



ХОЛОД в биологии и медицине

Актуальные проблемы криобиологии,
трансплантологии и биотехнологии

Тезисы конференции молодых ученых “Холод в биологии и медицине – 2010” 27–28 мая 2010, г. Харьков

<i>Артуянц А.Ю.</i> Криоконсервирование дрожжеподобных грибов <i>Candida albicans</i> в условиях воздействия полиенового антимикотика нистатина на цитоплазматическую мембрану.....	174
<i>Сосимчик И.А., Черкашина Д.В.</i> Митохондриально адресованный антиоксидант SkQ ₁ снижает повреждение печени крыс при гипотермическом хранении.....	175
<i>Венцовская Е.А.</i> Влияние различных видов ритмических холодовых воздействий на цикл сон-бодрствование крыс.....	176
<i>Кучков В.Н.</i> Разработка криоскопического осмометра для криобиологических исследований.....	177
<i>Аверченко Е.А., Кавок Н.С., Боровой И.А., Погреньяк Н.Л.</i> Влияние экзогенного криопротектора на функциональное состояние митохондрий изолированных гепатоцитов и клеток костного мозга крысы при оценке флуоресцентным методом.....	178
<i>Есипова Ю.С., Компаниец А.М., Николенко А.В.</i> Криоконсервирование эритроцитов человека в криозащитных средах, содержащих комбинации криопротекторов.....	179
<i>Малюкина М.Ю., Кавок Н.С., Боровой И.А.</i> Криовлияние экзогенного криопротектора на динамику гормон-стимулированных изменений трансмембранного потенциала изолированных гепатоцитов крыс при оценке флуоресцентным методом.....	180
<i>Юрчук Т.А., Божок Г.А., Коваленко И.Ф., Бондаренко Т.П.</i> Влияние гипертонии на объемные изменения и пространственное расположение липидных капель адренокортикоцитов.....	181
<i>Розанова С.Л.</i> Влияние замораживания-оттаивания тканей плаценты на восстановительную активность их экстрактов... ..	182
<i>Чернобай Н.А.</i> Зависимость проницаемости мембран клеток надпочечников для молекул ряда криопротекторов от температуры.....	183
<i>Вязовская О.В., Николенко А.В.</i> Оценка криозащитных свойств непроницающего криопротектора оксипропилированного метилцеллолозы при замораживании эритроцитов донорской крови человека.....	184
<i>Ляшенко Т.Д.</i> Влияние криоконсервирования на способность нервных клеток новорожденных крыс пролиферировать и дифференцироваться.....	185
<i>Маркова К.В., Рамазанов В.В.</i> Антигемолитический эффект хлорпромазина при модификации цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов человека в условиях холодового шока.....	186
<i>Мартынюк И.Н., Гавилей О.В.</i> Влияние амидов и диолов на интенсивность перекисного окисления липидов спермы птиц при гипотермии.....	187
<i>Петренко Ю.А.</i> Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани взрослого человека: дифференцировочные свойства и потенциал для низкотемпературного консервирования.....	188
<i>Бондаренко О.В.</i> Изучение клеточных механизмов холодовой адаптации млекопитающих.....	189
<i>Говорова Ю.С., Зинченко А.В.</i> Дифференциальная адиабатическая сканирующая калориметрия как метод изучения конформационной стабильности белков в криобиологии.....	190
<i>Димитров А.Ю., Бондарович Н.А., Сафранчук О.В., Челомбитько О.В., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток фетальной печени поздних сроков гестации..	191
<i>Зайков В.С., Труфанова Н.А., Правдюк А.И., Петренко Ю.А.</i> Витрификация мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер.....	192
<i>Дудецкая Г.В., Божок Г.А., Гурина Т.М., Бондаренко Т.П.</i> Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс.....	193
<i>Поверенная Ю.А., Петренко Ю.А.</i> Методы оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток.....	194
<i>Robilotto A.T., J.M. Baust, R.G. Van Buskirk, Gage A.A., Baust J.G.</i> Оценка клеточной смерти и выживаемости при криогенном воздействии на тканеинженерной модели рака простаты человека.....	195
<i>Baust J. M., Klossner D. P., Van Buskirk R. G. Gage, A. A., Mouraviev V., Polascik T.J., Baust J.G.</i> Целенаправленное изменение экспрессии интегринов увеличивает холодовую чувствительность андроген-независимого рака простаты.....	196
<i>Snyder K.K., Baust J.M., Van Buskirk R.G., Baust J.G.</i> Реакция неонатальных вентрикулярных кардиомиоцитов крысы на кратковременные температурные воздействия.....	197

<i>Corwin W.L., Baust J.M., Van Buskirk R.G., Baust J.G.</i> Исследование <i>in vitro</i> апоптоза и некроза при холодовом хранении на модели клеток дыхательных путей человека.....	198
<i>Порожан Е.А., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на фенотипические характеристики Т-клеток тимуса животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом.....	199
<i>Тищенко Ю.О., Кирошка В.В., Бондаренко Т.П.</i> Стадия гистогенеза овариальной ткани как фактор, определяющий ее морфофункциональное развитие после трансплантации.....	200
<i>Чиж Н.А., Слета И.В., Гальченко С.Е., Шило А.В., Сандомирский Б.П.</i> Моделирование некроза миокарда у крыс.....	201
<i>Носенко Л.А., Сироус М.А., Останков М.В., Рассоха И.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервированных клеток фетальной печени на иммуноморфологические особенности кожи при atopическом дерматите.....	202
<i>Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Фалько О.В.</i> Криоконсервированный препарат сыворотки кордовой крови в профилактике акушерского антифосфолипидного синдрома.....	203
<i>Кузнецова В.Г., Жегунов Г.Ф.</i> Влияние экстрактов из эмбрионов кур на иммунную систему и сердце крыс.....	204
<i>Кравченко М.А., Сироус М.А., Осецкий А.И., Гольцев А.Н.</i> Оценка иммуномодулирующей активности липидного криоэкстракта плаценты.....	205
<i>Иванов Е.Г., Гулевский А.К.</i> Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови на морфологические изменения в хряще коленного сустава при механической травме.....	206
<i>Бондарович Н.А., Сафранчук О.В., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервированных клеток фетальной печени на состояние иммунной системы у мышей линии СЗН до клинического проявления рака молочной железы.....	207
<i>Бызов Д.В., Сандомирский Б.П.</i> Применение замораживания и гамма-облучения для создания сосудистых ксеноскаффолдов.....	208
<i>Сидоренко О.С., Холодный В.С., Гурина Т.М., Легач Е.И., Божок Г.А.</i> Морфологические особенности первичной культуры клеток надпочечников, полученной из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани.....	209
<i>Правдюк А.И.</i> Сохранение дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер после криоконсервирования.....	210
<i>Гулевский А.К., Горина О.Л., Моисеева Н.Н.</i> Изучение влияния низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) на фагоцитарную и метаболическую активность деконсервированных нейтрофилов.....	211
<i>Лебеда Е.А., Петренко Ю.А.</i> Разработка перфузионной термостатируемой системы для культивирования стромальных клеток в составе трехмерных пористых носителей.....	212
<i>Шевченко М.В.</i> Особенности влияния экстрактов печени и нервной ткани новорожденных крыс на культивирование постнатальных нервных клеток.....	213
<i>Муценко В.В., Петренко Ю.А.</i> Окрасивание фибробластов кожи взрослого человека карбоцианиновыми красителями DiI и DiO.....	214
<i>Бабинец О.М., Гурина Т.М., Кирилюк А.Л.</i> Вопросы криоконсервирования пробиотика <i>Saccharomyces boulardii</i>	215
<i>Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Фалько О.В., Чижевский В.В., Волина В.В.</i> Экспериментальное обоснование эффективности мультифакторных программ криоконсервирования плацентарной ткани.....	216
<i>Сироус М.А., Гольцев А.Н., Рассоха И.В., Гольцев К.А.</i> Применение криоконсервированных клеток фетальной печени для лечения аутоиммунной гемолитической анемии.....	217
<i>Ябланович И.Г., Жегунов Г.Ф.</i> Влияние кардиотропных препаратов на электрофизиологические параметры сердца крыс при гипотермии.....	218
<i>Гольцев К.А., Кожина О.Ю., Сафранчук О.В., Грищенко В.И., Криворучко И.А.</i> Экспериментальное обоснование применения кордовой крови для лечения послеоперационных осложнений.....	219
<i>Лебединец Д.В., Сироус М.А., Останков М.В., Рассоха И.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на маркеры иммунного воспаления ткани головного мозга при развитии ишемического инсульта.....	220

**Abstracts of the Conference of Young Scientists “Cold in Biology and Medicine 2010”
 May, 27–28th, 2010, Kharkov, Ukraine**

<i>Artuyants A.Yu.</i> Cryopreservation of <i>Candida albicans</i> Yeast-Like Fungi Under Effect of Polyene Antimycotics Nystatin on Cytoplasm Membrane.....	174
<i>Sosimchik I.A., Cherkashina D.V.</i> Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ ₁ Attenuates Rat Liver Damage During Hypothermic Storage.....	175
<i>Ventskovska O.A.</i> Influence of Different Types of Rhythmic Cold Exposures on the Sleep-Wake Cycle in Rats.....	176
<i>Kuchkov V.N.</i> Development of Cryoscopic Osmometer for Cryobiological Studies.....	177
<i>Averchenko E.A., Kavok N.S., Borovoy I.A., Pogrebnyak N.L.</i> Fluorescent Method for Estimation of Exogenous Cryoprotectant Influence on Functional Condition of Mitochondria of Isolated Hepatocytes and Bone Marrow Cells of Rats.....	178
<i>Yesipova Yu.S., Kompaniets A.M., Nikolenko A.V.</i> Human Erythrocyte Cryopreservation in Cryoprotective Media, Containing Combinations of Cryoprotectants.....	179
<i>Malyukina M.Yu., Kavok N.S., Borovoy I.A.</i> Cryoeffect of Exogenous Cryoprotectant on Dynamics of Hormone-Stimulated Changes in Transmembrane Potential of Isolated Rat's Hepatocytes Estimated with Fluorescent Method.....	180
<i>Yurchuk T.A., Bozhok G.A., Kovalenko I.F., Bondarenko T.P.</i> Hypertonia Effect on Volumetric Changes and Spatial Distribution of Lipid Drops in Adrenocorticytes.....	181
<i>Rožanova S.L.</i> Influence of Freeze-Thawing of Placenta Tissues on Reducing Activity of Their Extracts.....	182
<i>Chernobai N.A.</i> Temperature Dependence of Permeability of Adrenal Cortex Cell Membranes to Molecules of Some Cryoprotectants	183
<i>Vyazovskaya O.V., Nikolenko A.V.</i> Assessment of Cryoprotective Properties of Non-Penetrating Cryoprotectants Oxyethylated Methyl Cellosolve During Freezing of Human Erythrocytes.....	184
<i>Lyashenko T.D.</i> Cryopreservation Effect on Ability of Newborn Rat's Nerve Cells to Proliferation and Differentiation	185
<i>Markova K.V., Ramazanov V.V.</i> Anti-Hemolytic Effect of Chlorpromazine at Modification of Cytoskeleton-Membrane Complex of Human Erythrocyte Under Cold Shock Conditions	186
<i>Martyniuk I.N., Gaviley O.V.</i> Effect of Amides and Diols on Intensity of Lipid Peroxidation of Avian Sperm Under Hypothermia	187
<i>Petrenko Yu.A.</i> Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells: Differentiation Capacities and Potential for Low Temperature Preservation.....	188
<i>Bondarenko O.V.</i> Investigation of Cell Mechanisms of Mammal Cold Adaptation.....	189
<i>Govorova Yu.S., Zinchenko A.V.</i> Differential Adiabatic Scanning Calorimetry as Method of Studying Conformational Proteins Stability in Cryobiology.....	190
<i>Dimitrov A.Yu., Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Chelombitko O.V., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Cryopreservation Effect on Structural and Functional Characteristics of Fetal Liver Cells of Late Gestation Terms.....	191
<i>Zaikov V.S., Trufanova N.A., Pravdyuk A.I., Petrenko Yu.A.</i> Vitricification of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microspheres.....	192
<i>Dudetskaya G.V., Bozhok G.A., Gurina T.M., Bondarenko T.P.</i> Effect of Cryopreservation Factors on Integrity of Rat's Adrenal Cells	193
<i>Povierenna Yu.A., Petrenko Yu.A.</i> Assessment Methods of Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells	194
<i>Robilotto A.T., Baust J.M., Van Buskirk R.G., Gage A.A., Baust J.G.</i> Characterization of Cell Death and Survival Within Cryogenic Lesions Using a Tissue Engineered Human Prostate Cancer Model.....	195
<i>Baust J.M., Klossner D.P., Van Buskirk R.G., Gage A.A., Mouraviev V., Polascik T.J., Baust J.G.</i> Targeted Modulation of Integrin Expression Increases Freeze Sensitivity of aNdrogen-Insensitive Prostate Cancer	196
<i>Snyder K.K., Baust J.M., Van Buskirk R.G., Baust J.G.</i> Responses of Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes to Brief Thermal Exposures.....	197
<i>Corwin W.L., Baust J.M., Van Buskirk R.G., Baust J.G.</i> In Vitro Assessment of Apoptosis and Necrosis Following Cold Storage in a Human Airway Cell Model	198
<i>Porozhan Ye.A., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Effect of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Phenotype Characteristics of Thymus T Cells of Animals With Experimental Allergic Encephalomyelitis	199

