивировали в чашках Петри при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в разных условиях: 1 – на адгезивной поверхности в бессывороточной среде, приготовленной на основе DMEM с добавлением 2% B27, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF; 2 – на адгезивной поверхности в среде DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (ФТС); 3 – на низкоадгезивной поверхности в среде DMEM с 10% ФТС.

В первом случае формировались флотирующие цитосферы уже на 4-е сутки. В дальнейшем их размер незначительно увеличивался. При перенесении таких цитосфер в среду с 10% ФТС образовывался монослой из фибробластоподобных клеток, на котором появлялись нейробластоподобные клетки и прикрепленные колонии, состоящие из округлых клеток. Во втором случае на 3-и сутки образовывался монослой фибробластоподобных клеток, на котором различались скопления округлых клеток, формирующих длинные отростки. В третьем случае формировались как флотирующие, так и прикрепленные цитосферы. При переносе флотирующих цитосфер в среду с 10% ФТС они прикреплялись, формируя монослой из фибробластоподобных клеток, на котором различались два типа клеток: мелкие веретеновидные и эпителиоидные с хорошо различимым ядром с ядрышками. Из прикрепленных цитосфер выселялись нейробластоподобные клетки.

Установленные различия морфотипов клеток, образующихся в культуре клеток СУ, позволяют сделать вывод о том, что состав среды и степень адгезивности поверхности являются факторами, определяющими клеточный состав получаемых первичных культур.

Progenitor cells being the neural crest derivatives (NCD) are present in the central nervous system in the postnatal period and provide plasticity of neural tissue in physiological and pathological conditions.

The findings of the researches performed in adult animals, indicate the possibility of obtaining the NCD from spinal ganglion (SG) *in vitro* by their culturing. One of the properties of these cultures is the formation of cytospheres, the cells of those differentiate into neuronal and glial lineages. We attempted to obtain a cell culture containing APG-formed cytospheres from SG of neonatal animals.

The aim of the presented research was to compare the morphological features of neonatal rabbit SG cell cultures obtained under normal and low adhesive conditions.

The cell suspension was derived from SG by enzymatic method. Cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/ml and cultured in Petri dishes at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ under different conditions: 1 – on an adhesive surface in serum-free DMEM supplemented with 2% B27, 20 ng/ml bFGF; 2 – on an adhesive surface in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS); 3 – on a low-adhesive surface in DMEM with 10% FCS.

In the first case the formation of floating cytospheres has been found already to day 4. Later their sizes were slightly increased. When transferring these cytospheres into the medium with 10% FBS a monolayer was formed of fibroblast-like cells, thereafter neuroblast-like cells and the adhered colonies consisting of roundish cells appeared on the monolayer. In the second case a monolayer of fibroblast-like cells was formed to day 3 with the aggregates of roundish cells forming the long processes. In the third case, both floating and adherent cytospheres were formed. Following the transfer of the floating cytospheres to the medium with 10% FBS they adhered and formed the monolayer of fibroblast-like cells with two types of cells on it: small spindle-like one and epithelioid cells with a well-defined nucleus and nucleoli. The neuroblast-like cells migrated from the adhered cytospheres.

The discovered differences of cell morphotypes formed in the culture of SG cells suggest that the medium composition and the surface adherability are the factors determining the cell populations in the resulting primary cultures.



**Исследование количественного и качественного состава
низкомолекулярных веществ белково-пептидной природы
из личинок *Tenebrio molitor* до и после холодной акклимации**

Д.В. Третьяк, А.К. Гулевский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Study of Quantitative and Qualitative Composition of Low-Molecular Protein-Peptide
Compounds of *Tenebrio molitor* Larvae before and after Cold Acclimation**

D.V. Tretyak, A.K. Gulevsky

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

Холодоустойчивые биологические виды способны приспосабливаться к низким температурам благодаря молекулярным механизмам адаптации, которые они приобрели в процессе эволюции, в частности, синтезу и аккумуляции специфических белков (антифризные белки, белки-нуклеаторы) и низкомолекулярных криозащитных веществ (сахара, полиолы). Также известно, что процесс адаптации биообъектов к низким температурам связан со структурными модификациями белков и качественными изменениями белкового спектра. Наряду с этим вызывает интерес исследования пептидного профиля холодоустойчивых организмов при холодной адаптации, поскольку пептиды могут выступать не только как продукты метаболизма белков, но и как регуляторные биомолекулы, изменяющие качественный профиль синтезируемых белков, а также – как антифризные молекулы.

Цель работы – исследование белково-пептидного состава супернатантов из личинок *Tenebrio molitor* до и после холодной акклимации.

В работе использовали неакклимированных и акклимированных при 5...7°C в течение 3-х недель личинок *T. molitor*. Для получения белков и пептидов личинок гомогенизировали в 0,6% растворе NaCl на 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением ингибитора сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторида. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1800g. Надосадочную жидкость центрифугировали в течение 60 мин при 100 000g. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда. Количественную и качественную оценку белково-пептидного состава супернатантов из личинок *T. molitor* проводили с помощью метода гель-проникающей хроматографии с использованием колонки, заполненной поливиниловым гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40. Фракции идентифицировали при длине волны 280 нм.

Установлено, что наибольшее количество пептидных фракций имеют супернатанты из неакклимированных личинок *T. molitor*. Показано, что у холодоакклимированных личинок *T. molitor* наблюдаются низкомолекулярные пептидные фракции с м. м. от (540 ± 20) до (2255 ± 85) Да, а у неакклимированных особей отмечается значительное количество высокомолекулярных пептидов с м. м. от (4675 ± 225) до (6595 ± 550) Да. Состав белково-пептидных веществ супернатантов из акклимированных к холоду и неакклимированных личинок отличается, в частности, после холодной акклимации *T. molitor* отмечается уменьшение количества пептидов с м. м. (2255 ± 85) и (1525 ± 115) Да в 8 и в 2,3 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в процессе холодной адаптации происходит количественное и качественное изменение спектра белково-пептидных веществ, что может быть одним из механизмов естественной адаптации личинок *T. molitor* к охлаждению.

Cold-tolerant biological species are able to adapt to low temperatures due to the molecular adaptation mechanisms, which they have acquired in the course of evolution, in particular the synthesis and accumulation of specific proteins (antifreeze proteins, ice-nucleating proteins) and low-molecular cryoprotective substances (sugars, polyols). It is also known that the biological object adaptation to low temperatures is related to the qualitative changes in protein spectrum. In addition, it is of interest to study the peptide profile of cold-tolerant organisms during cold adaptation, as the peptides can act not only as the products of protein metabolism, but also as regulatory biomolecules, changing the qualitative composition of the synthesized proteins as well as to act as antifreeze molecules. The aim of the research was to investigate the protein-peptide composition of supernatants derived from *Tenebrio molitor* larvae before and after cold acclimation.

The studies were carried out in non-acclimated and acclimated at 5...7°C for 3 weeks *T. molitor* larvae. To isolate the proteins and peptides, the larvae were homogenized in 0.6% NaCl in 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4 supplemented with serine protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenates were centrifuged for 10 min at 1,800g. The supernatant was centrifuged for 60 min at 100,000g. The protein concentration was determined by the Bradford method. The quantitative and qualitative analysis of protein-peptide composition of supernatants of *T. molitor* larvae was performed using the gel-permeation chromatography in the column filled with polyvinyl gel TSK-Gel Toyopearl HW-40. The fractions were identified at a wavelength of 280 nm.

The supernatants from non-acclimated *T. molitor* larvae were established to have the largest number of peptide fractions. It was shown that cold-acclimated *T. molitor* larvae had the low-molecular peptide fractions with the molecular weights from 540 ± 20 to 2,255 ± 85 Da, and non-acclimated insects had high-molecular peptides with the molecular weights from 4,675 ± 225 to 6,595 ± 550 Da. The protein-peptide compositions of supernatants from cold-acclimated and non-acclimated larvae differed quantitatively, in particular, the number of peptides with the molecular weights of 2,255 ± 85 and 1,525 ± 115 Da decreased by 8 and 2.3 times after cold acclimation of *T. molitor*.