<i>Tischenko Yu.O., Kiroshka V.V., Bondarenko T.P.</i> Stage of Histogenesis of Ovarian Tissue as Factor Determining its Morphofunctional Development After Transplantation.....	200
<i>Chizh N.A., Sleta I.V., Galchenko S.Ye., Shilo A.V., Sandomirsky B.P.</i> Modeling of Myocardium Necrosis in Rats.....	201
<i>Nosenko L.A., Sirous M.A., Ostankov M.V., Rassokha I.V., Goltsev A.N.</i> Effect of Cryopreserved Fetal Liver Cells on Immune Morphological Peculiarities of Skin at Atopic Dermatitis.....	202
<i>Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Falko O.V.</i> Cryopreserved Preparation of Cord Blood Serum in Prevention of Obstetric Antiphospholipid Syndrome.....	203
<i>Kuznetsova V.G., Zhegunov E.F.</i> Effect of Extracts From Chicken Embryos on Immune System and Heart of Rats	204
<i>Kravchenko M.A., Sirous M.A., Osetsky A.I., Goltsev A.N.</i> Assessment of Immune Modulating Activity of Lipid Placental Cryoextract.....	205
<i>Ivanov Ye.G., Gulevsky A.K.</i> Effect of Low Molecular Fraction (Below 5 kDa) of Cord Blood on Morphological Changes in Knee Articular Cartilage at Mechanical Trauma	206
<i>Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Effect of Preventively Introduced Cryopreserved Fetal Liver Cells on Indices of Immune System in C3H Mice Prior to Clinical Manifestation of Breast Cancer.....	207
<i>Byzov D.V., Sandomirsky B.P.</i> Application of Freezing and Gamma-Radiation to Create Vascular Xenoscaffolds.....	208
<i>Sidorenko O.S., Kholodnyy V.S., Gurina T.M., Legach Ye.I., Bozhok G.A.</i> Morphological Peculiarities of Primary Culture of Adrenal cells, Derived from Native and Cryopreserved Tissue Fragments.....	209
<i>Pravdyuk A.I.</i> Preservation of Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microbeads After Freeze-Thawing.....	210
<i>Gulevsky A.K., Gorina O.L., Moiseyeva N.N.</i> Investigation of Influence of Cord Blood Low-Molecular (Below 5 kDa) Fraction on Phagocytic and Metabolic Activities of Frozen-Thawed Neutrophils	211
<i>Lebeda E.A., Petrenko Yu.A.</i> Development Thermostatted Perfusion System for Stromal Cells Culture Within Three-Dimensional Porous Scaffolds.....	212
<i>Shevchenko M.V.</i> Peculiarities of Effect of Liver Extracts and Nerve Tissue of Newborn Rats on Culturing of Postnatal Nerve Cells.....	213
<i>Mutsenko V.V., Petrenko Yu.A.</i> Labeling of Adult Human Skin Fibroblasts With Carbocyanine Dyes DiI and DiO	214
<i>Babinets O.M., Gurina T.M., Kyrylyuk A.L.</i> Tasks of <i>Saccharomyces boulardii</i> Probiotics Cryopreservation	215
<i>Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Falko O.V., Chizhevsky V.V., Volina V.V.</i> Experimental Substantiation of Efficiency of Multifactor Cryopreservation Programs for Placental Tissue	216
<i>Sirous M.A., Goltsev A.N., Rassokha I.V., Goltsev K.A.</i> Application of Cryopreserved Fetal Liver Cells to Treat Autoimmune Haemolytic Anemia	217
<i>Yablanovich I.G., Zhegunov G.F.</i> Effect of Cardiotropic Preparations on Electrophysiological Parameters of Rat's Heart Under Hypothermia.....	218
<i>Goltsev K.A., Kozhina O.Yu., Safranchuk O.V., Grischenko V.I., Krivoruchko I.A.</i> Experimental Substantiation of Cord Blood Use to Treat Post-Operative Complications.....	219
<i>Lebedinets D.V., Sirous M.A., Ostankov M.V., Rassokha I.V., Goltsev A.N.</i> Effect of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Markers of Immune Inflammation of Brain Tissue Under Development of Ischemic Stroke.....	220

Криоконсервирование дрожжеподобных грибов *Candida albicans* в условиях воздействия полиенового антимикотика “Нистатина” на цитоплазматическую мембрану

А.Ю. АРТУЯНЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of *Candida albicans* Yeast-Like Fungi Under Effect of Polyene Antimycotics Nystatin on Cytoplasm Membrane

A.YU. ARTUYANTS

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

В связи с большим значением грибов рода *Candida* в инфекционной и иммунной патологии человека создаются коллекции как различных видов данных микроорганизмов, так и клинических изолятов. Наиболее эффективным методом долгосрочного хранения этих грибов является криоконсервирование. Дрожжеподобные грибы – удобная модель для изучения механизмов криоповреждения, криозащиты и репарации криоповреждения биологических объектов.

Ранее нами было показано, что на сохранность грибов рода *Candida* в процессе криоконсервирования влияют режимы охлаждения и состав среды консервирования.

Характерной особенностью строения цитоплазматической мембраны (ЦПМ) дрожжеподобных грибов является значительное (до 10%) содержание различных стиролов.

Цель работы – изучение влияния блокирования стироловых компонентов ЦПМ на криочувствительность дрожжеподобных грибов *C. albicans*.

В эксперименте использовали двухсуточную культуру клеток *C. albicans*, выращенную на сусло-агаре (8°B) при температуре 30°С. Исходная концентрация клеток составляла 2×10^7 кл/мл. Опыты по замораживанию состояли из двух серий. В первой серии к клеткам, замороженным без предварительной обработки “Нистатином”, добавляли “Нистатин” или сусло-бульон, образцы инкубировали при 30°С в течение 1 ч. После этого отмывали с помощью серийных разведений и высевали. Во второй серии эксперимента клетки инкубировали перед замораживанием с “Нистатином”. После отогрева клетки также отмывали с помощью серийных разведений и высевали. Жизнеспособность определяли “чашечным” методом Коха по колониеобразованию.

Установлено, что штамм *C. albicans* устойчив к “Кетоконазолу”, “Флюконазолу”, “Клотримазолу” и чувствителен к “Амфотерицину В” и “Нистатину”.

Минимальная ингибирующая концентрация “Нистатина” составляла 250 Ед/мл. В экспериментах использовали концентрацию “Нистатина” 200 Ед/мл. В этой концентрации “Нистатин” не вызывал гибели клеток.

Установлено, что обратимое связывание стиролов ЦПМ грибов с дополнительным образованием пор как до замораживания, так и после отогрева замороженных образцов не приводили к дополнительной гибели клеток. Это свидетельствует о незначительном количестве условно-летальных повреждений ЦПМ, нарушение репарации которых может привести к дополнительной гибели клеток.

In connection with a significant specific place in infection and human immune pathology there have been established the collections of both different species and clinical isolates of *Candida* fungi. Cryopreservation is the most effective method of long-term storage of these fungi. Yeast-like fungi are suitable model to study the mechanisms of cryodamage, cryoprotection and reparation of cryodamage of biological objects.

Previously we have demonstrated that the integrity of *Candida* fungi during cryopreservation is affected by cooling regimens and composition of cryopreservation medium.

The feature of the cytoplasm membrane (CM) structure of yeast-like fungi is significant (up to 10%) content of different styrols.

Due to the above mentioned the research aim of this study was to investigate the effect of blocking the styrol components of MCP on cryosensitivity of *C. albicans* yeast-like fungi.

In the experiments there was used 48 hrs *C. albicans* cell culture, grown with wort agar (8°B) at 30°С. Initial concentration of cells was 2×10^7 cells/ml. The experiments on freezing comprised two series. In the first one to the cells frozen with no preliminary treatment with Nystatin was added either Nystatin or wort broth, the samples were incubated at 30°С for 1 hr. Afterwards they were washed by means of serial dilutions and plated. In the second series of experiment the cells were incubated prior to freezing with Nystatin. After thawing the cells were also washed by means of serial dilutions and plated. Viability was examined by Koch's plate method on colony formation.

It has been established that *C. albicans* strain was resistant to Ketokonazol, Fluconazol, Clotrimazol and sensitive to Amphotericinum B and Nystatin.

Minimal inhibiting concentration of Nystatin was 250 U/ml. In the experiments there was used the concentration of Nystatin of 200 U/ml. Under this concentration Nystatin did not cause the cell death.

It has been established that reversible binding of styrols of fungi CM with additional formation of pores both prior to freezing and after thawing of frozen samples did not result in additional death of the cells. This confirms insignificant amount of relatively lethal impairments of CM, the disorder of reparation of those may lead to additional death of cells.

Митохондриально адресованный антиоксидант SkQ₁ снижает повреждение печени крыс при гипотермическом хранении

И.А. СОСИМЧИК, Д.В. ЧЕРКАШИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ₁ Attenuates Rat Liver Damage During Hypothermic Storage

I.A. SOSIMCHIK, D.V. CHERKASHINA

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

Поиск эффективных компонентов растворов хранения для снижения ишемически-реперфузионных повреждений печени является актуальным вопросом криобиологии и трансплантологии. Основным источником активных форм кислорода в условиях ишемии и последующей реоксигенации считаются митохондрии, поэтому митохондриально адресованные антиоксиданты, разработанные группой В.П. Скулачёва, потенциально способны снизить повреждение печени после гипотермического хранения (ГХ) и последующей нормотермической реперфузии (НР) изолированной печени.

Цель работы – исследование влияния SkQ₁ на дыхательную активность митохондрий, интенсивность перекисных процессов, содержание восстановленного глутатиона и АТФ в печени после ГХ и НР.

Печень крыс хранили в течение 24 ч при 4°C в сахарозо-солевом растворе, разработанном в ИПКиК НАН Украины, при отсутствии (контроль) или наличии 1 мкМ SkQ₁. После ГХ и НР скорость поглощения кислорода в гомогенатах печени определяли полярографически, базальный уровень и скорость накопления ТБК-активных продуктов – по образованию комплекса с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), а содержание восстановленного глутатиона (GSH) – по образованию комплекса с аллоксаном. Уровень АТФ в гомогенатах печени определяли кинетически по образованию НАДН в сопряженной реакции.

Показано, что ГХ и последующая НР приводили к разобщению окислительного фосфорилирования (снижение дыхательного контроля за счет увеличения скорости дыхания в состоянии 4), увеличению базального уровня и скорости накопления ТБК-активных продуктов, снижению содержания GSH и уровня АТФ. Присутствие в среде хранения 1 мкМ SkQ₁ приводило к повышению дыхательного контроля митохондрий как после ГХ, так и после НР. SkQ₁ не влиял на базальный уровень ТБК-активных продуктов, однако вызывал снижение скорости их накопления на этапе хранения и после НР. Уровень GSH после ГХ печени в растворе с SkQ₁ был достоверно выше контроля, но реперфузия нивелировала этот эффект. Присутствие SkQ₁ приводило к достоверному повышению содержания АТФ в печени как после ГХ, так и после НР.

Результаты работы свидетельствуют о положительном влиянии SkQ₁ на перекисные процессы в печени после ГХ и НР, которое проявлялось в снижении интенсивности накопления их продуктов и повышении уровня основного внутриклеточного антиоксиданта – GSH. При этом SkQ₁ повышал степень сопряженности окислительного фосфорилирования, что приводило к повышению содержания АТФ.

The search of effective compounds of storage solutions for the prevention of liver ischemia-reperfusion damage is the actual problem of cryobiology and transplantology. Mitochondria are considered the main source of reactive oxygen species at ischemia and following re-oxygenation, so, mitochondria-targeted antioxidants developed by Skulachev V.P. are potentially able to decrease isolated liver damage after hypothermic storage (HS) and following normothermic reperfusion (NR).

The aim of this work was to investigate the influence of SkQ₁ on the mitochondria respiratory activity, peroxidation process intensity, reduced glutathione (GSH) and ATP level in rat livers after HS/NR.

Rat livers were stored during 24 hrs at 4°C in sucrose-saline solution established in IPC&C NAS of Ukraine in the absence (control) or presence of 1 μM SkQ₁. After HS and NR oxygen consumption rate in liver homogenates was polarographically studied, basal level and accumulation rate of TBA-reactive substances was examined by formation of the complex with thiobarbituric acid (TBA), and GSH level was investigated by generation of the complex with alloxan. ATP levels in liver homogenates were determined kinetically by NADH formation in coupled reaction.

It was shown that HS and following NR of rat liver led to the uncoupling of oxidative phosphorylation (respiratory control index diminution by means of the increase of oxygen consumption rate in state 4), to the enhancement of basal level and accumulation rate of TBA-reactive substances, to the decrease of GSH and ATP levels. The presence in storage medium of 1 μM SkQ₁ resulted in the increase of mitochondria respiratory control index both after HS and NR. SkQ₁ didn't affect TBA-reactive substance basal level but caused the decrease of their accumulation rate after HS as well after NR. GSH level after liver HS in the medium with SkQ₁ was significantly higher than in the control group, however, the reperfusion abolished this effect. The presence of SkQ₁ led to significant increase of liver ATP level both after HS and NR.

The obtained results are the evidence of SkQ₁ positive effect on the peroxidation processes in the livers after HS and NR exhibited by the decrease of their product accumulation intensity and by the increase in the level of GSH, the main intracellular antioxidant. At that, SkQ₁ enhanced the degree of oxidative phosphorylation coupling that resulted in the rise of ATP level.

Влияние различных видов ритмических холодовых воздействий на цикл сон-бодрствование крыс

Е.А. ВЕНЦКОВСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Different Types of Rhythmic Cold Exposures on the Sleep-Wake Cycle in Rats

O.A. VENTSKOVSKA

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

Известно, что холодовые воздействия различной длительности и интенсивности изменяют структуру сна, являющегося одним из способов адаптации организма к действию различных факторов. Если адаптивная роль сна при длительном и непрерывном влиянии низких температур достаточно хорошо изучена, то изменения структуры сна при действии кратковременных периодических холодовых воздействий, основанных на эндогенных физиологических ритмах, остаются не исследованными.

Цель работы – изучение влияния различных видов ритмических холодовых воздействий (РХВ) на цикл сон-бодрствование крыс. Эксперименты проведены на крысах линии Вистар (7–8 мес, 220–250 г), которых содержали в отдельных клетках в звукопоглощающей камере (свет:темнота – 12:12, $T_{sp} = 22–24^{\circ}\text{C}$) со свободным доступом к воде и пище. У животных в течение двух дней проводили 2 серии из 9 охлаждений в светлое время суток по 15 мин при температуре -12°C (группа 1) или 10°C (группа 2) с интервалами 45 мин при комнатной температуре 23°C . Длительную (2 сут до и 3–4 сут после РХВ) регистрацию биоэлектрической активности мозга проводили на электроэнцефалографе фирмы “Нейрософт”. Стадирование (определение начала и окончания стадий сна) записей осуществляли по общепринятым критериям по 4-секундным эпохам.

После РХВ у животных группы 1 в светлое время суток повышалась доля парадоксального сна (ПС) с $6,2 \pm 1,2$ до $13,7 \pm 1,7$ и $12 \pm 1,5\%$ в течение первых и вторых суток соответственно. Подобные изменения представленности ПС наблюдались на фоне снижения продолжительности бодрствования с $47,4 \pm 11,1\%$, характерных для контроля, до $22,3 \pm 2,5$ и $26,7 \pm 3,6\%$ в течение первых и вторых суток соответственно. Доля медленноволнового сна (МВС) у животных группы 1 достоверно не изменялась ни в светлое, ни в темное время суток.

Во время РХВ у животных группы 2 в светлое время суток повышалась доля МВС с $56,5 \pm 5$ до $72,4 \pm 6,6$ и $84,5 \pm 6,1\%$ в течение первых и вторых суток соответственно. Увеличение представленности МВС в светлое время суток наблюдалось на фоне снижения доли бодрствования с $35,7 \pm 4,4$ до $19,5 \pm 2,5$ и $7,6 \pm 3,6\%$ в первые и вторые сутки соответственно. Суммарная длительность ПС достоверно не изменялась.

В темное время суток у обеих групп животных достоверных отличий в представленности бодрствования, МВС и ПС не наблюдалось.

Таким образом, оба вида РХВ избирательно приводят к увеличению доли либо ПС у животных группы 1 (РХВ, -12°C), либо МВС у животных группы 2 (РХВ, 10°C) за счет уменьшения времени бодрствования.

It is known that cold exposures of different duration and intensity change the structure of sleep that is one of the ways of organism adaptation to the action of various factors. The role of sleep in adaptation to prolonged and continuous exposure to low temperatures has been studied well. However, sleep structure changes under the influence of periodic short-term cold exposures, which are based on the endogenous physiological rhythms of the organism remained unexplored. Thus, the aim of our work was the study of the changes in sleep-wake cycle of rats under the influence of different types of rhythmic cold exposure (RCE).

Experiments were performed in Wistar rats (7–8 months, 220–250 g body weight), which were individually kept in cages in sound-attenuated chamber with 12:12 h light:dark cycle, $T_a = 22–24^{\circ}\text{C}$, with water and food ad libitum.

The animals during two days were undergone to 2 series of 9 cooling during light period: 15 minutes at the temperature of -12°C (group 1) or 10°C (group 2) with intervals of 45 minutes at the ambient temperature of 23°C . The registration of brain bioelectrical activity was carried out during 2 days prior to and 3–4 days after RCE. The vigilance states were visually scored according to the common criteria.

After RCE in the animals of the 1st group during light period there was observed the increased amount of paradoxical sleep (PS) from $6.2 \pm 1.2\%$ to $13.7 \pm 1.7\%$ and $12 \pm 1.5\%$ during the first and the second days, respectively. Such changes in the PS occurrence were observed against the background of wakefulness amount decreasing from $47.4 \pm 11.1\%$ in control to $22.3 \pm 2.5\%$ and $26.7 \pm 3.6\%$ in the first and the second days, respectively. Slow wave sleep (SWS) amount in the 1st group of animals did not change significantly, either in light or in dark period.

During RCE in the animals of the 2nd group during light period there was observed the increased SWS amount from $56.5 \pm 5\%$ to $72.4 \pm 6.6\%$ and $84.5 \pm 6.1\%$ during the first and the second days, respectively. Increase SWS amount during light period was observed against the background of wakefulness amount decrease from $35.7 \pm 4.4\%$ to $19.5 \pm 2.5\%$ and $7.6 \pm 3.6\%$ in the first and the second day, respectively. PS amount did not differ significantly from the control value.

In the dark period in the both groups of animals amount of wakefulness, SWS and PS did not change.

Thus, both types of RCE lead to selectively increase in either PS in the 1st group of animals (RCE, -12°C) or SWS in the 2nd group of animals (RCE, 10°C) due to reducing the time spend in wakefulness.

Разработка криоскопического осмометра для криобиологических исследований

В.Н. Кучков

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Development of Cryoscopic Osmometer for Cryobiological Studies

V.N. KUCHKOV

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

Осмометрия является аналитическим инструментом, который в настоящее время широко применяется в клинической диагностике, микробиологии, биотехнологии. В криобиологии осмотические эффекты играют ключевую роль на всех этапах криоконсервирования, определяя трансмембранные потоки ионов и воды в клетке, температуру замерзания вне- и внутриклеточной среды, структурную организацию плазматических мембран, конформационную стабильность внутриклеточных коллоидов и многое другое.

На сегодняшний день на рынке научного оборудования появляется все большее количество осмометров, разработанных для решения конкретных научных задач. Наибольшее распространение из-за надежности и простоты в использовании получили осмометры, основанные на измерении понижения точки замерзания исследуемого раствора. Криоскопические осмометры, применяемые для рутинных клинических анализов, не требуют высокой точности измерений и ограничены погрешностью измерений $\pm 4 \dots \pm 30$ мОсм, в то время как в криобиологических исследованиях существенными являются более низкие изменения осмоляльности ($\pm 0,1 \dots \pm 2$ мОсм), вызываемые выбросом или поглощением клетками микрочастиц осмотически активных веществ и воды.

Цель работы – анализ факторов, определяющих точность измерений температуры замерзания растворов в криоскопическом осмометре, и разработка прибора для регистрации малых изменений осмоляльности биологических жидкостей.

Установлено, что точность измерения температуры замерзания зависит от теплоемкости термоизмерительного элемента осмометра и времени установления теплового равновесия между термистором и исследуемым раствором. Точность измерения температуры возрастает при увеличении времени измерения в результате установления теплового баланса между термоизмерительным элементом и раствором. Для этого необходимо увеличить время кристаллизации раствора в криоскопическом осмометре.

В разработанной нами криоскопической ячейке время кристаллизации исследуемого раствора увеличено за счет уменьшения теплообмена ячейки с внешней средой и уменьшения теплоемкости конструктивных элементов ячейки. Разработанная криоскопическая ячейка позволила получить следующие технические характеристики прибора: погрешность измерения температуры замерзания $\pm 0,005^\circ\text{C}$, что соответствует погрешности изменения осмотической концентрации $\pm 2,5$ мОсм; объем образца 0,12 мл, который сопоставим с техническими характеристиками научных приборов подобного класса, существующих на рынке криоскопических осмометров.

Osmometry is an analytical tool that is widely used in clinical diagnostics, microbiology and biotechnology. In cryobiology osmotic effects play a key role during all the cryopreservation stages determining ion and water transmembrane fluxes in the cell, freezing temperature of extra- and endocellular medium, structural organization of plasma membranes, conformational stability of endocellular colloids and many others.

Today in the scientific equipment market the quantity of osmometers designed for solving the specific scientific problems is increased. The osmometers based on the freezing point depression measurement of investigated solution have the widest propagation because of the reliability and simplicity when using them. Cryoscopic osmometers applied to routine clinical analyses do not require a high accuracy of the measurements and accuracy limitation is $\pm 4 \dots \pm 30$ mOsm, while in cryobiological researches lower changes of osmolality ($\pm 0,1 \dots \pm 2$ mOsm), invoked by emission or absorption of microquantities of osmotically active compounds and water by cells are essential.

The purpose of the given work is to analyze the factors determining an accuracy of the freezing temperature measurements of solutions in cryoscopic osmometer and on this base the development of the device for recording a low osmolarity changes of biological fluids.

It is established, that accuracy of freezing temperature measurement depends on capacity of the heat-variable resistor of the osmometer and time during the heat balance between thermistor and investigated solution will be set. Temperature measurement accuracy increases with an augmentation of the measurement time as a result of the heat balance setting between the heat-variable resistor and solution. For this purpose it is necessary to increase the solution crystallization time in cryoscopic osmometer.

In the designed by us cryoscopic well the crystallization time of investigated solution is increased at the expense of reduction of heat exchange with an environment and decrease in heat capacity of structural component of the well. Designed cryoscopic well has allowed to receive the following technical characteristics of the device: inaccuracy of freezing temperature measuring is $\pm 0.005^\circ\text{C}$, that corresponds to an error of change of osmotic concentration ± 2.5 mOsm, volume of the sample is 0.12 ml, that is comparable to technical characteristics of scientific devices of the similar class existing in the cryoscopic osmometers market.

Влияние экзогенного криопротектора на функциональное состояние митохондрий изолированных гепатоцитов и клеток костного мозга крысы при оценке флуоресцентным методом

Е.А. АВЕРЧЕНКО, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ, Н.Л. ПОГРЕБНЯК
Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Fluorescent Method for Estimation of Exogenous Cryoprotectant Influence on Functional Condition of Mitochondria of Isolated Hepatocytes and Bone Marrow Cells of Rats

E.A. AVERCHENKO, N.S. KAVOK, I.A. BOROVYU, N.L. POGREBNIYAK
Institute for Scintillation Materials of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Митохондриальный флуоресцентный зонд JC-1 применяли для оценки воздействия криопротекторного агента диметилсульфоксида (ДМСО) на функциональное состояние митохондрий одиночных клеток. О величине митохондриального потенциала судили по интенсивности флуоресценции агрегатов красителя. Для оценки адекватности используемого подхода применяли модуляторы митохондриальной функции – протонофор *p*-трифлуорометоксибензилгидразон (FCCP), ротенон, органические и неорганические прооксиданты. Воздействие криопротектора на гепатоциты и культивируемые клетки костного мозга изучали в двух концентрациях: 2 и 8%. Было показано, что более чувствительными к действию ДМСО являются гепатоциты, в которых криопротектор в низких концентрациях вызывал достоверное снижение митохондриального потенциала. В клетках костного мозга достоверное падение потенциала происходило только при действии токсических концентраций ДМСО. Было также обнаружено, что действие низких концентраций криопротектора оказывает влияние на начальные этапы восприятия клетками регуляторного сигнала. Так, на модели гормон-индуцированных изменений митохондриального потенциала исследовали динамику накопления агрегатов зонда в одиночных гепатоцитах. Было установлено, что под влиянием фенилэфрина (10^{-5} М) в гепатоцитах происходит достоверное повышение интенсивности флуоресценции агрегатов зонда к 20-й минуте эксперимента, эффект сохраняется также на 30-й минуте воздействия альфа-агониста. Предынкубация клеток в присутствии 2% ДМСО полностью отменяла стимулирующее действие агента. Таким образом, использованный флуоресцентный метод позволяет выявлять физиологические изменения митохондриального потенциала одиночных клеток в ответ на регуляторное воздействие, так же как и обнаруживать эффекты экзогенных соединений.

Mitochondrial probe JC-1 has been used in fluorescent microscopy method for estimation of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotective agent influence on functional condition of mitochondria of single cells. The value of mitochondrial potential of dye aggregates has been determined by their fluorescence intensity. Modulators of mitochondrial function, protonophore *p*-trifluoromethoxy phenylhydrazine (FCCP), rotenone, organic and inorganic pro-oxidants has been used for estimation of method adequacy. Influence of cryoprotectants (with two concentrations, 2% and 8%) on hepatocytes and cultured bone marrow cells has been investigated. It was shown that hepatocytes were the most sensitive to DMSO influence, wherein the cryoprotectant caused a confident decline of mitochondrial potential under low concentration. Confident drop of fluorescence intensity in bone marrow cells was caused by toxic effect of DMSO. It has been also observed that low cryoprotectant concentration influenced an initial stage of perception by the cells of regulatory signal. Accumulation dynamics of probe aggregates in single hepatocytes has been investigated with the model of hormone-induced changes of mitochondrial potential. It has been found that in hepatocytes the effect of phenylephrine (10^{-5} M) provoked the confident increase of aggregates fluorescence intensity to the 20th min of experiment and such an effect didn't change to the 30th min of alpha-agonist influence. Pre-incubation of the cells with 2% DMSO completely eliminated an influence of hormone. Thus, this fluorescent method enables the revealing of physiological changes of mitochondrial potential of single cells, in response to regulatory influence, as well as the finding of the effects of exogenous compounds.

Криоконсервирование эритроцитов человека в криозащитных средах, содержащих комбинации криопротекторов

Ю.С. ЕСИПОВА, А.М. КОМПАНИЕЦ, А.В. НИКОЛЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Human Erythrocyte Cryopreservation in Cryoprotective Media, Containing Combinations of Cryoprotectants

YU.S. YESIPOVA, A.M. KOMPANIETS, A.V. NIKOLENKO
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Цель работы – исследование криозащитного действия сред, содержащих различные комбинации оксэтилированного глицерина со степенью полимеризации $n = 25$ (ОЭГ _{$n=25$}) с криопротекторами 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), диметилацетамидом (ДМАЦ) или диметилсульфоксидом (ДМСО) при замораживании эритроцитов человека.

Объектом исследования были эритроциты донорской крови человека, заготовленной на консерванте “Глюгидир” и хранившейся после эксфузии не более 2-х суток при 4°C. В качестве криозащитных сред использовали растворы, основу которых составлял непроникающий криопротектор ОЭГ _{$n=25$} в комбинациях с 1,2-ПД, ДМАЦ или ДМСО в соотношениях 1:1; 2:1 и 5:1 в суммарной концентрации 30%. Растворы криопротекторов готовили на фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (ФСБ), контролем являлся 30%-й раствор ОЭГ _{$n=25$} на ФСБ. Образцы эритроцитов замораживали в полиэтиленовых ампулах вместимостью 2 мл погружением в жидкий азот; отогревали на водяной бане (40°C). Сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева оценивали по показателям гемолиза, осмотической хрупкости, гематокрита, свободного и общего гемоглобина.

Наиболее высокий уровень сохранности эритроцитов по всем исследуемым показателям получен после их замораживания с криозащитной средой, содержащей 15% ОЭГ _{$n=25$} и 15% ДМАЦ. При этом уровень гемолиза составил $1,1 \pm 1\%$, показатели осмотической хрупкости – $4,3 \pm 1$ и $4,8 \pm 1,2\%$ в 0,9- и 0,6%-х растворах NaCl соответственно, содержание свободного гемоглобина – $2,2 \pm 1,1$ г/л. Применение криоконсервантов, содержащих комбинацию ОЭГ _{$n=25$} /ДМАЦ в соотношении 2:1 и 5:1, сопровождалось увеличением осмотической хрупкости эритроцитов в среднем до 13,5–15,3%.