Thus, as a result of the performed studies it has been found that during cold adaptation the quantitative and qualitative changes in the spectrum of protein-peptide compounds which may be one of the mechanisms of the natural adaptation of *T. molitor* larvae to cooling occurred.



Термомеханический анализ кластерной кристаллизации водных растворов полиэтиленгликоля с м. м. 1500

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий, Т.М. Гурина
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Thermomechanical Analysis of Cluster Crystallization of PEG-1500 Aqueous Solutions

S.S. Sevastianov, A.I. Osetsky, T.M. Gurina
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Согласно представлениям о природе кластерной кристаллизации криопротекторных растворов [Осецкий А.И., 2011, 2014] наиболее интенсивное образование частиц кластерной фазы протекает в интервале температур ($T_g; T_g + \Delta T$), где T_g – температура расстеклования аморфной фракции, а величина ΔT зависит от вида криопротекторного вещества и находится в пределах 5–30 градусов. Именно в этом интервале температур кинетику кластерной кристаллизации исследовать классическими методами – дифференциальным термическим анализом, дифференциальной сканирующей калориметрией, сканирующей объемной dilatометрией – наиболее сложно. Поэтому полученные результаты имеют неоднозначную трактовку.

В связи с этим в настоящей работе при исследовании данного интервала температур был использован метод термомеханического анализа. Основные преимущества метода основаны на том факте, что при концентрациях криопротекторного вещества C_B больше некоторого значения C_{B^*} скорость пластического течения $\dot{\epsilon}$ исследуемых образцов при постоянной внешней нагрузке r при $T > T_g$ подчиняется закону течения ньютоновской жидкости:

$$\dot{\epsilon} = \frac{r \cdot \sigma}{\eta} = \sigma \cdot A \cdot \exp\left(\frac{-Q}{k \cdot T}\right),$$

где η – динамическая вязкость аморфной фракции; Q – энергия активации вязкости; k – постоянная Больцмана; r, A – коэффициенты, зависящие от физико-химических свойств образцов и условий проведения эксперимента.

Согласно формуле, даже незначительные изменения температуры расстеклования аморфной фракции, возникающие при образовании или плавлении частиц кластерной фазы, влияют на скорость пластического течения и, как следствие, на вид термопластических кривых.

Данный факт был использован при изучении кластерной кристаллизации водных растворов полиэтиленгликоля с м. м. 1500. Впервые показано, что частицы кластерной фазы образуются сразу после расстеклования аморфной фракции. При этом они могут образовываться как на основе микрокристаллов льда (при $C_B < C_{g_0}$), так и микрокристаллов криопротекторного вещества (при $C_B > C_{g_0}$). Полученные экспериментальные данные позволяют построить полную диаграмму состояний водных растворов полиэтиленгликоля с м. м. 1500 и установить концентрационные и температурные интервалы протекания фазовых превращений при их охлаждении-нагреве. Определение данных интервалов необходимо для установления требуемых скоростей охлаждения-нагрева биообъектов в процессе оптимизации многоэтапных режимов их криоконсервирования.

According to the notions about the nature of cluster crystallization of cryoprotective solutions [Osetsky A.I., 2011, 2014] the most intensive formation of the cluster phase particles occurs within the temperature range ($T_g; T_g + \Delta T$), where T_g – devitrification temperature of the amorphous fraction, and the value ΔT depends on the type of cryoprotective agent and is within the range of 5–30 degrees. Nevertheless, this temperature range is very challenging to explore the kinetics of cluster crystallization using only traditional methods: DTA, DSC, volumetric scanning dilatometry. As a result the interpretation of the results meets certain ambiguity.

In this regard, the present work applied the thermomechanical analysis when studying the above-mentioned temperature range. The main advantages of the method are based on the fact that at concentrations of cryoprotective agents C_B exceeding a certain value C_{B^*} the plastic flow velocity $\dot{\epsilon}$ of the samples follows the law of Newtonian fluid flow under a constant external load r at $T > T_g$:

$$\dot{\epsilon} = \frac{r \cdot \sigma}{\eta} = \sigma \cdot A \cdot \exp\left(\frac{-Q}{k \cdot T}\right),$$

where η – dynamic viscosity of the amorphous fraction; Q – viscosity activation energy; k – Boltzmann constant; r, A – coefficients depending on the physico-chemical properties of the samples and experimental conditions.

According to the formula, even slight changes of devitrification temperature of the amorphous fraction, appearing during the formation or melting of cluster phase particles, influence the plastic flow velocity and, as a consequence, the appearance of thermoplastic curves.

This fact was used when investigating the cluster crystallization of PEO-1500 aqueous solutions. For the first time it has been shown that the cluster phase particles start to form immediately after the devitrification of the amorphous fraction. Herewith they may be formed both on the basis of the ice microcrystals (at $C_B < C_{g_0}$) as well as on the basis of cryoprotective agents microcrystals (at $C_B > C_{g_0}$). The obtained experimental data allow to build a complete state diagram of aqueous solutions of PEO-1500 and to establish the concentration and temperature intervals of phase transformations during their cooling/heating. The determination of these intervals is necessary to establish the required rate of cooling/heating of biological objects and optimize the process of multi-step cryopreservation.



Постгипертонический лизис эритроцитов человека в присутствии хлорпромазина

Е.А. Семионова¹, Н.А. Ершова²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Posthypertonic Lysis of Human Erythrocytes in Chlorpromazine Presence

E.A. Semionova¹, N.A. Ershova²

¹V.N. Karazin Kharkiv National University

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

При отогреве замороженного биологического материала на клетки могут оказывать повреждающее действие различные факторы, особая роль среди которых отводится изменению осмоляльности среды. Модель постгипертонического лизиса (ПГЛ) позволяет изучать влияние данного фактора на эритроциты. Ранее был показан антигемолитический эффект хлорпромазина (ХПР) в условиях гипертонического шока, гипертонического криогемолиза и гипотонического лизиса эритроцитов человека [Орлова Н.В., Шпакова Н.М., 2006; Шпакова Н.М., 2014].

Цель работы – изучение влияния ХПР на чувствительность эритроцитов человека к действию ПГЛ. В работе использовали метод спектрофотометрии и световой микроскопии. Постгипертонический лизис осуществляли перенесением эритроцитов из среды дегидратации (1,45 моль/л NaCl) в среду регидратации (0,15 моль/л NaCl) при температурах 37 и 0°C. Клетки вносили в среды, содержащие ХПР на разных этапах эксперимента: дегидратации, регидратации и этапе, предшествующем действию ПГЛ (предобработка).

Показано, что уровень гемолиза эритроцитов, перенесенных из 1,45 в 0,15 моль/л NaCl, составляет ~70%. В условиях ПГЛ были получены зависимости гемолиза эритроцитов человека от концентрации ХПР (60–600 мкмоль/л). Для оценки эффективности ХПР были рассчитаны величины максимальной антигемолитической активности и значения эффективных концентраций. Хлорпромазин проявляет антигемолитический эффект в условиях ПГЛ при 0°C, но не при 37°C. Максимальная антигемолитическая активность ХПР в концентрации 600 мкмоль/л составляет 70%. С помощью световой микроскопии изучали влияние ХПР на эритроциты, которые были подвергнуты действию ПГЛ при 0°C. При использовании ХПР (600 мкмоль/л) было выявлено уменьшение количества клеток в результате нагревания образца (со скоростью 1 град/мин). При достижении температуры 24°C целые клетки в поле зрения отсутствовали. В том случае, когда использовали ХПР в концентрации 180 мкмоль/л, повышение температуры до 34°C не приводило к гибели клеток.