Для растворов, содержащих комбинации ОЭГ _{$n=25$} /1,2-ПД или ОЭГ _{$n=25$} /ДМСО, наиболее высокий уровень осмотической устойчивости эритроцитов получен при соотношении криопротекторов в растворе 5:1 – $11,5 \pm 1,4$ и $13,0 \pm 0,2\%$ в 0,9% NaCl; $17,2 \pm 4,0$ и $18,7 \pm 4,0\%$ в 0,6% NaCl соответственно. При других соотношениях этих криопротекторов в растворах осмотическая хрупкость возрастала до 91–99%. По таким показателям сохранности, как процент гемолиза и содержание свободного гемоглобина в надосадке размороженных эритроцитов, значительных отличий в уровне криозащитного действия для всех исследованных криоконсервантов не установлено.

Полученные результаты указывают на перспективность исследований по разработке для замораживания эритроцитов человека криозащитных сред на основе комбинаций криопротекторов.

The research aim is to investigate cryoprotective effect of media, containing different combinations of oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 25$ (OEG _{$n=25$}) with cryoprotectants 1,2-PD, DMAC or DMSO during freezing of human erythrocytes.

The research objects were erythrocytes of human donor's blood procured with the “Glucidirum” preservative and stored after exfusion during not more than 2 days at 4°C. As cryoprotective media there were used the solutions, based on non-penetrating cryoprotectant OEG _{$n=25$} in combinations with 1,2-PD, DMAC or DMSO in the ratios: 1:1, 2:1 and 5:1 under total concentration of 30%. The solutions of cryoprotectants were prepared with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS), the control was 30% solution of OEG _{$n=25$} in PBS. The erythrocyte samples were frozen in 2 ml polyethylene ampoules by plunging into liquid nitrogen, thawed on water bath (40°C). Survival of erythrocytes after freeze-thawing was assessed on indices of hemolysis, osmotic fragility, hematocrit, free and total haemoglobin.

The highest level of erythrocyte integrity on all the studied parameters was obtained after their freezing with cryoprotective medium, containing 15% OEG _{$n=25$} and 15% DMAC. Herewith the level of hemolysis made $1.1 \pm 1\%$, the indices of osmotic fragility made $4.3 \pm 1\%$ and $4.8 \pm 1.2\%$ in 0.9 and 0.6% NaCl solutions, correspondingly, content of free haemoglobin was 2.2 ± 1.1 g/l. Application of cryoprotectants, containing the combination of OEG _{$n=25$} /DMAC in the ratios of 2:1 and 5:1 was accompanied with the rise of osmotic fragility of erythrocytes in average up to 13.5–15.3%.

For the solutions, containing combinations of OEG _{$n=25$} /1,2-PD or OEG _{$n=25$} /DMSO the highest level of osmotic resistance of erythrocytes was obtained for the ratio of cryoprotectants in the solution: 11.5 ± 1.4 for 5:1 and 13.0 ± 0.2 in 0.9% NaCl, 17.2 ± 4.0 and $18.7 \pm 4.0\%$ in 0.6% NaCl, correspondingly. Under other ratios of these cryoprotectants in the solutions osmotic fragility increased reaching 91–99%. On such integrity indices as hemolysis percentage and content of free haemoglobin in supernatant of thawed erythrocytes, no significant differences in level of cryoprotective effect for all the examined cryoprotectants were found.

The findings point to the perspective of researches on development of cryoprotective media, based on combination of cryoprotectants, for freezing of human erythrocytes.

Криовлияние экзогенного криопротектора на динамику гормон-стимулированных изменений трансмембранного потенциала изолированных гепатоцитов крыс при оценке флуоресцентным методом

М.Ю. МАЛЮКИНА, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ
Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Cryoeffect of Exogenous Cryoprotectant on Dynamics of Hormone-Stimulated Changes in Transmembrane Potential of Isolated Rat's Hepatocytes Estimated With Fluorescent Method

M.YU. MALYUKINA, N.S.KAVOK, I.A. BOROVY
Institute For Scintillation Materials of National Academy of Science of Ukraine, Kharkov

Трансмембранный потенциал изолированных гепатоцитов крыс оценивали методом флуоресцентной микроскопии по интенсивности флуоресценции производных цианиновых зондов. Было показано, что наиболее чувствительным оптическим индикатором потенциала является синтезированный зонд H-510/C2. На модели гормон-индуцированных изменений потенциала была определена возможность оценки динамики процесса. С помощью данного подхода был установлен двухфазный характер изменений мембранного потенциала при воздействии на клетки адреналина (10^{-6} М) и альфа-адреноагониста фенилэфрина (10^{-5} М). Было показано, что временной характер процесса зависит от участия в его регуляции различных сигнальных механизмов. Поскольку в литературе имеются сведения о влиянии экзогенного криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) на механизмы клеточного ионного трансмембранного транспорта, в настоящей работе изучали особенности краткосрочного гормонального воздействия на трансмембранный потенциал в присутствии ДМСО. Для оценки воздействия криопротектора на механизмы клеточной регуляции применяли ДМСО в двух концентрациях: 2 и 8%. Стимулирующий эффект фенилэфрина на фоне меньшей концентрации ДМСО сохранялся на первой фазе клеточного ответа и отсутствовал на второй. При действии токсической концентрации криопротектора действие альфа-агониста полностью блокировалось. Полученные данные свидетельствуют о влиянии экзогенного криопротектора на начальные этапы сигнальной трансдукции. Примененный подход позволяет не только оценить направленность процесса, но и выделить отдельные этапы, контролируемые разными механизмами.

Transmembrane potential of isolated rat's hepatocytes has been estimated by fluorescent microscopy on fluorescence intensity of cyanine dye derivatives. It was shown that the most sensible optical indicator of the potential was the synthesized H-510/C2 probe. The possibility of estimation of process dynamics has been found in the model of hormone-induced changes of potential. The diphasic character of membrane potential changes at adrenaline effect (10^{-6} M) and alpha-adrenoagonist effect (10^{-5} M) has been established by this method. It has been shown that temporal character of the process depends on participation of different signal mechanisms in its regulation. Since the literature data show the influence of exogenous cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) on the mechanisms of cellular ionic transmembrane transport, in this research there were studied the features of short-term hormonal influence on transmembrane potential in DMSO presence. To estimate an influence of cryoprotectants on the mechanisms of cellular regulation, DMSO was applied under two concentrations, 2% and 8%. The stimulating effect of phenylephrine was kept in the first phase of cellular response and was absent in the second one on a background of lower DMSO concentration. The effect of alpha-agonist was completely blocked under influence of toxic concentration of the cryoprotectant. The findings testify to an influence of exogenous cryoprotectant at initial stages of signal transduction. The applied approach allows not only the estimation of process orientation, but also the selection of certain stages, controlled by different mechanisms.

Влияние гипертонии на объемные изменения и пространственное расположение липидных капель адренокортикоцитов

Т.А. Юрчук¹, Г.А. Божок², И.Ф. КОВАЛЕНКО², Т.П. БОНДАРЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Hypertonia Effect on Volumetric Changes and Spatial Distribution of Lipid Drops in Adrenocorticocytes

T.A. YURCHUK¹, G.A. BOZHOK², I.F. KOVALENKO², T.P. BONDARENKO²

¹V.N. Karazin Kharkov National University

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

Показано, что при размораживании криоконсервированных фрагментов органотипической культуры надпочечников повышался базальный уровень секреции гормонов адренокортикоцитами (АК). Поскольку в процессе криоконсервирования клетки подвергаются воздействию гиперосмотических растворов солей и криопротекторов, это может спровоцировать изменения формы и объема клеток, а также повлиять на гормоносинтезирующую функцию АК. Мы предположили, что это достигается при сближении предшественника стероидных гормонов холестерина, заключенного в липидных каплях (ЛК), с местом их синтеза в митохондриях за счет объемных изменений АК, вызванных факторами криоконсервирования.

Цель работы – изучение влияния объемных изменений АК, вызванных гипертоническими растворами и последующей регидратацией, на пространственное расположение ЛК в клетках.

АК получали ферментативным способом из коры надпочечников половозрелых крыс. Идентификация ЛК в клетках была выполнена с помощью флуоресцентного красителя нильского красного (НК), имеющего широкий спектр эмиссии 450–800 нм (красный спектр является индикатором липидов, растворенных в цитоплазме и мембранах, а желтый – в ЛК). Прикрепленные на коллагеновой подложке окрашенные НК клетки обрабатывали гипертоническими растворами 1 М NaCl; 0,75 М NaCl; 0,5 М NaCl. Изотонию восстанавливали путем добавления гипертонической среды 199 с пропидиум йодидом для визуализации мертвых клеток. Проводили измерения диаметров клеток в проходящем свете, а распределение ЛК – с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) и программного обеспечения AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

В подсчет брали клетки диаметром 13–18,5 мкм. Изучение отношения объемов клетки V/V_0 показало, что в растворе 1 М NaCl клетки уменьшались от начального объема до 57%, в 0,75 М NaCl – до 60%, а в 0,5 М NaCl – до 62,3%. При изучении флуоресценции НК установили, что распределение ЛК также уменьшалось в объеме до 62, 65, 67% соответственно. После регидратации в течение 20 мин клетки во всех случаях восстанавливали объем до 85% от исходного. Достоверное различие зафиксировали в распределении ЛК в 1 М NaCl и 0,75 М NaCl, а его отсутствие – в 0,5 М NaCl. Визуально ЛК выглядели уплотненными образованиями в центре клетки.

Таким образом, инкубация в гипертонических растворах и последующая регидратация влияют на объемные изменения АК и пространственное расположения ЛК в них, что, возможно, оказывает стимулирующий эффект на синтез гормонов.

It has been shown that post-thaw basal level of hormone secretion of adrenocorticocytes (ACs) from frozen-thawed fragments of adrenal organotypic cultures increased. Since the cells during cryopreservation are subjected to the effect of hyperosmotic salt solutions and cryoprotective agents this may provoke the changes in the shape and volume of cells, as well as affect hormone-synthesizing function of ACs. We supposed that this is the result of approaching the precursor of steroid hormones, cholesterol, enclosed in lipid drops (LDs) to the site of synthesis on mitochondria due to volumetric changes of ACs caused by cryopreservation factors.

The research aim was to investigate the effect of AC volumetric changes caused by hypertonic solutions and following rehydration on spatial location of LDs in cells.

ACs were derived by enzymatic method from the adrenal cortex of mature rats. LDs were identified in cells by means of Nile red (NR) fluorescent dye possessing a wide emission spectrum of 450–800 nm (red spectrum is indicator of lipids dissolved in cytoplasm and membranes and yellow one for lipids in LDs). Adhered on collagen and NR stained cells were treated with hypertonic solutions of 1 M NaCl, 0.75 M NaCl and 0.5 M NaCl. Isotonia was restored by adding of hypertonic medium 199 with propidium iodide to visualize dead cells. Cell diameters were measured in transmitted light and distribution of LDs was examined by means of fluorescent microscopy using Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss) and the software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss).

The cells with the diameter of 13–18.5 μm were used for calculations. The study of cell volume ratio V/V_0 has shown that in 1 M NaCl solution the cell volume decreased down to 57% of initial volume, down to 60% in 0.75 M NaCl, and down to 62.3% in 0.5 M NaCl. Analysis of NR fluorescence revealed that distribution of LDs also reduced in the volume down to 62, 65 and 67%, correspondingly. After rehydration in all the cases the cells recovered the volume up to 85% of initial one during 20 min. Statistically significant difference was found in distribution of LDs in 1 M NaCl and 0.75 M NaCl and its absence in 0.5 M NaCl. Visually LDs looked like condensed formations in cell centre.

Thus incubation in hypertonic solutions and following rehydration affect volumetric changes of ACs and spatial location of LDs in them, that probably renders a stimulating effect on hormone synthesis.

Влияние замораживания-оттаивания тканей плаценты на восстановительную активность их экстрактов

С.А. РОЗАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Freeze-Thawing of Placenta Tissues on Reducing Activity of Their Extracts

S.L. ROZANOVA

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

Плацента человека благодаря наличию в ней большого количества биологически активных веществ обладает антиоксидантной активностью, что позволяет применять ее в клинической практике для лечения различных заболеваний. Показано, что экстракты плаценты человека (ЭПЧ) способны подавлять гидроксильные и супероксидные радикалы, снижать концентрацию NO, обладают восстанавливающими свойствами. Существенным ограничением для использования в клинической практике плацентарного материала является короткий срок хранения из-за развивающегося, даже в условиях гипотермии, аутолиза и изменения в связи с этим состава и свойств экстрактов. Для увеличения срока хранения тканей используют низкие температуры. Однако хранение тканей в замороженном состоянии также может приводить к изменению свойств получаемых из них экстрактов: агрегации некоторых белков, изменению их биологической активности.

ЭПЧ получали из тканей плаценты, предварительно помещенных в физиологический раствор или растворы криопротекторов (диметилсульфоксида, глицерина, 1,2-пропандиола), а затем замороженных до -196°C . Отогрев тканей проводили на водяной бане при 20°C . Криопротекторы отмывали физиологическим раствором. Восстановительные свойства ЭПЧ характеризовали по способности ингибировать окраску раствора катион-радикала ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)) и восстанавливать Fe^{3+} (с использованием метода FRAP).

Изучение ингибирования окраски раствора катион-радикала ABTS позволило охарактеризовать содержание быстро и медленно восстанавливающих антиоксидантов. Восстановительная активность ЭПЧ, измеренная методами ABTS и FRAP, коррелирует с концентрацией белка в экстрактах (коэффициенты корреляции 0,937 и 0,984 соответственно). Коэффициент корреляции между концентрацией белка и активностью медленно восстанавливающих ABTS-радикал антиоксидантов еще выше – 0,986. Исследование отдельных фракций ЭПЧ, полученных методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G 200 показало, что практически все фракции в разной степени обладают восстанавливающей активностью по отношению к ABTS-радикалу. Относительная восстанавливающая активность ЭПЧ из замороженных тканей выше, чем из свежих, что, по-видимому, связано с влиянием на конформацию белков. Наиболее близкие результаты получены для ЭПЧ из свежих и замороженных с глицерином тканей.

Human placenta is known to possess antioxidant activity due to high concentration of bioactive substances. Such property allows its application in order to cure different diseases. It has been shown that human placenta extracts (HPEs) possess reducing power, scavenges hydroxyl and superoxide radicals and lowers NO (nitric oxide) concentration. The main problem for placenta material application in clinical practice is its short shelf life due to autolysis, occurring even under hypothermia and leading to extracts' properties and composition changes. Low temperatures are widely used for tissue preserving. However storage of tissues in frozen state can lead to changes in properties of their extracts such as their biological activity and aggregation of some proteins.

HPEs were obtained from placenta tissues preliminarily plunged into either physiological or cryoprotective solution (DMSO, glycerol, 1,2-propane diol) and frozen down to -196°C . Thawing of tissues was carried out on water bath at 20°C . Cryoprotective agents were washed out with physiological solution. Reducing properties of HPEs were evaluated by ability to inhibit ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) cation radical solution absorbance and ability to reduce Fe^{+3} (FRAP).

ABTS cation radical solution absorbance inhibition assay permitted to characterize the content of antioxidants responsible for slow and fast reduction. Reducing activity of HPEs evaluated by ABTS depolarization assay and FRAP correlates with protein concentration in extracts (correlation coefficient 0.937 and 0.984, correspondingly). Correlation coefficient between protein concentration and antioxidants responsible for slow reduction is 0.986.

Investigation of separate HPEs fractions obtained using gel-chromatography method has revealed that all the fractions possess ABTS reducing activity in different extent. Relative reducing activity of HPEs obtained from frozen-thawed tissues was higher than from native one. This fact is obviously associated with protein conformational changes. The most close data are obtained for HPEs from native tissues and tissues frozen-thawed with glycerol.

Зависимость проницаемости мембран клеток надпочечников для молекул ряда криопротекторов от температуры

Н.А. ЧЕРНОБАЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Temperature Dependence of Permeability of Adrenal Cortex Cell Membranes to Molecules of Some Cryoprotectants

N.A. CHERNOBAI

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

Одним из перспективных подходов к проблеме лечения гипокортицизма является трансплантация органных, тканевых и клеточных культур коры надпочечниковых желез. Криоконсервирование – важный этап в процессе обеспечения запасов трансплантационного материала.

Цель работы – определение параметров проницаемости (коэффициентов проницаемости и энергий активации) мембран клеток надпочечников для молекул этиленгликоля (ЭГ), 1,2-бутандиола (1,2-БД), глицерина, диметилсульфоксида (ДМСО) и диметилформамида (ДМФА).

С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток надпочечников для молекул ЭГ, 1,2-БД, ДМСО, глицерина и ДМФА при температурах 35, 20 и 5°C.

Полученные результаты показали, что при 5°C проницаемость плазматических мембран клеток надпочечников для глицерина, 1,2-БД, ДМСО и ЭГ отличается незначительно и находится в диапазоне $0,45\text{--}0,49 \times 10^{-7}$ м/с, исключение составляет ДМФА, проницаемость которого почти на три порядка выше, чем проницаемость других исследованных криопротекторов. При 35°C наибольшей проницаемостью обладает ЭГ, коэффициент проницаемости которого составил $24,37 \times 10^{-7}$ м/с, наименьшей – глицерин, коэффициент проницаемости которого равен $2,52 \times 10^{-7}$ м/с. Проницаемость мембран клеток для раствора ДМФА при 35°C сравнима с проницаемостью молекул воды. По проникающей способности через мембраны клеток надпочечников при 35°C криопротекторы составили ряд: ДМФА > ЭГ > ДМСО = 1,2-БД > глицерин.

Рассчитаны значения энергий активации (E_A) процессов переноса веществ через мембраны клеток надпочечников для молекул ЭГ, глицерина, 1,2-БД, ДМСО и ДМФА. Наименьшим значением энергии активации характеризуется глицерин ($E_A = 40,80$ кДж/моль), а наибольшим – ЭГ ($E_A = 93,74$ кДж/моль).

The transplantation of organ, tissue and cellular cultures of adrenal cortex is one of the efficient approach to the problem of hypocorticism treatment. Cryopreservation is important stage for creation of the transplantable material stocks.

The research aim is to determine the permeability parameters (permeability coefficients and activation energies) of adrenal cortex cell membranes for molecules of ethylene glycol (EG), 1,2-butane diol (1,2-BD), dimethyl formamide (DMFA), dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol.

Using the method of volumetry and the modified physical-mathematical model of Kedem-Katchalsky the permeability coefficients for adrenal cortex cell membranes of EG, 1,2-BD, DMFA, DMSO and glycerol under temperatures of 35, 20 and 5°C have been determined.

The obtained results showed that at 5°C the permeability of adrenal cortex cell plasma membranes for EG, 1,2-BD, DMSO and glycerol differed slightly and were within the range of $0.45\text{--}0.49 \times 10^{-7}$ m/s, excepting DMFA, which permeability is by three orders higher, than for molecules of other studied substances. The highest value of permeability coefficient at 35°C was characteristic for EG (24.37×10^{-7} m/s), the lowest one was for glycerol (2.52×10^{-7} m/s). Permeability of cell membranes for DMFA molecules at 35°C is comparable with permeability of water molecules. According the permeating ability through adrenal cortex cell membranes at 5°C the cryoprotectants form the row: DMFA > EG > DMSO = 1,2-BD > glycerol.

The values of activation energy (E_A) for molecules of EG, 1,2-BD, DMFA, DMSO and glycerol were calculated. The lowest value of activation energy was characteristic for glycerol ($E_A = 40.80$ kJ/mol), and the highest was for EG ($E_A = 93.74$ kJ/mol).

Оценка криозащитных свойств непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллольва при замораживании эритроцитов донорской крови человека

О.В. ВЯЗОВСКАЯ, А.В. НИКОЛЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment of Cryoprotective Properties of Non-Penetrating Cryoprotectant, Oxyethylated Methyl Cellosolve, During Freezing of Human Erythrocytes

O.V. VYAZOVSKA, A.V. NIKOLENKO

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

Цель работы – исследование влияния непроникающего криопротектора оксиэтилированного метилцеллольва (ОЭМЦ) на устойчивость эритроцитов к замораживанию.

Растворы ОЭМЦ (концентрация 20 и 30%), приготовленные на 150 мМ NaCl, добавляли к эритроцитам в соотношении 1:1 по объему при температуре 20–22°C. После 45-минутной экспозиции образцы замораживали в пластиковых контейнерах (2 мл) путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 40–42°C. Степень сохранности эритроцитов оценивали по показателям гематокрита, гемолиза и осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl; содержание ионов K⁺ во внутриклеточной среде и надосадке определяли на пламенном фотометре ПАЖ-1.

Криозащитные среды, в основе которых используется непроникающий криопротектор, вызывают разную степень дегидратации клеток, что приводит к изменению их объема и, как следствие, увеличению количества клеток в исследуемых пробах, что отражается на результатах оценки показателя содержания внутриклеточного калия. После экспозиции эритроцитов в средах с 20 и 30% ОЭМЦ наблюдается статистически значимое повышение содержания внутриклеточного калия в опытных образцах на 14 ($p < 0,04$) и 19% ($p = 0,05$) соответственно, показатели гематокрита при этом снизились в среднем на 11 и 17% относительно контроля – эритроцитов, инкубированных в физиологическом растворе. Содержание калия в надосадке увеличилось с $1,65 \pm 0,16$ ммоль/л в контроле до $2,32 \pm 0,22$ ммоль/л ($p = 0,059$) после экспозиции с 20%-м раствором ОЭМЦ и до $2,95 \pm 0,18$ ммоль/л ($p < 0,04$) после экспозиции с 30%-м раствором ОЭМЦ. Выявлены достоверные отличия между этими группами ($p = 0,02$). Следовательно, уже на этапе экспозиции происходят определенные изменения в мембране, которые приводят к утечке калия из клетки. Содержание калия в надосадке после замораживания-отогрева эритроцитов с 20%-м раствором ОЭМЦ повысилось до $20,53 \pm 1,6$ и до $25,2 \pm 1,9$ ммоль/л после замораживания-отогрева с 30%-м раствором ОЭМЦ.

Установлено, что содержание калия в эритроцитах после замораживания-отогрева с 20 и 30%-ми растворами ОЭМЦ составляло 64 и 45% соответственно относительно значений до замораживания после экспозиции клеток со средами. Следует отметить, что существует корреляция между изменениями в содержании внутри- и внеклеточного калия до и после замораживания-отогрева в исследуемых образцах и осмотической устойчивостью криоконсервированных эритроцитов. По результатам исследуемых показателей 20%-й раствор ОЭМЦ при замораживании эритроцитов проявил более выраженное криозащитное действие по сравнению с 30%-м раствором ОЭМЦ.

The research aim was to study the effect of non-penetrating cryoprotectant, oxyethylated methyl cellosolve (OEMC), on freezing resistance of erythrocytes.

OEMC solutions (concentrations of 20 and 30%) prepared with 150 mM NaCl were added to erythrocytes in 1:1 ratio (v/v) with the rate of 1 ml/min at 20–22°C. After 45 min exposure the samples were frozen in 2 ml plastic containers by plunging into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 40–42°C. The survival rate for erythrocytes was assessed on hematocrit indices, osmotic fragility in 0.6 and 0.9% of NaCl solutions and hemolysis; content of K⁺ ions was examined with flame photometer PAZh-1.

Cryoprotective media, based on non-penetrating cryoprotectant, cause different rate of cell dehydration, leading to their volume change and as a consequence to rise of cell number in the studied samples, that is reflected on the results of estimation of the index of intracellular potassium content. After exposure of erythrocytes in the media with 20 and 30% OEMC there is observed a statistically significant rise in the content of intracellular potassium in the experimental samples by 24% ($p < 0.04$) and 19% ($p = 0.05$), correspondingly, herewith there was found a reduction of hematocrit indices in average by 11 and 17% *versus* the control, the erythrocytes exposed in physiological medium. Potassium content in supernatant increased from 1.65 ± 0.16 mmol/l in the control up to 2.32 ± 0.22 mmol/l ($p = 0.059$) after exposure with 20% OEMC and up to 2.95 ± 0.18 mmol/l ($p < 0.04$) after exposure with 30% OEMC. There have been found a statistically significant differences between these groups ($p = 0.02$). Therefore even at the stage of exposure the certain changes in membrane, resulting in potassium release out of cell, took place. Potassium content in supernatant after freeze-thawing of erythrocytes with 20% OEMC solution increased up to 20.53 ± 1.6 mmol/l and up to 25.2 ± 1.9 mmol/l after freeze-thawing with 30% OEMC.

It has been established that potassium content in erythrocytes after freezing with 20 and 30% OEMC solutions made 64 and 45%, correspondingly, in respect of the values prior to freezing after cell exposure with the media. It should be noted that there is a correlation between the contents of intracellular potassium before and after freeze-thawing in the studied samples and osmotic resistance of the frozen-thawed erythrocytes. On the results of the studied parameters 20% OEMC solution during freezing of erythrocytes demonstrated more manifested cryoprotective effect if compared with 30% OEMC solution.



Влияние криоконсервирования на способность нервных клеток новорожденных крыс пролиферировать и дифференцироваться

Т.Д. Ляшенко

Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

Effect of Cryopreservation on Ability of Newborn Rat Nerve Cells to Proliferation and Differentiation

T.D. Lyashenko

G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University

Исследование влияния низких температур на жизнеспособность нервных клеток (НК) различной степени зрелости имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования на способность НК новорожденных крыс к пролиферации и дифференциации *in vitro*.

НК получали из мозга новорожденных крыс. Культивирование клеток проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха в среде DMEM/F12. Замораживали НК в присутствии 10% диметилсульфоксида (ДМСО) со скоростью 1°C/мин до –80°C. После этого НК переносили в жидкий азот. Размораживали НК при 40°C. Клетки иммуноцитохимически окрашивали на маркерный белок нейронов β-тубулин III. Микроскопирование и микрофото съемку культур выполняли на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Жизнеспособность свежeweделенных НК находилась в пределах 22–55%. Культивирование на протяжении суток приводило к прикреплению небольшого количества клеток, некоторые из которых распластывались. Значительная часть неприкрепленных НК формировала крупные и плотно упакованные агрегаты. После 1–3-х суток культивирования большинство агрегатов прикреплялись и их клетки интенсивно дифференцировались и мигрировали. При этом дифференцирование происходило преимущественно в направлении клеток с морфологией нейронов. Наблюдалось образование клетками агрегатов длинных отростков, по которым происходила миграция клеток; 5–7-е сутки культивирования характеризовались формированием небольших участков монослоя. На 7–9-е сутки на поверхности глиального монослоя появлялись клетки, морфологически похожие на нейробласты. На 11–15-е сутки культивирования эти клетки образовывали колонии, которые в процессе дальнейшего культивирования увеличивались в размерах.

Жизнеспособность деконсервированных НК составляла 15–65% при снижении концентрации клеток. Как и в контрольных клетках, наблюдались прикрепление и распластывание небольшой части единичных клеток и формирование агрегатов после 1–3-х суток культивирования. Однако эти агрегаты были мелкие и рыхло упакованные. Прикрепление агрегатов происходило на 3–4-е сутки, а начало формирования участков монослоя – на 6-е сутки культивирования. На 9-е сутки культивирования монослой составлял 80% поверхности лунок. Клетки, морфологически похожие на нейробласты, образовывались на 10-е сутки. Формирование колоний клеток наблюдалось лишь на 16-е сутки культивирования (на 5 суток позже по сравнению со свежeweделенными).

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении способности к дифференциации и пролиферации свежeweделенных НК новорожденных крыс после криоконсервирования.

Investigation of the effect of low temperatures on viability of nerve cells (NCs) of different maturity is both of fundamental and applied value.

The research aim is to study the effect of cryopreservation on the ability of NCs derived from newborn rats to *in vitro* proliferation and differentiation.

NCs were derived from brain of newborn rats. Cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM/F12 medium. NCs were frozen in 10% DMSO presence with the rate of 1°C/min down to –80°C. Afterwards NCs were transferred into liquid nitrogen. NCs were thawed at 40°C. The cells were immunocytochemically stained with neuronal marker protein β-tubulin III. The cultures were investigated and images were made using microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany).

Viability of freshly isolated NCs was within the limits of 22–55%. Culturing during 24 hrs resulted in the adhesion of small number of cells, some of them flattened. The majority of non-adhered NCs formed large and tightly packed aggregates. After 1–3 culturing days the majority of aggregates adhered and their cells intensively differentiated and migrated. Herewith differentiation took place predominantly towards the cells with morphology of neurons. Aggregates' cells were found to form long out-growings being the site of cell migration; the 5–7th culturing days were characterized with the formation of small sites of monolayer. To the 7–9th days on a surface of glial monolayer the cells morphologically similar to neuroblasts appeared. To the 11–15th culturing days these cells formed colonies which increased their dimensions in the process of further culturing.