Для выяснения возможного механизма защитного действия ХПР (180 мкмоль/л) оценивали его эффективность в зависимости от присутствия на разных этапах эксперимента. Предобработка клеток ХПР не приводила к проявлению его антигемолитической активности. Максимальный антигемолитический эффект ХПР (70%) наблюдался в том случае, когда вещество присутствовало только на этапе регидратации.

Выявленный эффект повышения устойчивости эритроцитов человека к действию ПГЛ под влиянием ХПР может быть обусловлен особенностями встраивания и распределения его молекул в эритроцитарной мембране на этапе регидратации клеток при низкой температуре.

When thawing a frozen biological material the cells may be affected by different damaging factors, where a special role belongs to a change in medium osmolality. Model of posthypertonic lysis (PHL) enables studying this factor impact on erythrocytes. Previously there was demonstrated an antihemolytic effect of chlorpromazine (CPR) under hypertonic shock, hypertonic cryohemolysis and hypotonic lysis of human erythrocytes [Orlova N.V., Shpakova N.M., 2006; Shpakova N.M., 2014].

The research aim was to study the CPR effect on human erythrocyte sensitivity to PHL action. We used the spectrophotometry and light microscopy. Posthypertonic lysis was initiated by transferring erythrocytes from dehydration medium (1.45 mol/l NaCl) into rehydration one (0.15 mol/l NaCl) at 37 and 0°C. Cells were introduced into the CPR-containing media at different experimental stages: dehydration, rehydration and prior to PHL effect (pretreatment).

The hemolysis level of erythrocytes, transferred from 1.45 into 0.15 mol/l NaCl was ~70%. Under PHL conditions there were obtained the dependencies of human erythrocyte hemolysis on CPR concentration (60–600 μmol/l). To assess the CPR efficiency we calculated the maximum antihemolytic activity and CPR efficient concentrations. Chlorpromazine manifested an antihemolytic effect under PHL at 0°C, but not at 37°C. Maximum antihemolytic activity of CPR in concentration of 600 μmol/l was 70%. The CPR effect on the erythrocytes, subjected to PHL at 0°C was studied with light microscopy. A decrease in cell number was revealed as a result of sample heating (with 1 deg/min rate) when using CPR (600 μmol/l). When the temperature reached 24°C no undamaged cells were found in visual field. In case when CPR was used at 180 μmol/l concentration, the temperature increase up to 34°C did not result in cell death. To elucidate a possible mechanism of CPR protective action (180 μmol/l) we estimated its efficiency depending on the presence at different stages of experiment. CPR pretreatment of cells did not result in its antihemolytic activity manifestation. Maximum antihemolytic effect of CPR (70%) was observed when the substance was present at rehydration stage only.

The revealed effect of an increased resistance of human erythrocyte to PHL in the presence of CPR may be stipulated by the peculiarities of CPR incorporation and distribution of its molecules in erythrocyte membrane at rehydration stage under low temperature.



Использование антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина при криоконсервировании ядродержащих клеток кордовой крови

Е.Е. Макашова, О.Л. Зубова, П.М. Зубов

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of N-Acetyl-L-Cysteine Antioxidant in Cryopreservation of Cord Blood Nucleated Cells

E.Ye. Makashova, O.L. Zubova, P.M. Zubov

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

Использование клеточных препаратов кордовой крови (КК) в клинической практике вызывает необходимость их долгосрочного хранения. Общепринятым криопротектором для криоконсервирования ядродержащих клеток (ЯСК) кордовой крови является ДМСО, который при определенных условиях может оказывать токсический эффект, в частности нарушать окислительно-проокислительное равновесие, усиливать образование активных форм кислорода (АФК), способствовать развитию окислительного стресса и гибели клеток [Fry L.J., 2015]. Для предотвращения избыточного накопления содержания АФК в клетках перспективным направлением может оказаться добавление в криозащитную среду антиоксидантов, одним из которых является N-ацетил-L-цистеин (АЦ) [Chaudhari A.A., 2007].

Цель данной работы – определение количества ЯСК КК с избыточным содержанием АФК и их жизнеспособности на разных этапах криоконсервирования в криопротекторных растворах, содержащих разные концентрации ДМСО и АЦ.

В работе использовали КК человека. Фракцию ЯСК КК выделяли седиментацией с использованием 6%-го раствора полиглюкина. Суспензию клеток обрабатывали 25%-м раствором ДМСО до конечных концентраций 5; 7,5; 10% и охлаждали со скоростью 1–3 град/мин до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. N-ацетил-L-цистеин присутствовал в средах криоконсервирования в концентрациях 5, 10, 15 и 30 ммоль. Количество клеток с избыточным содержанием АФК определяли методом проточной цитофлуориметрии по накоплению 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью ДНК-красителя 7-AAD.

После размораживания препаратов ЯСК КК было выявлено, что добавление 5 ммоль раствора АЦ в криопротекторные среды не приводило к значимым изменениям количества клеток с избыточным содержанием АФК. N-ацетил-L-цистеин в концентрации 30 мМ также не проявлял антиоксидантного действия, а в некоторых случаях даже наблюдался его проокислительный эффект. Добавленный в среду криоконсервирования АЦ в концентрации 10–15 мМ способствовал значимому уменьшению количества клеток с избыточным содержанием АФК после размораживания. При этом наименьшее количество ЯСК КК с избыточным содержанием АФК отмечалось при использовании 10 мМ АЦ в сочетании с 7,5% ($8,7 \pm 1,5$ (без АЦ $20,6 \pm 3,2$)) и 10% ДМСО ($8,3 \pm 0,9$ (без АЦ $21,2 \pm 1,9$)). Жизнеспособность клеток при этом возросла на 7–14% по сравнению с соответствующими контрольными группами без АЦ.

Таким образом, добавление в суспензию клеток АЦ в концентрации 10–15 мМ способствует снижению уровня АФК, а значит – предотвращению развития окислительного стресса и, тем самым, повышению эффективности криоконсервирования.

The use of cord blood (CB) cell preparations in clinical practice necessitates their long-term storage. DMSO is traditionally used as cryoprotective agent to cryopreserve the nucleated cells (NCs) of cord blood. DMSO can be toxic under certain conditions, in particular, it can break the oxidant-prooxidant balance, enhance the formation of reactive oxygen species (ROS), contribute to the development of oxidative stress and cell death [Fry L.J., 2015]. An excessive accumulation of ROS in cells could be prevented by supplementation of antioxidants to cryoprotective media [Chaudhari A.A., 2007]. One of those is N-acetyl-L-cysteine (NAC).

This research was aimed to determine the content of CB NCs with an excessive ROS content and their viability at different stages of cryopreservation in cryoprotective solutions containing different concentrations of DMSO and NAC.

In the research we used human CB. The fraction of CB NCs was isolated by sedimentation using 6% Polyglucinum solution. The cell suspension was supplemented with 25% DMSO solution up to its final concentrations of 5; 7.5; 10%, cooled at 1–3 deg/min down to -80°C , and then immersed into liquid nitrogen. N-acetyl-L-cysteine was added to cryopreservation media up to the concentrations of 5, 10, 15 and 30 mM. The number of cells with excessive ROS was determined by flow cytometry by accumulation of 2',7'-dichlorofluorescein. Cell viability was assessed by 7-AAD DNA dye.

After thawing of the CB NCs preparations it was revealed that presence of 5 mM NAC solution in cryoprotective media did not lead to significant changes in the number of cells with excessive ROS content. N-acetyl-L-cysteine in concentration of 30 mM also did not demonstrate any antioxidant activity, and in some cases there was even observed a prooxidant effect. Presence of 10–15 mM NAC in cryopreservation medium resulted in a sharp decrease in the cell number with excessive ROS after thawing. As well the least number of CB NCs with an excessive ROS content was observed when 10 mM NAC was in combination with 7.5% (8.7 ± 1.5 (without NAC 20.6 ± 3.2)) and 10% DMSO (8.3 ± 0.9 (without NAC 21.2 ± 1.9)). Herewith, cell viability increased by 7–14% if compared with the corresponding control groups without NAC.