Viability of frozen-thawed NCs made 15–65% with the reduction of cell concentration. Like in the control cells there was observed adherence and flattening of small number of single cells and formation of aggregates after 1–3 culturing days. However these aggregates were small and loosely packed. Adherence of aggregates took place to the 3–4th days, and the start of monolayer sites' formation was to the 6th culturing day. To the 9th culturing day the monolayer made 80% of the wells' surface. The formation of cells morphologically similar to neuroblasts occurred to the 10th day. Formation of cell colonies was observed only to the 16th culturing day (5 days later if compared with freshly isolated ones).

The findings testify to a preservation of ability to differentiation and proliferation of freshly isolated NCs of newborn rats after cryopreservation.

Антигемолитический эффект хлорпромазина при модификации цитоскелет-мембранного комплекса эритроцитов человека в условиях холодового шока

К.В. МАРКОВА¹, В.В. РАМАЗАНОВ²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

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

Anti-Hemolytic Effect of Chlorpromazine at Modification of Cytoskeleton-Membrane Complex of Human Erythrocyte Under Cold Shock Conditions

K.V. MARKOVA¹, V.V. RAMAZANOV²

¹V.N. Karazin Kharkov National University

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

Известно, что изменение условий окружающей среды оказывает влияние на функциональные и структурные характеристики клеток. В условиях осмотического и температурного стресса эритроцитов человека происходят перестройки компонентов мембраны и/или цитоскелета относительно друг друга, а также нарушения белково-липидных связей. Чувствительность клеток к подобным стрессовым воздействиям можно направленно модифицировать.

На характер взаимодействия периферических белков с мембраной могут оказать влияние катионные амфибаты, к которым относится хлорпромазин (ХПР). Молекулярный механизм антигемолитического действия ХПР на данный момент не выяснен. Для раскрытия механизма его антигемолитического действия в условиях холодового шока эритроцитов человека мы использовали обработку модификаторами цитоскелет-мембранного комплекса. Эритроциты обрабатывали SH-реагентами: парахлормеркурийбензоатом (ПХМБ), иодацетамидом (ИАА), N-этилмалеимидом (N-ЭМ), а также 4,4-диизотиоцианстильбен-2,2-дисульфонатом (ДИДС). Для этого клетки, обработанные модификаторами, переносили в гипертонические среды различного состава (0,15 М NaCl + 0–0,9 М сахарозы) при 37°C, содержащие ХПР (в эффективной концентрации 100 мкМ), а затем подвергали действию гипертонического раствора 1,2 М NaCl (37°C) и охлаждению до 0°C.

Изучение холодового шока эритроцитов в присутствии ХПР позволило обнаружить антигемолитическую активность (АГА) данного вещества по отношению к клеткам (на уровне 53%). При модификации цитоскелет-мембранного комплекса защитное влияние ХПР в значительной степени снижается.

Уровень АГА ХПР зависит от модификатора, которым была обработана клетка на предварительных этапах.

Предварительная обработка эритроцитов ИАА снижает АГА ХПР в такой же степени, что и обработка ИАА/ПХМБ. Наибольшее угнетающее действие на АГА ХПР оказывает модификация ПХМБ и ДИДС, а наименьшее – N-ЭМ.

Скорее всего, действие ХПР имеет комплексный характер, оказывая влияние на липидные и белковые компоненты мембраны, тем самым изменяя связи между компонентами и их пространственное расположение. Полученные результаты позволяют предположить, что любая модификация цитоскелет-мембранных компонентов приводит к снижению пертурбирующей активности ХПР и, следовательно, его антигемолитической эффективности.

The change in environment is known to affect functional and structural parameters of cells. Under conditions of osmotic and temperature stress of human erythrocytes there are occurred the sterical rearrangements of the components of membrane and/or cytoskeleton, as well as the disorders in protein-lipid bonds. Cell sensitivity to similar stress effects may be target-modified.

Cation amphipates, which chlorpromazine (CPR) is referred to, may affect the character of interaction of peripheral proteins with membrane. Molecular mechanism of anti-hemolytic effect of CPR is not clear for now. To clear up the mechanism of its anti-hemolytic effect under cold shock effect we used the treatment with modifiers of cytoskeleton-membrane complex. Erythrocytes were treated with SH-reagents: parachloromercuribenzoate (PCMB), iodacetamide (IAA), N-ethyl maleimide (NEM), as well as 4,4-diisothiocyanstilbene-2,2-disulfonate (DIDS). For this aim the cells treated with the modifiers were removed into hypertonic media of different composition (0.15 M NaCl + 0–0.9 M sucrose) at 37°C, containing CPR (under effective concentration of 100 µM), and then were subjected to the effect of 1.2 M NaCl hypertonic solution (37°C) and cooling down to 0°C.

The study of cold shock of erythrocytes in CPR presence enabled the revealing of anti-hemolytic activity (AHA) for this substance in respect to the cells (at the level of 53%). During modification of cytoskeleton-membrane complex the protective effect of CPR significantly reduces.

The level of CPR AHA depends on the fact which modifier the cell was treated with at preliminary stages.

Pre-treatment of erythrocytes with IAA reduces the CPR AHA at the same rate as the one with IAA/PCMB. The most suppressing effect on CPR AHA is rendered by the modification of PCMB and DIDS, and the less influence is made by NEM.

The effect of CPR is likely of a combined character, affecting both lipid and protein components of membranes, thereby changing the bonds between the components and their spatial location. The findings enable the supposition that any modification of cytoskeleton-membrane components results in a reduction of perturbing activity of CPR and consequently its anti-hemolytic efficiency.

Влияние амидов и диолов на интенсивность перекисного окисления липидов спермы птиц при гипотермии

И.Н. МАРТЫНЮК¹, О.В. ГАВИЛЕЙ²

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

²Институт птицеводства УААН, п. Борки, Харьковская обл.

Effect of Amides and Diols on Intensity of Lipid Peroxidation of Avian Sperm Under Hypothermia

I.N. MARTYNYUK¹, O.V. GAVILEY²

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

²Institute of Poultry Farming of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Borki, Kharkov Region

Представители класса диолов и амидов широко используются как криопротекторы при криоконсервировании спермы птиц, но оказывают цитотоксическое действие на сперматозоиды уже на этапе подготовки к замораживанию, основной мишенью которого являются цитоплазматические, акросомальные и митохондриальные мембраны. Попадая *in vitro* в условия гипероксии, сперматозоиды подвергаются окислительному стрессу, который приводит к появлению морфологических дефектов, снижению их подвижности и оплодотворяющей способности. Одновременно активные формы кислорода и свободные радикалы ненасыщенных жирных кислот участвуют в важных функциональных процессах спермиев: акросомной реакции, капацитации и оплодотворении.

Исследовано содержание вторичных (гидроперекиси липидов) и конечных (основания Шиффа) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в образцах спермы петуха и индюка (10^9 клеток/мл) после инкубации в течение 30 мин при 20°C с формамидом (ФА), N,N-диметилформамидом (ДМФА), N,N-диметил-ацетамидом (ДМАЦ), этиленгликолем (ЭГ), 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), 2,3-бутандиолом (2,3-БД). Одновременно изучали подвижность и подсчитывали количество сперматозоидов с поврежденной мембраной с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Установлено, что интенсивность ПОЛ в сперме индюка выше, чем в сперме петуха, что обусловлено, видимо, более высокой текучестью и большим содержанием полиненасыщенных жирных кислот с $n = 9$ (в 2,5 раза выше) в мембранах сперматозоидов индюка.

Инкубация спермиев петуха и индюка с криопротекторами приводит к изменению изученных характеристик неиндуцированного и индуцированного ПОЛ их мембран. Степень влияния амидов и диолов на свободно-радикальное окисление липидов в сперме петуха и индюка при хранении в условиях гипотермии согласуется с уменьшением подвижности и количеством морфологически поврежденных клеток в их присутствии.

Обсуждается возможный механизм действия изученных веществ на свободно-радикальное окисление липидов спермы птиц, обусловленного как их физико-химическими свойствами, в частности мембранотропностью, проницаемостью в клетки и способностью влиять на транспорт других молекул через мембрану, так и особенностями липидного состава мембран сперматозоидов петуха и индюка.

The representatives of the class of diols and amides have been widely used as cryoprotective agents during cryopreservation of avian sperm, but they cause cytotoxic effect on spermatozoa even at the stage of preparing to freezing, the main target of which is cytoplasm, acrosomal and mitochondrial membranes. Entering *in vitro* hyperoxia conditions the spermatozoa are subjected to oxidative stress resulting in the appearance of morphological defects, reduction of their motility and fertilizing ability. Simultaneously the active oxygen species and free radicals of unsaturated fatty acids participate in important functional processes of spermatozoa: acrosomal reaction, capacitation and fertilization.

There has been investigated the content of secondary (lipid hydroperoxides) and final (Shiff bases) products of lipid peroxidation (LPO) in the samples of fowl and turkey sperm (10^9 cells per ml) after incubation for 30 min at 20°C with formamide (FA), N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-dimethyl acetamide (DMAC), ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD), 2,3-butane diol (2,3-BD). The motility and number of spermatozoa with damaged membrane were estimated simultaneously using microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany).

It has been established that the intensity of LPO in turkey sperm is higher than in fowl sperm, stipulated apparently by higher fluidity and content of polyunsaturated fatty acids with $n = 9$ (2.5 times higher) in membranes of turkey spermatozoa.

Incubation of fowl and turkey spermatozoa with cryoprotectants results in the change of the studied characteristics of non-induced and induced LPO of their membranes. The effect degree of amides and diols on free radical lipid oxidation in the sperm of fowl and turkey under hypothermic storage at hypothermia is in accordance with the lessening of the motility and amount of morphologically damaged cells in their presence.

There is discussed the possible mechanism of the effect of the studied substances on free radical lipid peroxidation of avian sperm, stipulated both with their physical and chemical properties, in particular membrane tropicity, permeation into cells, as well as the ability to affect the transport of other molecules via membrane, and the peculiarities of lipid composition of membrane of fowl and turkey spermatozoa.

Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани взрослого человека: дифференцировочные свойства и потенциал для низкотемпературного консервирования

Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells: Differentiation Capacities and Potential for Low Temperature Preservation

YU.A. PETRENKO

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

Жировая ткань (ЖТ) взрослого человека представляет собой доступный альтернативный источник мезенхимальных стромальных клеток (МСК) для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Цель работы – оценить морфологические особенности, иммунофенотип и способность МСК ЖТ к направленной дифференцировке *in vitro* в различных мезенхимальных и немезенхимальных направлениях.

Жировую ткань человека получали в результате липосакции после письменного согласия проинформированного донора. МСК ЖТ выделяли и культивировали как описано нами ранее (Петренко А.Ю. и соавт., 2008). Иммунофенотип МСК ЖТ определяли методами проточной цитометрии и иммуноцитохимии. Эффективность колониеобразования оценивали после 14 суток культивирования МСК ЖТ при посевной дозе 40 клеток/см². Адипогенную и остеогенную индукцию клеток проводили путем культивирования в течение 21 суток в средах, содержащих специфические факторы дифференцировки. Эндотелиальный потенциал клеток на различных этапах культивирования определяли при посеве клеток во внеклеточный матрикс Matrigel в среде, содержащей специфические факторы эндотелиальной дифференцировки. Дифференцировку МСК ЖТ в инсулин-продуцирующие клетки проводили при культивировании в течение 3 недель в среде с высоким (25 мМ) содержанием глюкозы в присутствии или при отсутствии экстрактов поджелудочной железы.

Было отмечено, что эффективность колониеобразования МСК ЖТ составляла около 8%. При дифференцировке поликлональных культур МСК ЖТ в адипогенном и остеогенном направлениях отмечено, что около 50% всех колоний состояли или включали клетки, дифференцированные в приведенных направлениях. Оценен остеогенный и адипогенный потенциал общей культуры МСК ЖТ на различных этапах культивирования. При оценке эндотелиального потенциала было выявлено, что МСК ЖТ на различных этапах культивирования способны к образованию капиллярноподобных структур в специфическом внеклеточном матриксе. Направленная дифференцировка МСК ЖТ в инсулин-продуцирующие клетки приводила к изменению морфологии клеток, а также образованию агрегатов, напоминающих кластеры. При этом клетки, находящиеся как в монослое, так и в агрегатах, позитивно окрашивались дитизоном, а также моноклональными антителами на инсулин и проинсулин.

Таким образом, создание низкотемпературных банков МСК ЖТ взрослого человека является перспективным для регенеративной медицины и тканевой инженерии за счет уникального мультилинейного потенциала данных клеток.

Human adult adipose tissue (AT) is accessible alternative source of mesenchymal stromal cells (MSCs) for regenerative medicine and tissue engineering.

The aim of this study was to assess the morphological properties, immunophenotype and ability of AT MSCs for *in vitro* differentiation into different mesenchymal and non-mesenchymal lineages.

Human AT was derived after liposuction procedure with the patient informed consent. AT MSCs were isolated and cultured as previously described (Petrenko A. Yu. *et al.* 2008). Immunophenotype of AT MSCs was determined by flow cytometry and immunocytochemistry. Clonogenic efficiency was assessed after 14 days of culture with the plating density 40 cells per cm². Adipogenic and osteogenic differentiation of cells was prepared by 21 days of culture in media, supplemented with specific induction factors. Endothelial potential of MSC at different stages of culture was assessed after plating of cells into extracellular matrix Matrigel in media, supplemented with specific factors of endothelial differentiation. Differentiation of AT MSCs into insulin-producing cells was prepared during 3 weeks of culture in high (25 mM) glucose medium in the presence or absence of pancreatic extracts.

It was found that AT MSCs clonogenic efficiency comprised about 8%. Differentiation of polyclonal cultures of AT MSCs into adipogenic and osteogenic directions showed that about 50% of colonies were comprised or contained cells differentiated in described directions. The osteogenic and adipogenic potential of AT MSC at different stages of culture was also assessed. AT MSC at different stages of cultivation were able to form capillary-like structures in extra-cellular matrix confirming the endothelial differentiation potential of cells. Induced differentiation of AT MSC into insulin-producing cells resulted in the change of cell morphology as well as formation of cluster-like aggregates. Both cells in monolayer and in aggregates were positively stained by ditizone, as well as by monoclonal antibodies to insulin and proinsulin.

Therefore, the development of low temperature banks of human adult AT MSC is perspective for regenerative medicine and tissue engineering due to unique multilineage potential of these cells.

Изучение клеточных механизмов холодовой адаптации млекопитающих

О.В. БОНДАРЕНКО

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Cell Mechanisms of Mammal Cold Adaptation

O.V. BONDARENKO

V.N. Karazin Kharkov National University
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Интересной моделью исследования температурной адаптации организма млекопитающих является модель искусственного гипобיוза по методу Andjus-Bachmetjev-Giaya (ABG) (Andjus R.K., Smith A.U., 1955). При этом снижается температура тела млекопитающего до 16–17°C. В целом по некоторым параметрам организма животное переходит в состояние, сходное с естественной гибернацией (Mel'nychuk S.D., Vykhoanets' V.I., 2005).

Цель работы – выявить различия в реакции клеток гомойотермных (крыс) и гетеротермных (хомяков) животных на пребывание их в состоянии искусственного гипобюза по методу ABG.

Удобным объектом исследования клеточных реакций является эритроцит. Тем более что кровеносная система зимоспящих, в отличие от других систем, продолжает функционировать и при субнулевой температуре тела гибернаторов.

Campanella *et al.* (2005), Chu и Low (2006) показали, что ключевые ферменты гликолиза могут переходить в мембранно-связанное состояние, что ингибирует их активность. При этом их связывание с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 конкурирует со связыванием гемоглобина в дезоксиформе. Мы предполагаем, что это происходит и в случае подстройки метаболизма эритроцита к гипометаболическому состоянию организма.

В работе исследовали эритроциты крыс и хомяков: контрольных, в состоянии ABG и через 2 и 24 ч после ABG, а для хомяков – также и в состоянии зимней и внесезонной спячки. Динамическое состояние цитозоля оценивали методом ЭПР спиновых зондов с использованием гидрофильного ТЕМПОНа и уширяющего агента – феррицианида калия, не проникающего в интактные эритроциты.

Обнаружено, что состояние искусственного гипобюза сопровождается выраженным снижением (20%) микровязкости цитозоля как у хомяков, так и у крыс. Через 2 ч после воздействия физиологические показатели животных не отличались от контрольных. Однако изменения динамического состояния цитозоля наблюдались вплоть до 24 ч после ABG и различались для гомойотермных и гетеротермных млекопитающих. Микровязкость цитозоля эритроцитов “зимних” и “осенних” хомяков снижалась на $28 \pm 2\%$ и динамическое состояние цитозоля было близким к характерному для зимней гибернации. У “летних” хомяков и крыс через сутки после гипобюза оно приближалось к контролю.

Снижение микровязкости цитозоля может быть следствием увеличения в нем количества свободной воды в результате перехода некоторых цитозольных компонентов в мембранно-связанное состояние или увеличения объема клетки, однако результаты световой микроскопии свидетельствуют, что объем эритроцитов существенно не изменялся.

An artificial hypobiosis model according to the Andjus-Bachmetjev-Giaya (ABG) method (Andjus R.K., Smith A.U., 1955) is an interesting one for studying mammal organism temperature adaptation. It results in mammal body temperature decrease down to 16–17°C. In general, under some physiological parameters an animal transits into a state similar to a natural hibernation (Mel'nychuk S.D., Vykhoanets' V.I., 2005).

The goal of our study is to realize if there are any differences between heterotherm and homoiotherm mammals in their cell response to the state of artificial hypobiosis according to the ABG-method.

A convenient object of cell response studies is an erythrocyte. Especially due to the fact that the circulatory system of hibernators unlike some others continues functioning even at subzero body temperature.

Campanella *et al.* (2005), Chu & Low (2006) have shown that key glycolytic enzymes (GEs) turn into membrane-bound state that inhibits its activity. Herewith the GEs compete with desoxyhemoglobin for binding centers on a band 3 cytoplasm domain. We suggest that these events occur to tune erythrocyte metabolism up organism hypometabolic state.

Erythrocytes of rats and Syrian hamsters: control, in ABG-state and 2 and 24 hrs after it were investigated. RBCs from winter-hibernating hamsters and those from non-seasonal hibernations were also investigated. A cytosol dynamic state was evaluated by EPR spin probe method using TEMPON hydrophilic probe and broadening agent potassium ferricyanide, which don't penetrate into intact erythrocytes.

It was found that hypometabolic state (ABG) induced significant (20%) cytosol microviscosity decreasing for both hamsters and rats. There were no differences in physiological state of the animals in comparison to the control group 2 hours later ABG-state. However changes in cytosol dynamic state were revealed up to 24 hours after ABG-state and were different for heterotherm and homoiotherm mammals. Cytosol microviscosity for “winter” and “autumn” hamsters decreased by $28 \pm 2\%$, and dynamic state of cytosol became similar to typical for winter hibernation state. However for “summer” hamsters and rats it became similar to the control in a day after hypobiosis.

The observed decrease in cytosol microviscosity may be a result of increasing the quantity of free water due to transition of some cytosole components into membrane-bound state. Lowering of erythrocytes' cytosol microviscosity could also be initiated by increasing of cellular volume; however, results of light microscopy indicate that volume of erythrocytes remained unchanged.

Дифференциальная адиабатическая сканирующая калориметрия как метод изучения конформационной стабильности белков в криобиологии

Ю.С. ГОВОРОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Differential Adiabatic Scanning Calorimetry as Method of Studying Conformational Proteins Stability in Cryobiology

YU.S. GOVOROVA, A.V. ZINCHENKO

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

Одним из аспектов криобиологических исследований является изучение влияния криопротекторов и низких температур на стабильность пространственной структуры белков. Проблема денатурации и фолдинга белков имеет также и медицинское значение. Причиной ряда смертельно опасных болезней человека и животных является агрегация белка, которая, в свою очередь, обусловлена неправильным фолдингом либо дестабилизацией белковых молекул.

Термодинамические характеристики процесса тепловой денатурации белков под влиянием различных физико-химических факторов свидетельствуют о конформационных изменениях молекул.

Одним из основных методов изучения тепловой денатурации белков является дифференциальная сканирующая калориметрия. Калориметрия – метод, позволяющий прямо измерять термодинамические характеристики белков и других веществ и изучать энергетику процессов, связанных с конформационными превращениями белковых молекул.

Разработанный для данных целей в Пушино дифференциальный сканирующий адиабатический микрокалориметр третьего поколения ДАСМ-4 предназначен для высокочувствительного теплового анализа жидкостей в интервале температур от 0,5 до 130°C. Принцип его действия заключается в регистрации разности тепловых мощностей, выделяемых или поглощаемых в калориметрических камерах, прогреваемых с постоянной мощностью в адиабатических условиях. Калориметр работает с компенсацией разности тепловых мощностей, возникающих в процессе нагрева исследуемой жидкости и жидкости сравнения. Зависимость сигнала, пропорционального мощности компенсации, от температуры регистрируется двухкоординатным самописцем.

Нами было исследовано влияние глицерина, 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации 5 (ОЭГ_{n=5}) на теплофизические параметры денатурации гемоглобина (Hb) быка. Показано, что присутствие глицерина в растворе Hb приводит к появлению экзотермической агрегации, выраженной тем сильнее, чем выше концентрация неэлектролита в растворе гемоглобина. На основании анализа значений полуширины пиков денатурации гемоглобина и их симметричности установлено, что 1,2-ПД понижает кооперативность процесса плавления.

Построены зависимости теплофизических параметров (температуры и энтальпии денатурации гемоглобина) от концентрации ОЭГ_{n=5} и 1,2-ПД. Снижение температуры плавления Hb с увеличением концентрации как 1,2-ПД, так и ОЭГ_{n=5} указывает на уменьшение стабильности пространственной структуры молекулы Hb. Однако ОЭГ_{n=5} в меньшей степени оказывает влияние на конформационную стабильность Hb.

The study of the effect of cryoprotectants and low temperatures on stability of the spatial structure of proteins is one of aspects of cryobiological researches. The problem of denaturation and folding of proteins is also of medical value. The aggregation of protein, which is, in turn, caused by either incorrect folding or by the destabilization of protein molecules, is the reason for a number of human and animal fatal diseases.

Thermodynamic characteristics of process of protein thermal denaturation under the effect of different physical and chemical factors make possible the estimation of conformational changes of molecules.

Differential scanning calorimetry (DSC) is one of basic methods for study of protein thermal denaturation. Calorimetry is the method for direct determination of thermodynamic parameters of proteins and other substances as well as for studying the energetics of the processes associated with conformational transitions of protein molecules.

The differential scanning adiabatic microcalorimeter of the third generation DASM-4 developed for this purpose in Pushchino, Russia, is intended for highly sensitive thermal analysis of liquids within the temperature range from 0.5 to 130°C. The principle of its action is to record the difference of thermal power, emitted or absorbed in the calorimetric chambers, heated with constant power under the adiabatic conditions. Calorimeter works with the compensation for a difference in the heat output, which appears in the process of heating, the investigated liquid and the one of comparison. The dependence of the signal, proportional to the power of compensation, on the temperature is recorded by *xy* recorder. We have investigated the influence of glycerol, 1,2-propane diol (1,2-PD) and oxyethylated glycerol with a degree of polymerization of 5 (OEG_{n=5}) on the thermophysical parameters of bovine hemoglobin (Hb) denaturation. It is shown that the glycerol presence in Hb solution leads to the exothermic aggregation, expressed more strongly the higher the concentration of the non-electrolyte in the solution of hemoglobin. Basing on the analysis of the values of the half-width of the peaks for hemoglobin denaturation and their symmetry it is established that 1,2-PD reduces the cooperativity of the melting process.

The dependences of the thermophysical parameters, (temperature and denaturation enthalpy of hemoglobin) on the concentration of OEG_{n=5} and 1,2-PD are obtained. Decreasing the Hb melting temperature along with increasing the concentration of both 1,2-PD and OEG_{n=5} indicates the decrease in stability of spatial structure of Hb molecule. However, OEG_{n=5} has a less expressed effect on conformational stability of Hb.

Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток фетальной печени поздних сроков гестации

А.Ю. ДИМИТРОВ, Н.А. БОНДАРОВИЧ, О.В. САФРАНЧУК, О.В. ЧЕЛОМБИТЬКО, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Structural and Functional Characteristics of Fetal Liver Cells of Late Gestation Terms

A.YU. DIMITROV, N.A. BONDAROVICH, O.V. SAFRANCHUK, O.V. CHELOMBITKO, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Эффективность криоконсервирования определяется исходным структурно-функциональным статусом биологического объекта. Получено много данных о влиянии фактора криоконсервирования на клетки фетальной печени (КФП) ранних сроков гестации, но сведений о поздних сроках еще недостаточно.

Цель работы – изучить характер влияния различных режимов криоконсервирования на морфофункциональные характеристики КФП поздних сроков гестации.

Суспензию клеток получали методом гомогенизации в среде 199 фетальной печени плодов мышей линии C57BL 19 суток гестации (КФП-19). Криоконсервировали КФП-19 под защитой ДМСО (в концентрации 7,5, 10 и 12,5%) со скоростью охлаждения 1°C/мин до -25°C и с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Клетки отогревали на водяной бане при 37°C. Сохранность КФП-19 оценивали по окрашиванию пропидий йодидом. Клеточный состав определяли на мазках, окрашенных азур-2 – эозином, при помощи светового микроскопа ЛОМО. Субпопуляционный состав КФП исследовали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, США) с использованием моноклональных антител к молекулам CD34, CD38, CD44, CD73 (BD Pharmingen, США). Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Сохранность КФП-19 после диссоциации составляла $74,8 \pm 2,1\%$. Проведенный морфологический анализ КФП-19 показал, что среди клеток этого срока гестации преобладали клетки эритроидного ряда, недифференцированные бластные и зрелые клетки печени, клетки гранулоцитарного и лимфоидного пула. Незначительно были представлены мезенхимальные стволовые клетки (МСК) ($CD73^+CD44^+$) и стволовые кроветворные клетки (СКК $CD34^+CD38^-$). Морфологический состав КФП-19 после криоконсервирования по выбранному режиму изменялся в зависимости от концентрации ДМСО. При 7,5%-й концентрации криопротектора сохранялись в большей степени бласты, незрелые формы гранулоцитов и гепатоцитов; 10%-й – преимущественно эритроидные и лимфоцитоподобные клетки; 12,5%-й – бластные формы. Максимальную сохранность субпопуляций СКК и МСК обеспечивала 10%-я концентрация ДМСО. Эти результаты существенно отличаются от полученных на материале другого срока гестации (Гольцев А.Н., 2009).

Таким образом, варьирование концентрации криопротектора при одной и той же скорости охлаждения позволяет селективно обеспечить сохранность (элиминацию) разных субпопуляций КФП при криоконсервировании данного биологического объекта.

Cryopreservation efficiency is determined by initial structural and functional status of biological object. There are numerous data on the effect of cryopreservation on fetal liver cells (FLCs) of early gestation terms, but the findings on later terms are not quite well reported.

The research aim is to study the character of the effect of different cryopreservation regimens on morphofunctional characteristics of FLCs of late gestation terms.

Cell suspension was obtained by homogenization in medium 199 of fetal liver of 19 gestation day C57BL mice fetuses. FLCs were cryopreserved under DMSO protection (under concentration of 7.5%, 10% and 12.5%) with cooling rate of 1°C/min down to -25°C and with following plunging into liquid nitrogen by means of programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit, IPC&C). Thawing was done on water bath at 37°C. The survival rate of FLCs was assessed on staining with propidium iodide. Cell composition was examined in smears stained with azur-2 – eosin in light microscope LOMO (Russia). Subpopulational composition of FLCs was studied with the method of flow cytometry (FACS Calibur, USA) using monoantibodies to CD34, CD38, CD44, CD 73 (BD Pharmingen, USA). Statistical processing was performed on the method of Student-Fisher.

FLCs survival rate after dissociation made $74.8 \pm 2.1\%$. The performed morphological analysis of FLC-19 has shown that among the cells of this gestation term the cells of erythroid line, non-differentiated blasts and mature liver cells, cells of granulocyte and lymphoid pool predominated. There was an insignificant amount of mesenchymal stem cells (MSCs) ($CD73^+CD44^+$) and hemopoietic stem cells (HSCs) ($CD34^+CD38^-$). Morphological composition of FLC-19 after cryopreservation according the chosen protocol changed depending on DMSO concentration. At 7.5% concentration of cryoprotectant the blasts and immature forms of granulocytes and hepatocytes were preserved better; at 10% concentration these were predominantly erythroid and lymphocyte-like cells; and blast forms at 12.5%. Maximum integrity of subpopulations of HSCs and MSCs provided 10% DMSO concentration. These results significantly differ from those obtained in the material of other gestation term (Goltsev A.N., 2009).