Thus, supplementation of cell suspension with NAC in concentration of 10–15 mM contributed to the reduction of ROS level and consequently to the prevention of oxidative stress, thereby enhancing the efficiency of cryopreservation.



Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика

П.Ю. Улізко¹, О.М. Боброва²

¹Харківська державна зооветеринарна Академія, м. Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Cryoprotectants and Low Temperatures on Survival of Bovine, Equine and Rabbit Erythrocytes

P.Yu. Ulizko¹, O.N. Bobrova²

¹Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

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

Видові відмінності еритроцитів різних тварин ускладнюють процедуру їх кріоконсервування. Різний склад мембран, будова та властивості гемоглобіну, вміст речовин у внутрішньоклітинному середовищі обумовлюють необхідність створення середовища кріоконсервування еритроцитів кожного виду тварин індивідуально. У даній роботі проведено підбір середовища кріоконсервування еритроцитів бика, коня та кролика. Під час підбору використовували кріозахисні сполуки, які ефективні при кріоконсервуванні еритроцитів людини: 1,2-пропандіол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО), поліетиленоксид із м. м. 1500 (ПЕО-1500), сахароза. Кріоконсервант додавали до відмитої еритромаси у об'ємному співвідношенні 1:1. Після 15 хв інкубації зразки у пластикових контейнерах об'ємом 1 мл охолоджували зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснювали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Ефективність кріопротекторів у різній комбінації оцінювали за гемолізом, осмотичною крихкістю та моделюванням трансфузії еритроцитів після кріоконсервування. Вимірювання гемолізу проводили спектрофотометричним методом. Моделювали трансфузію за допомогою інкубування кріоконсервованих еритроцитів досліджуваних тварин при 37°C у плазмі або фізіологічному розчині протягом 24-х годин.

Концентрацію ПЕО-1500 у комбінованому середовищі варіювали в межах 5–20%, ДМСО – 5–15%, 1,2-ПД і сахарози – 5–10%. Виявлено, що комбінування проникаючих і непроникаючих кріозахисних сполук дозволяє отримати найменший рівень гемолізу. При цьому використання ПЕО-1500 у концентраціях 15 і 20% дозволило отримати найнижчий рівень гемолізу одразу після розморожування. Після відмивання від кріозахисного середовища з 20% ПЕО-1500 сумарний гемоліз сягав 41–43%. Зниження його концентрації до 15% дозволило зменшити рівень гемолізу під час заморожування-відтавання та відмивання від кріопротекторів до 23–25%. Оптимальна концентрація ДМСО – 10%. Використання інших концентрацій призводило до збільшення гемолізу на усіх етапах кріоконсервування. Підвищення концентрації 1,2-ПД і сахарози вище 5% виявилось недоцільним.

Таким чином, було підбрано комбінацію кріопротекторів, яка дозволила отримати найменший гемоліз після кріоконсервування еритроцитів бика, коня та кролика: 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД, 5% сахарози. Інкубування та заморожування в підбраному середовищі не призводило до істотного погіршення осмотичних властивостей еритроцитів. Моделювання трансфузії показало, що протягом 24-х годин гемолізувало не більше 5,5% клітин у плазмі та 6,4% у фізіологічному розчині.

Species-specific differences of erythrocytes of various animals complicate the procedure of their cryopreservation. Different membrane composition, structure and properties of hemoglobin, the content of substances in intracellular medium stipulate the need in designing the medium for erythrocytes cryopreservation individually for each animal species. Present study was performed to select the cryopreservation media for bovine, equine and rabbit erythrocytes. For this purpose we used the cryoprotective compounds, being efficient for human erythrocyte cryopreservation such as: 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500) and sucrose. A washed erythrocyte concentrate was mixed with a cryopreservative in 1:1 ratio. After 15 min incubation the samples in 1 ml plastic containers were cooled by immersion into liquid nitrogen (-196°C). Thawing was done in a water bath at 40°C up to liquid phase appearance. The efficiency of cryoprotectants in different combinations was assessed by hemolysis, osmotic fragility and by modelling erythrocyte transfusion after cryopreservation. Hemolysis was measured spectrophotometrically. Transfusion was simulated using the incubation of cryopreserved erythrocytes of the studied animals at 37°C either in plasma or physiological saline within 24 hrs.

The concentration of PEO-1500 and DMSO in a combined medium was ranged within 5–20 and 5–15%, respectively, that for 1,2-PD and sucrose was within 5–10%. The combination of penetrating and non-penetrating cryoprotective compounds was revealed to provide the lowest hemolysis rate. The use of PEO-1500 at 15 and 20% concentrations allowed thereby obtaining the lowest hemolysis immediately after freeze-thawing. After washing out the cryoprotective medium with 20% PEO-1500 the total hemolysis reached 41–43%. Reduction of its concentration down to 15% enabled decreasing the hemolysis level down to 23–25% during freeze-thawing and washing out the cryoprotectants. The optimal DMSO concentration was 10%. The use of other concentrations resulted in an increased hemolysis at all the stages of cryopreservation. The augmentation of 1,2-PD and sucrose concentration higher than 5% occurred to be inexpedient.

Thus, we selected the combination of cryoprotectants, which allowed obtaining the lowest hemolysis of bovine, equine and rabbit erythrocytes after cryopreservation: 15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1,2-PD, 5% sucrose. The incubation and freezing in a selected medium did not result in a significant aggravation of osmotic properties of erythrocytes. The transfusion simulation resulted in the hemolysis of not more than 5.5% of cells in plasma and 6.4% in physiological saline within 24 hrs.



Ультраструктурные перестройки гипоталамуса старых крыс после ритмических экстремальных холодových воздействий

В.В. Кулик, В.Г. Бабийчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Ultrastructural Re-Arrangements in Hypothalamus of Aged Rats After Rhythmic Extreme Cold Exposures

V.V. Kulik, V.G. Babijchuk

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

Гипоталамус представляет собой структуру, ответственную за эмоциональные, поведенческие, гомеостатические реакции организма [Покровский В.М., 2003]. Гипоталамус обладает высокой проницаемостью сосудов для различных веществ, что определяет его чувствительность к изменениям внутренней среды [Смирнов В.М., 2002]. Ритмические экстремальные холодových воздействия (РЭХВ) сопровождаются изменением функционального статуса организма. Эти изменения в значительной степени обусловлены ответной реакцией центров терморегуляции, расположенных в гипоталамусе [Бабийчук Г.А., 2009]. Цель данной работы – изучение влияния повторных циклов РЭХВ (–60; –120; –120°C) на ультраструктуру нейросекреторных клеток гипоталамуса головного мозга старых крыс.

Исследования проводили на белых беспородных крысах самцах 24-месячного возраста. Животные были разделены на две группы: интактные и экспериментальные (по 7 особей). Экспериментальных крыс охлаждали 9 раз по 2 мин. Сеансы РЭХВ проводили 3 раза в день с перерывом в сутки. В конце эксперимента проводили забор кусочков ткани гипоталамуса для электронно-микроскопического исследования. Подготовка материала проводилась по общепринятым методикам, ультраструктуру секреторных нейронов изучали под электронным микроскопом «ЭМВ-100БР».

Установлено, что у 24-месячных интактных крыс наблюдались множественные признаки дегенеративных изменений нейронов гипоталамуса и очаги лизиса ядерной мембраны. В матриксе ядер отдельных секреторных нейронов были отмечены осмиофильные включения, митохондрии с гомогенизированным матриксом и тотально разрушенными наружными мембранами и кристами. В области локализации пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи присутствовали включения липидов и липофусцина. Исследование ультраструктуры секреторных нейронов гипоталамуса старых крыс после 9 сеансов РЭХВ выявило умеренно выраженные перестройки органелл и внутриклеточных мембранных систем. Уменьшалась степень конденсации ядерного хроматина, на мембранах гранулярной эндоплазматической сети появлялось множество рибосом. Отсутствовал очаговый лизис наружных мембран и крист митохондрий. В цитоплазме не обнаруживались деструктивно измененные митохондрии, вторичные лизосомы и включения липофусцина.

Таким образом, проведенные электронно-микроскопические исследования свидетельствуют о том, что РЭХВ стимулируют синтетические, биоэнергетические и метаболические функции секреторных нейронов гипоталамуса головного мозга старых крыс и повышают их адаптационные возможности.

Hypothalamus is the structure responsible for emotional, behavioral, homeostatic responses of the body [Pokrovsky V.M., 2003]. Hypothalamus vessels have a high permeability for different substances. This feature determines its sensitivity to changes in an internal environment [Smirnov V.M., 2002]. Rhythmic extreme cold exposures (RECE) are accompanied by the changes in a body functional status. These changes are largely due to the thermoregulatory response centers located in hypothalamus [Babijchuk G.A., 2009]. The purpose of this research was to study the effect of the repeated cycles of RECE (–60; –120; –120°C) on the ultrastructure of neurosecretory cells of hypothalamus in the brain of aged rats.

Investigations were carried out in 24-months-old male white outbred rats. The animals were divided into two groups: experimental and intact (7 individuals in each). Experimental rats were cooled 9 times by 2 minutes. Sessions of RECE were carried out 3 times a day with a one day break. At the end of the experiment the hypothalamic tissue slices were procured for electron microscopic examination. The samples were prepared according to conventional techniques, the ultrastructure of secretory neurons was studied with electron microscope EMB-100BR (Russia).

It has been found that in 24-month intact rats the numerous signs of degenerative changes in hypothalamus neurons and lysis foci of nuclear membrane were present. The matrix of nuclei of some secretory neurons had osmiophilic inclusions, mitochondria with homogenized matrix and totally destroyed outer membranes and cristae. In the vicinity of lamellar cytoplasmic Golgi complex the lipid and lipofuscin inclusions were present.

Study of secretory neurons ultrastructure in hypothalamus of aged rats after 9 RECE sessions revealed the moderately pronounced re-arrangements of organelles and intracellular membrane systems. The condensation of nuclear chromatin decreased, granular endoplasmic reticulum was characterized by numerous ribosomes present on its membranes. There was no focal lysis of outer membranes and mitochondria cristae. The destructively altered mitochondria, secondary lysosomes and inclusion of lipofuscin were absent in cytoplasm.

Thus, performed electron microscopic studies indicated that the RECE stimulated synthetic, bioenergetic and metabolic functions of secretory neurons in hypothalamus of the brain of aged rats and increased their adaptive capacities.



Применение криоконсервированной эритроцитарной массы при коррекции анемического синдрома у собак, вызванного *Babesia canis*

О.А. Первушина

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Application of Cryopreserved Packed Red Blood Cells to Treat Anaemic Syndrome in Canine Babesiosis

O.A. Pervushina

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

Бабезиоз – стремительно развивающееся заболевание, связанное с быстрым разрушением эритроцитов, требующее специфического и незамедлительного лечения [Темичев К.В., 2011]. Животное с тяжелой формой этого заболевания можно спасти только с помощью гемотрансфузии [Leisewitz A.L., 1996].

Цель работы – использование криоконсервированной эритроцитарной массы (КЭМ) для трансфузии при комплексном лечении собак, больных бабезиозом. Объектом исследования были эритроциты, выделенные из крови здоровых половозрелых беспородных собак. Кровь заготавливали на глюкозо-цитратном гемоконсерванте и хранили не более 4 ч при 4°C. Эритромассу получали методом центрифугирования цельной крови при 1500g в течение 5 мин с последующим удалением плазмы и лейкоцитомоноцитарного слоя. После этого эритроциты трижды отмывали в 4-кратном объеме изотонического солевого раствора (150 mM NaCl, 10 mM трис-HCl, pH 7,4).

Раствор 17,5% гидроксиэтилированного крахмала смешивали с эритромассой в соотношении 1:1 и выдерживали 30 мин при 22°C. Замораживание осуществляли в пробирках «Eppendorf» объемом 5 и 10 мл путем погружения в жидкий азот. Размораживание проводили на водяной бане (40...42°C). Для специфического лечения бабезиоза собак массой 15–20 кг всех опытных групп использовали антипротозойный препарат «Пиро-Стоп» в дозе 0,25 мл/кг массы тела животного, который однократно вводили внутримышечно. Гемотрансфузию КЭМ проводили для коррекции гемолитической анемии однократно через сутки после инъекции препарата «Пиро-Стоп». Объем необходимой для гемотрансфузии КЭМ брали из расчета 1 мл/кг массы тела животного, поскольку 1 мл эритромассы повышает уровень гематокрита реципиента на 1%. Перед трансфузией эритромассу разбавляли до показателей гематокрита 45,5%.

Исследования показали, что у животных после лечения и гемотрансфузии КЭМ уровень гемоглобина и гематокрита вырос на 11,4 и 16,4% соответственно по сравнению с животными, которых лечили «Пиро-Стопом», но без трансфузии. Количество эритроцитов при этом увеличилось на 26,3%. К 10-м суткам уровень гемоглобина и гематокрита повысился на 12,5 и 28,6% соответственно, тогда как количество эритроцитов составило 27%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гемотрансфузия КЭМ в комплексе со специфической и симптоматической терапией дает положительный результат при коррекции анемического синдрома у собак, вызванного *Babesia canis*.

Babesiosis is a rapidly emerging disease, associated with a fast destruction of RBCs, and requires specific and urgent therapy [Temichev K.V., 2011]. In severe cases the animal may be saved only with blood transfusion [Leisewitz A.L., 1996].

The research aim was the use of cryopreserved packed RBCs (CPRBCs) for transfusion in a combined therapy of dogs with babesiosis. The RBCs, isolated from blood of healthy mature outbred dogs were the research object. Blood was procured with glucose-citrate hemopreservative and stored not more than 4 hrs at 4°C. The packed RBCs were procured by the whole blood centrifugation at 1500g for 5 min, with following plasma and buffy coat layer removal. Then the RBCs were thrice washed in a 4-fold volume of isotonic saline (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4).

The solution of 17.5% hydroxyethyl starch was mixed with the packed RBCs in 1:1 ratio and incubated for 30 min at 22°C. Freezing was performed in 5 and 10 ml Eppendorf tubes via immersion into liquid nitrogen. Thawing was done in a water bath (40...42°C). For specific babesiosis therapy of dogs weighing 15–20 kg of all the experimental groups we used an antiprotozoal drug Piro-Stop at a dose of 0.25 ml/kg body weight of animal, which was once administered intramuscularly. To correct haemolytic anaemia the blood transfusion of CPRBCs was performed once, a day after Piro-Stop drug injection. The volume of CPRBCs necessary for blood transfusion was assumed as 1 ml/kg of animal body weight, since 1 ml of packed RBCs increased hematocrit level of recipient by 1%. Before transfusion the packed RBCs were diluted to reach 45.5% hematocrit.

Our studies demonstrated the haemoglobin and hematocrit levels in animals after therapy and CPRBCs blood transfusion to increase by 11.4 and 16.4%, respectively as compared to the animals treated with Piro-Stop, but without transfusion. A number of RBCs increased by 26.3%. To day 10 the level of hematocrit and haemoglobin augmented by 12.5 and 28.6%, respectively, while a number of RBCs was 27%.

Our findings suggest the blood transfusion of CPRBCs in combination with specific and symptomatic therapy to provide a positive result in correcting canine anaemic syndrome caused by *Babesia canis*.



Назначение иммуномодуляторов при материнско-плодовой инфекции снижает инфицированность плаценты и ее оболочек

А.А. Роечко, Н.М. Пасиешвили

Харьковский областной клинический перинатальный центр

Administration of Immunomodulators to Treat Maternal and Fetal Infection Reduces Placental and Membrane Contamination

A.A. Royenko, N.M. Pasiashvili

Kharkiv Regional Clinical Perinatal Center, Kharkiv, Ukraine

Материнско-плодовая инфекция (МПИ) занимает одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости и смертности новорожденных, снижает возможности низкотемпературного хранения материала последа – плаценты, кордовой крови и оболочек для биобанкинга.

На сегодняшний день доказана роль условно-патогенных и патогенных возбудителей (бактерий, вирусов) в генезе иммунного дисбаланса, способствующего преждевременным родам, дистрессу плода, внутриутробной пневмонии, поражении центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта. Поэтому изучение особенностей протекания инфекционного процесса у беременных и влияние его на иммунную систему матери является актуальной проблемой современного акушерства, а также делает возможным создание запасов аутологического биоматериала плацентарного происхождения в низкотемпературных банках.

Цель данной работы – изучение влияния назначения иммуномодуляторов при бактериальной и вирусной инфекции беременных на инфицированность плаценты и плодных оболочек.

Было обследовано 150 беременных (по 30 в группе): группа 1 – беременные с бактериальной инфекцией, которые получали традиционную антибактериальную терапию; группа 2 – с вирусной инфекцией, которые получали традиционную противовирусную терапию; группа 3 – с бактериальной инфекцией, которые получали традиционное лечение с включением иммуномодулятора «Полиоксидоний»; группа 4 – с вирусной инфекцией, которым к традиционной терапии был добавлен иммуномодулятор «Иммунофан»; группа 5 – беременные без проявлений МПИ. После родов производили бактериальный посев, вирусологическое исследование плодных оболочек и плаценты. Оценивали состояние новорожденного, наличие у него инфекционных проявлений.

При анализе клинического статуса беременных было выявлено, что среди инфекционных агентов наиболее часто определяли: стафилококк (63,3%), гарднереллу (70%); микоплазму (30%), хламидии (26,6%), цитомегаловирус (23,3%), герпес (33,3%). В результате исследования иммунного статуса беременных в группе 5 выявлено инфицирование последа в 16,7%, в группе 1 – в 76,7%, в группе 2 – в 60%, в группе 3 – в 26,6% и в группе 4 – в 23,3%. При этом выраженные клинические проявления инфекции наблюдали в группе 1 – 3 случая эндометрита и 2 случая внутриутробной пневмонии.

Таким образом, в группах беременных с МПИ, где были использованы «Полиоксидоний» и «Иммунофан», уменьшились риск инфицирования плода и последа в родах, а также количество инфекционных осложнений.

Maternal and fetal infection (MFI) takes one of the leading places in the structure of perinatal morbidity and mortality of newborns, it reduces the possibilities of low temperatures storage of afterbirth material: placenta, cord blood and membranes in terms of biobanking.

Nowadays, the role of opportunistic pathogenic and pathogenic agents (bacteria, viruses) is proven in genesis of immune disbalance, contributing to premature delivery, fetal distress, intrauterine pneumonia, derangements in central nervous system, cardiovascular system, gastrointestinal tract. Therefore studying the peculiarities of infection process proceeding in pregnant women and its influence on mother's immune system is an actual task in current obstetrics, as well as it enables establishing the stocks of autologous biomaterial of placental origin at low temperature banks.

This research was aimed to study the influence of administered immunomodulators to treat bacterial and viral infections of pregnant women on placental and fetal membrane contamination.

We examined 150 pregnant women (by 30 in each group): the group 1 comprised the pregnant women with bacterial infection received the standard antibacterial therapy; the group 2 comprised those with viral infection, received the standard antiviral therapy; the group 3 included those with bacterial infection, treated with the standard therapy including immunomodulator Polyoxidonium; women with viral infection, received immunomodulator Immunofan in addition to the standard therapy were in the group 4; the group 5 comprised the pregnant women with no MFI signs. After delivery we performed a bacterial seeding, virologic studies of fetal membranes and placenta. We assessed the state of newborns and the presence of infectious manifestations as well.

When analyzing a clinical status of pregnant women we revealed that the most frequent among infectious agents were *Staphylococcus* (63.3%), *Gardnerella vaginalis* (70%); *Mycoplasma* (30%), *Chlamydia* (26.6%), *Cytomegalovirus* (23.3%), *Herpes* (33.3%). Analysis of immune status of pregnant women in the group 5 revealed the afterbirth contamination in 16.7%, and in the groups 1, 2, 3, 4 it was found respectively in 76.7, 60, 26.6 and 23.3%. The pronounced clinical manifestations of infection were observed in the group 1: there were 3 cases of endometritis and 2 cases of intrauterine pneumonia.

Thus, in the groups of pregnant women with MFI treated with Polyoxidonium and Immunofan the risk of fetal and afterbirth contamination in delivery, as well as the number of infectious complications were decreased.



Получение культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников новорожденных поросят методом селективной адгезии

Е.М. Плаксина, О.С. Сидоренко, Е.И. Легач, Г.А. Божок
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Neuroblast-Like Cell Culture Derivation from Newborn Piglet Adrenal Glands Using Selective Adhesion Method

K.M. Plaksina, O.S. Sidorenko, E.I. Legach, G.A. Bozhok
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Изучение особенностей роста, пролиферации, миграции, дифференциации нейробластов в культуре *in vitro* имеет большое значение для понимания принципов формирования головного и спинного мозга в онтогенезе. Ранее нами было установлено появление нейробластоподобных клеток в культуре клеток надпочечников (ККН) новорожденных поросят, растущей с образованием цитосфер. Кроме того, в этой культуре присутствовали фибробластоподобные клетки, которые были идентифицированы как клетки соединительнотканной капсулы и коркового вещества надпочечника.

Цель данной работы – получение очищенной культуры нейробластоподобных клеток из надпочечников поросят разных сроков неонатального развития методом селективной адгезии.

Клеточную суспензию получали ферментативным методом из надпочечников поросят возрастом 1, 7, 14, и 28 дней (P1, P7, P14 и P28 соответственно). Клетки культивировали на низкоадгезивной поверхности при температуре 37°C и атмосфере с 5% CO₂ в среде 199 с 10% фетальной телячьей сыворотки и антибиотиками. При этом наблюдалось образование флотирующих цитосфер. Половину культуральной среды с цитосферами переносили на адгезивную поверхность на 4, 7, 11, 14, 17, 21-е сутки культивирования. Для определения экспрессии β-III-тубулина методом иммуноцитохимии использовали первичные мышинные антитела к β-III-тубулину (1:200) и вторичные козы антимышинные HiLyte Fluor 488 – конъюгированные антитела (1:400).

Цитосферы, образовавшиеся в ККН поросят P1 после переноса на адгезивную поверхность, на 4, 7 и 11-е сутки культивирования прикреплялись, затем наблюдалось выселение из цитосфер фибробластоподобных и нейробластоподобных клеток. При этом конфлюентность монослоя составляла ~50% при переносе на 4-е, 40% – 7-е, 1,5% – 11-е сутки. При переносе на 14, 17, 21-е сутки цитосферы прикреплялись, но монослой из фибробластоподобных клеток не формировался. При переносе на 14-е сутки из цитосфер активно выселялись нейробластоподобные клетки, которые позитивно окрашивались антителами к β-III-тубулину. При переносе на 17-е сутки активность выселения этих клеток уменьшалась, а на 21-е сутки они отсутствовали. В ККН поросят P7 и P14 формировались цитосферы, при переносе которых наблюдалась тот же эффект. При переносе цитосфер, образовавшихся в ККН поросят P28, большая их часть теряла способность к прикреплению, а из тех цитосфер, которые прикреплялись, выселение клеток не наблюдалось.

Таким образом, очищенная культура нейробластоподобных клеток может быть получена при культивировании клеток надпочечников поросят 1–14-суточного возраста в течение 14 суток с последующим переносом флотирующих цитосфер на адгезивную поверхность.

Studying the features of neuroblast growth, proliferation, migration and differentiation in culture *in vitro* is of great importance to understand the principles of brain and spinal cord formation in ontogenesis. Previously we have established the fact of neuroblast-like cell appearance in newborn piglet adrenal gland cell culture (AGCC), featured with the formation of cytospheres. Moreover, this culture contained the fibroblast-like cells, identified as the cells of connective tissue capsule and adrenal cortex.

The research aim was to derive a purified culture of neuroblast-like cells from adrenal glands of piglets of different terms of neonatal development using selective adhesion method.

Cell suspension was procured with enzyme method from adrenal glands of 1-, 7-, 14- and 28-day-old piglets (P1, P7, P14 and P28, respectively). Cells were cultured on low adhesive surface at 37°C and 5% CO₂ atmosphere in medium 199 with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The formation of floating cytospheres was observed under these conditions. The half of culture medium with cytospheres was transferred to adhesive surface to days 4, 7, 11, 14, 17, 21 of culture. To determine the beta III Tubulin expression by means of immunocytochemistry method we used the beta III Tubulin primary mouse antibodies (1:200) and secondary goat anti-mouse HiLyte Fluor 488-conjugated antibodies (1:400).

The cytospheres, formed in AGCC of P1 piglets after transferring to adhesive surface were attached to days 4, 7, and 11 of culture, then the migration of fibroblast-like and neuroblast-like cells out of cytospheres was noted. The monolayer confluency was thereby ~50, 40 and 1.5% during transfer to days 4, 7 and 11, respectively. Following the transfer to days 14, 17 and 21 the cytospheres were attached, but no monolayer of fibroblast-like cells was formed. After the transfer to day 14 the neuroblast-like cells actively migrated from cytospheres, which were positively stained with beta III Tubulin antibodies. When transferring to day 17 the migration activity of these cells reduced, and after transfer to day 21 they were absent. The AGCC of P7 and P14 piglets contained the cytospheres, representing the same features following their transfer. Transferring the cytospheres formed in AGCC of P28 piglets showed that majority of the structures lost their ability to attach, and no migration was observed from the attached cytospheres.

Thus, a purified culture of neuroblast-like cells may be derived following culturing of adrenal gland cells from 1–14-day-old piglets involving the transfer of floating cytospheres to an adhesive surface.



Разработка установки для эндоскопических операций на экспериментальных животных

А.И. Гребенюк¹, Н.А. Чиж¹, Д.В. Бызов¹, Л.А. Рогоза¹,
Е.А. Антоненко², П.Г. Лукьяненко³, Б.П. Сандомирский¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

³ПАО «Точприбор», Харьков

Designing of Device for Endoscopic Surgery In Experimental Animals

A.I. Grebenyuk¹, N.A. Chizh¹, D.V. Byzov¹, L.A. Rohoza¹,
E.A. Antonenko², P.G. Lukyanenko³, B.P. Sandomirsky¹

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

²V.N. Karazin Kharkiv National University

³OJSC Tochpribor, Kharkiv

Освоение и внедрение в медицинскую практику эндоскопических технологий стало новым этапом развития хирургии, что обусловлено сокращением времени оперативного вмешательства, снижением выраженности болевого синдрома и сроков реабилитации больных. Использование малоинвазивных методик в экспериментальных работах на животных ограничено, что объясняется дороговизной эндоскопического, в частности лапароскопического, оборудования.

В связи с этим существует необходимость разработки доступных аналогов лапароскопической системы, что позволило бы не только проводить малоинвазивные оперативные вмешательства, но и макроскопические наблюдения за органами брюшной полости в динамике.

В отделе экспериментальной криомедицины Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины разрабатывали модель такой установки. Совместно с учеными из Харьковского национального университета радиотехники был построен аппарат для инсуффляции газо-воздушной смеси, который позволяет создать необходимое оперативное пространство в брюшной полости для выполнения диагностических и/или хирургических манипуляций.

Также важной задачей была разработка доступной системы визуализации объектов в брюшной полости, которая включала два этапа: 1 – создание оптической системы для выведения изображения на экран и видеофиксации; 2 – разработка системы подсветки с естественной цветопередачей объектов.

На первом этапе мы сконструировали систему, состоящую из видеокамеры, оптико-механического адаптера и эндоскопа, а на втором – использовали различные осветители с оптоволоконном и LED-подсветкой.

Особое внимание было уделено адаптации лапароскопического инструментария для проведения операций на экспериментальных животных.

Разработанная эндоскопическая установка для работы на экспериментальных животных успешно апробирована *in vivo*, что открывает перспективы выполнения малоинвазивных операций с использованием криохирurgical инструментов.

Mastering and introduction of endoscopic technologies into medical practice became a step forward in the development of surgery, because of reduced duration of surgeries, decreased pain syndrome severity and terms of patients' rehabilitation. The use of minimally invasive techniques in experimental studies in animals is restricted because of a high cost of endoscopic, in particular laparoscopic equipment.

In this regard, there is a need in designing the budget-friendly analogues of laparoscopic systems, that would enable not only performance of minimally invasive surgery, but macroscopic observation of abdominal cavity organs in dynamics as well.

The model of this device was designed at the Department of Experimental Cryomedicine of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine. Jointly with the scientists from Kharkov National University of Radio Electronics the device for gas-air mixture insufflation was created, which enabled creating a necessary working space in abdominal cavity to perform diagnostic and/or surgical procedures.

Another important task was to design a budget-friendly system for visualization of objects in abdominal cavity. The work was performed in two steps: creation of an optical system for imaging and video fixation; development of lighting system enabling natural colour rendering of objects. At the first stage we designed the system consisting of video camera, mechano-optical adapter and endoscope, and at the second one we applied different LED and fiber optic illumination. A special attention was paid to the adaptation of laparoscopic instruments for surgery performance in experimental animals.

The designed endoscopic device for carrying-out researches in experimental animals was successfully tested *in vivo*, that offered great opportunities for implementing minimally invasive surgeries using cryoinstruments.



Разработка инсуффлятора для проведения эндоскопических операций на экспериментальных животных

А.В. Мотко¹, А.Д. Долгопятенко¹, Н.А. Чиж², О.Г. Аврунин¹, Б.П. Сандомирский²

¹Харьковский национальный университет радиоэлектроники

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

Designing of Insufflator for Endoscopic Surgery in Experimental Animals

A.V. Motko¹, A.D. Dolgopyatenko¹, N.A. Chizh², O.G. Avrunin¹, B.P. Sandomirskiy²

¹Kharkiv National University of Radioelectronics, Kharkiv, Ukraine

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

Для проведения экспериментальных лапароскопических операций необходима эндоскопическая установка и специальные инструменты. Инсуффлятор – один из аппаратов эндоскопической установки, который предназначен для создания пневмо- или карбоксиперитонеума в брюшной полости биообъекта, что позволяет формировать определенное оперативное пространство и проводить диагностические и/или хирургические манипуляции. Специальные инсуффляторы для работы со средними и мелкими экспериментальными животными (кролики, крысы) отсутствуют, поэтому необходима разработка такого оборудования.

В качестве компрессионного блока мы использовали импульсный ингалятор «Aeromat Tiefeninalator 610A» (Германия). Нагнетаемый компрессором воздух поступает в ресивер, который представляет собой пластиковый сосуд вместимостью 10 дм³. Применение ресивера обязательно, поскольку он обеспечивает ламинарный поток газа в брюшную полость. Для поддержания постоянного давления в ресивере от 0,05 до 0,4 атм к схеме инсуффлятора был подключен механический предохранительный клапан FESTO (Германия). К клапану с помощью тройника подключен манометр, который регистрирует показания давления в ресивере. Для измерения расхода газа и дальнейшего его использования в расчетах предполагается подключение к схеме расходамера.

Лапароскопические операции проводили на крысах ($n = 3$) и кроликах ($n = 3$), при давлении воздуха в брюшной полости от 15 до 20 мм рт. ст. (0,02–0,027 атм). Для регулирования давления газа, поступающего в полость, подключается еще один механический клапан FESTO, который максимально близко располагается к объекту исследований. Давление в брюшной полости регистрируется вторым манометром. Газ в брюшную полость вводится с помощью иглы Вереща, которая прикрепляется к дистальному концу системы.

При введении троакаров, рабочих приборов, камеры и инструментов в брюшную полость давление падает. Второй клапан устраняет потери давления, в результате создается хирургическое пространство в брюшной полости.

Таким образом, нами разработана система для инсуффляции, которая позволяет выбирать и поддерживать оптимальное давление газа в брюшной полости и в дальнейшем проводить эндоскопические операции на лабораторных животных.

Performance of experimental laparoscopic surgery requires endoscopic devices and special tools. Insufflator is one of the apparatuses of endoscopic device which is intended to make either pneumo- or carboxyperitoneum in abdominal cavity of a bioobject, which allows the creation of a certain space to perform surgery or diagnostics. There are no special insufflators to handle the middle-sized and small experimental animals (rabbits, rats), so there is a need in developing such an equipment.

As the compression block we used the pulsed nebulizer Aeromat Tiefeninalator 610A (Germany). The air blown by the compressor flowed into the receiver, which was a plastic container with a capacity of 10 dm³. Application of the receiver was mandatory because it provided a laminar flow of gas into the abdominal cavity. To maintain a constant pressure in the receiver in the range from 0.05 to 0.4 atm the insufflator circuit was equipped with a mechanical safety valve FESTO (Germany). The valve was connected via the tee-connector to a pressure gauge registering the pressure readings in the receiver. Measuring of the gas flow and its further use in the calculations is possible with the flowmeter integrated into a circuit.

Laparoscopic surgery was performed in rats ($n = 3$) and rabbits ($n = 3$). The air pressure in the abdominal cavity was 15 to 20 mm Hg (0.02–0.027 atm). To regulate the pressure of the gas entering the cavity another mechanical valve FESTO was connected as close as possible to the studied object. The pressure in the abdominal cavity was recorded with the second manometer. Air was introduced into the abdominal cavity through the Veress needle, which was attached to the system distal end.

Application of the trocars, devices, camera and instruments in the peritoneal cavity could decrease the pressure. The second valve eliminated the pressure loss, that preserved the working space in the abdominal cavity.

Thus, we have developed the system for insufflation, which allowed to choose and maintain an optimal air pressure in the abdomen and to perform endoscopic surgeries in laboratory animals.



Влияние инкубации с криопротекторами на присутствие эпитопа Gal-alpha-1,3-Gal в клетках линии РК-15

К.И. Богуславский, Н.М. Алабедакарим, А.В. Пахомов, Г.А. Божок
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Incubation of PK-15 Cells with Cryoprotectants on Presence of Gal-alpha-1,3-Gal Epitope

K.I. Bohuslavskyi, N.M. Alabedalkarim, A.V. Pakhomov, G.A. Bozhok
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Эпитоп Gal-alpha-1,3-Gal (α -Gal) – это углеводная структура, которая экспрессируется в организме млекопитающих, кроме человека и некоторых видов обезьян. Для получения и хранения животного биоматериала, предназначенного для изготовления биопротезов, применяются технологии низкотемпературного хранения. Однако сведения о его влиянии на присутствие α -Gal практически отсутствуют.

Цель данной работы – изучение влияния инкубации с криопротекторами диметилсульфоксидом (ДМСО) и оксиэтилированным глицерином (ОЭГ) как первого этапа криоконсервирования на присутствие α -Gal в культуре клеточной линии свиного происхождения РК-15.

Линию клеток РК-15 поддерживали в стандартных условиях с использованием среды DMEM/F12, обогащенной антибиотиками и 10% фетальной телячьей сывороткой. Для эксперимента клеточный монослой открепляли от подложки с помощью смеси 0,5% трипсина и раствора Версена (1:1). После отмывки от фермента клетки ресуспендировали и инкубировали в растворах, содержащих ДМСО в концентрации 5, 7,5 и 10% или ОЭГ ($n = 5$) в концентрации 5, 10 и 15%. После отмывания от криопротектора клетки окрашивали с помощью FITC-конъюгированного изолектина BSI-B4, который добавляли к пробам в разведениях 1:150, 1:250 и 1:500. Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием программного обеспечения «CellQuestPro» (США) и «WinMDI 2.8» (США).

С помощью метода цитофлуориметрии в культуре РК-15 выявлены две субпопуляции клеток (R1 и R2), обладающие разными параметрами прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Установлено, что клетки R1 связывали изолектин BSI-B4 в меньшей степени, чем клетки R2. В связи с этим в дальнейших экспериментах клетки анализировали по двум отдельным регионам как имеющие низкую BSI-B4^{low} (R1) и высокую BSI-B4^{high} (R2) интенсивность флуоресценции.

После инкубации с ДМСО во всех концентрациях количество BSI-B4-позитивных клеток в обоих регионах значимо не отличалось от контроля. После инкубации с ОЭГ во всех концентрациях наблюдалось увеличение количества BSI-B4-позитивных клеток в R1, тогда как в клетках R2 не было обнаружено значимой разницы по сравнению с контрольными значениями.

Результаты работы свидетельствуют о возможности модификации клеточной поверхности в присутствии криопротекторов. Предположительно, это может происходить за счет нескольких факторов: структурных или конформационных изменений эпитопа α -Gal, что влияет на связывание антител с ним; увеличения доступности эпитопов α -Gal для связывания с антителами.

The Gal-alpha-1,3-Gal (α -Gal) epitope is a carbohydrate structure, expressing in mammalian body, except human and some monkey species. Procurement and storage of animal biomaterial for bioprostheses manufacture involves low temperature storage technologies. However, the information about their effects on α -Gal presence is poor.

This research aim was to study the effect of incubation with dimethyl sulfoxide (DMSO) and oxyethylated glycerol (OEG) cryoprotectants as the first stage of cryopreservation on α -Gal presence in PK-15 cell line culture of porcine origin.

The PK-15 cell line was maintained under the standard conditions using DMEM/F12, supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum. Before the experiment the cell monolayer was detached from the substrate with a mixture of 0.5% trypsin and Versene solutions (1:1). After enzymes washing-out the cells were resuspended and incubated in the solutions containing either 5, 7.5 and 10% DMSO or 5, 10 and 15% OEG ($n = 5$). After washing of cryoprotectants the cells were stained with FITC-conjugated isolectin BSI-B4, added to the samples at 1:150, 1:250 and 1:500 dilutions. Cells were analyzed with BD FACS Calibur flow cytometer (USA) using CellQuestPro (USA) and WinMDI 2.8 (USA) softwares.

Two cell subpopulations (R1 and R2) with different parameters of direct (FSC) and side (SSC) light scattering were revealed in PK-15 culture using flow cytometry. The R1 cells were established to bind isolectin BSI-B4 in a lower degree than R2 ones. Due to this fact in further experiments we analyzed the cells by two separate regions with low and high intensities of fluorescence BSI-B4^{low} (R1) BSI-B4^{high} (R2).

After incubation with DMSO in all the concentrations a number of BSI-B4-positive cells in both regions was not significantly different from the control. After incubation with OEG in all the concentrations we observed an increased number of BSI-B4-positive cells in R1, meanwhile in R2 cells no significant difference as compared to the control values were revealed.

Our findings testify to the possibility of modifying the cell surface in the presence of cryoprotectants. This can presumably occur due to either structural or conformational changes in α -Gal epitope, affecting the binding of antibodies; or due to an increased α -Gal epitope availability to antibodies.