Thus, the varying of cryoprotectant concentration at the same cooling rate enables selectively provide the integrity (elimination) of different subpopulations of FLCs during cryopreservation of this bioobject.

Витрификация мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

В.С. ЗАЙКОВ, Н.А. ТРУФАНОВА, А.И. ПРАВДИЮК, Ю.А. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Vitrification of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microspheres

V.S. ZAIKOV, N.A. TRUFANOVA, A.I. PRAVDYUK, YU.A. PETRENKO
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Инкапсуляция клеток в макропористые альгинатные носители является перспективной областью клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. В связи с этим необходимо обратить внимание на исследование и разработку новых методов криоконсервирования, позволяющих хранить биоматериал в составе макропористых носителей длительное время.

Очевидно, традиционные технологии криоконсервирования клеточных суспензий, включающие сравнительно низкие концентрации проникающих криопротекторов и скорости охлаждения, не подходят для биоинженерных конструкций. Эти технологии разработаны для предотвращения образования внутриклеточного льда за счет выхода воды из клетки и ее кристаллизации в окружающей среде. Внеклеточная кристаллизация может повлиять на структуру носителя, что приведет к гибели включенных в него клеток. Криоконсервирование путем витрификации позволяет избежать кристаллизации как внутриклеточной, так и внеклеточной воды и связанных с этим повреждений клеток.

Цель исследования – изучение влияния криоконсервирования, основанного на витрификации, на целостность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток (МСК), инкапсулированных в альгинатные микросферы (АМ).

МСК кожи человека заключали в АМ и помещали в стандартные криопробирки. После 2-х этапов экспозиции с криозащитным раствором, содержащим 10% диметилсульфоксида, 20% этиленгликоля, 20% 1,2-пропандиола, 0,5 М сахарозы, который был ранее разработан нами для витрификации суспензии МСК и назван ДЭПС-1, образцы были заморожены путем погружения в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C и отмывали от криопротекторов путем помещения в 0,5 М раствор сахарозы с последующим добавлением раствора Хенкса. После удаления криопротекторов жизнеспособность МСК в составе АМ оценивали по двойному окрашиванию флуоресцеин диацетатом и этидиум бромидом с помощью флуоресцентной микроскопии. Метаболическую активность МСК оценивали по степени восстановления индикатора Alamar Blue™ и МТТ-тестом при культивировании в течение 24 ч.

Были определены оптимальные условия ступенчатой экспозиции и концентрации ДЭПС-1 для МСК в составе АМ. После криоконсервирования, включающего два этапа добавления ДЭПС-1 в оптимальных условиях, последующего быстрого охлаждения, отогрева и отмывки от криопротекторов МСК в составе АМ показана нормальная жизнеспособность и метаболическая активность.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности криоконсервирования МСК в составе АМ путем витрификации.

Encapsulation of cells in macroporous alginate carriers is a promising area of cell biotechnology, tissue engineering and transplantation. It is required to pay attention to the detailed study and development of the new methods of cryopreservation, allowing store biomaterial composed with macroporous carriers unchanged for a long time.

There is a reason to suppose that conventional technologies for cryopreservation of cell suspensions including the relatively low concentrations of penetrating cryoprotectants and cooling rate in the range 1–50°C/min are not suitable for bioengineering designs. These regimes were developed to prevent formation of intracellular ice due to release of water from the cell and its crystallization in the environment. However, extracellular crystallization may affect the structure of the carrier, which in turn will lead to the death of enclosed cells. Vitrification procedure may allow to avoid the crystallization of both intracellular and extracellular water and related cell injury.

The purpose of the study was to investigate the influence of cryopreservation protocol based on vitrification on the integrity and metabolic activity of mesenchymal stromal cells (MSCs) encapsulated in alginate microspheres.

The human skin MSCs were encapsulated in alginate microspheres and placed to standard cryovials. After 2 steps of exposure with cryoprotective solution containing 10% dimethyl sulfoxide, 20% ethylene glycol, 20% 1,2-propane diol, 0.5 M sucrose, which we developed recently for vitrification of MSCs in single cell suspension and called DEPS-1, samples were frozen by immersion into liquid nitrogen. Samples were warmed on water bath at 40°C and washed from cryoprotectants by placing in 0.5 M sucrose solution with subsequent adding of the Hanks' solution. After cryoprotectant removal the integrity of MSCs encapsulated in microspheres was assessed by double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide using fluorescence microscopy. The metabolic activity of MSCs was estimated by the reduction degree of indicator Alamar Blue™ and MTT-test when culturing for 24 h.

Optimal conditions of stepwise exposure and concentration of DEPS-1 for MSCs within the alginate microspheres were determined. After cryopreservation including 2 step addition of DEPS-1 in revealed optimal conditions, following rapid cooling, warming and removing the cryoprotectants the alginate encapsulated MSCs significantly kept viability and metabolic activity.

The obtained results demonstrate the availability of vitrification protocol for cryopreservation of alginate encapsulated MSCs.

Влияние факторов криоконсервирования на сохранность клеток надпочечников крыс

Г.В. ДУДЕЦКАЯ, Г.А. БОЖОК, Т.М. ГУРИНА, Т.П. БОНДАРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation Factors on Integrity of Rat Adrenal Cells

G.V. DUDETSKAYA, G.A. BOZHOK, T.M. GURINA, T.P. BONDARENKO
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В связи с развитием и внедрением в клиническую практику трансплантационных методов лечения возрос интерес к созданию криобанков клеток и тканей. Одним из важных условий получения максимального уровня сохранности деконсервированных клеток является оптимальный режим их замораживания. Поэтому возникает необходимость проведения исследований, направленных на оценку влияния скоростей охлаждения на клетки как повреждающего фактора при криоконсервировании.

Цель работы – исследовать влияние различных режимов замораживания на сохранность деконсервированных клеток надпочечников крыс в суспензии.

Суспензию клеток получали ферментативным методом. В качестве криопротектора использовали 7%-й раствор диметилсульфоксида. Для замораживания образцов применяли постоянные скорости охлаждения: 1, 5, 10, 15, 20 и 40°C/мин (до –40°C), затем образцы погружали в жидкий азот. Также замораживание образцов проводили с неконтролируемой скоростью охлаждения путем прямого погружения в жидкий азот. Отогрев осуществляли на водяной бане (37°C) до исчезновения твердой фазы. Криопротектор после замораживания-отогрева удаляли поэтапно с последующим центрифугированием. Процент жизнеспособных клеток определяли с помощью флуоресцентных красителей – флуоресцентин диацетат и пропидиум йодид. Для выявления в клетках липидных включений проводили окрашивание нильским красным. Для определения в клетках активности 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-ГСД) проводили гистохимическое окрашивание. Наличие в клетках хроматинных гранул определяли иммуногистохимическим методом для выявления хромогранина А (антитела кроличьи поликлональные к хромогранину А, Abcam, США; антитела овечьи поликлональные к кроличьему IgG, конъюгированные с Texas Red, Abcam, США).

Охлаждение образцов со скоростью 10°C/мин дает возможность получить наибольшее количество (50,9%) клеток, обладающих активностью 3β-ГСД, которая является одним из маркеров стероидпродуцирующих клеток. Использование скорости охлаждения 15°C/мин способствует сохранности наибольшего количества клеток мозгового вещества надпочечников, содержащих хромофинные гранулы и являющихся клетками.

Учитывая полученные данные, можно сделать заключение о селективном действии скоростей охлаждения на сохранность зонально-дифференцированных популяций клеток надпочечников крыс.

Due to the development and introduction into clinical practice of transplantation treatment methods the interest to establishing the cryobanks of cells and tissues has increased. One of important conditions of obtaining the maximum integrity rate of frozen-thawed cells is optimal protocol of their freezing. In this connection there has appeared the need in the studies directed to the assessment of the cooling rates effect as damaging factor for cells during cryopreservation.

The research aim is to investigate the effect of different freezing protocols on integrity of frozen-thawed rat's adrenal cells in suspension.

Cell suspension was derived by enzymatic method. As cryoprotectant 7% dimethyl sulfoxide solution was used. During freezing of the samples there were applied constant cooling rates: 1, 5, 10, 15, 20, 40°C/min (down to –40°C) and following plunging into liquid nitrogen. Additionally the samples were frozen with uncontrolled cooling rate by a direct plunging into liquid nitrogen. Warming was performed on water bath (37°C) till the disappearance of solid phase. After freeze-thawing the cryoprotectant was removed stepwise with following centrifugation. The percentage of viable cells was found by means of staining with fluorescent dyes, Fluorescein Diacetate and Propidium Iodide. To reveal lipid inclusions the cells were stained with Nile Red dye. To examine the activity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) in the cells the histochemical staining was performed. The presence of chromaffin granules in the cells was examined by immunohistochemical method for revealing chromogranin A (rabbit polyclonal antibodies to chromogranin A, Abcam, USA; sheep polyclonal antibodies to rabbit IgG, conjugated with Texas Red, Abcam, USA).

Cooling of the samples with the rate of 10°C/min makes possible to obtain the highest amount (50.9%) of cells with 3β-HSD activity, that is one of the markers steroid-producing cells. Application of cooling rate of 15°C/min contributes to the survival of the highest amount of adrenal medulla cells containing chromaffin granules.

Taking into account our findings we could hypothesize the selective effect of cooling rates on integrity of zone-differentiated populations of rat adrenal cells.

Методы оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток

Ю.А. ПОВЕРЕННАЯ, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment Methods of Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells

YU.A. POVERENNA, YU.A. PETRENKO

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

Основной показатель функциональной активности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) до и после криоконсервирования – их способность к направленной дифференцировке *in vitro*. При этом важно выбрать наиболее информативные и удобные методы оценки полноты дифференцировки.

Цель работы – провести сравнительное исследование методов оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки МСК, а также выбрать наиболее удобные и демонстративные методы, позволяющие оценить степень и полноту дифференцировки клеток при культивировании в различных условиях.

МСК жировой ткани взрослого человека выделяли и культивировали, как описали Петренко А.Ю. и соавт., 2008. Криоконсервирование клеток проводили под защитой 10% ДМСО со скоростью 1°C/мин до –80°C с последующим погружением образцов в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при 37°C, после чего оценивали дифференцировочные свойства клеток при культивировании в среде, содержащей специфические факторы остеогенной и адипогенной дифференцировки. Эффективность адипогенной дифференцировки МСК оценивали с использованием гистохимического окрашивания Oil Red O и нильским красным. В дальнейшем проводили экстракцию Oil Red O и определяли его внутриклеточное содержание спектрофотометрически. Кроме того, накопление внутриклеточных нейтральных липидов оценивали по количеству экстрагированных триацилглицеридов. Активность и количество щелочной фосфатазы в МСК после проведения остеогенной дифференцировки оценивали гистохимически по окрашиванию Fast Blue Naphtol RR Salts (Sigma, США), а также по ее внутриклеточному содержанию после экстракции с использованием биохимического набора ALP 120 (Lachema, Чехия). Накопление минерализованного матрикса оценивали с использованием набора Ca 250 (Lachema, Чехия). Все показатели были отнесены к количеству ДНК в исследованных образцах.

Установлено, что окрашивание дифференцированных клеток Oil Red O и Fast Blue, а также последующая экстракция окрашенного внутриклеточного продукта является простым и информативным методом оценки адипогенной и остеогенной дифференцировки, однако не позволяет исследовать эффективность дифференцировки МСК в составе более сложных трехмерных систем. Вместе с тем использование биохимических методов количественного определения специфического для дифференцированных клеток продукта позволяет универсально оценивать полноту дифференцировки МСК в различных системах.

The main parameter of mesenchymal stromal cells (MSCs) functional activity before and after cryopreservation is the capacity of cells for induced differentiation *in vitro*. In this case the important point is to choose the most informative and easy to use methods of differentiation efficiency assessment.

The aim of this study was to prepare the comparative analysis of assessment methods of MSC adipogenic and osteogenic differentiation, as well as to choose the most reliable and demonstrative methods, that allow to assess the completeness of cell differentiation during culture in different conditions.

Human adult adipose tissue MSC were isolated and cultured as described recently (Petrenko A. Yu. *et al.*, 2008). Cryopreservation of cells was carried out under protection of 10% Me₂SO with the cooling rate of 1°C per min down to –80°C, with following plunging into liquid nitrogen. Thawing was performed on the water bath at 37°C and cells were differentiated into adipogenic and osteogenic lineages, using media, supplemented with specific differentiation factors. The efficiency of adipogenic differentiation was assessed using histochemical staining with Oil Red O and Nile red. The intracellular content of Oil Red O was assessed by absorbance measurement of extracted Oil Red O product. Furthermore the accumulation of intracellular neutral lipids was determined by the quantity of extracted triacylglycerides. Activity or quantity of alkaline phosphatase in MSC after osteogenic differentiation was assessed using histochemical staining with Fast Blue Naphtol RR Salts (Sigma, USA), as well as by determination of its intracellular content after extraction using biochemical kit ALP120 (Lachema, Czech Republic). The accumulation of mineralized matrix was assessed with the Ca 250 assay kit (Lachema, Czech Republic). All mentioned parameters were normalized to DNA content in investigated samples.

It was established that the staining of differentiated cells with Oil Red O and Fast Blue and following extraction of stained intracellular products could be applied as informative methods of assessment of adipogenic and osteogenic differentiation, however these methods could not be used for the investigation of the MSC differentiation efficiency within more complicated three-dimensional systems. At the same time, the application of biochemical methods for quantitative determination of differentiated cell specific products allows to assess the completeness of MSC differentiation in different systems.

**Оценка клеточной смерти и выживаемости при криогенном воздействии
на тканеинженерной модели рака простаты человека**
**Characterization of Cell Death and Survival Within Cryogenic Lesions
Using a Tissue Engineered Human Prostate Cancer Model**

A. T. ROBILOTTO^{1,2}, J. M. BAUST², R. G. VAN BUSKIRK^{1,2}, A. A. GAGE³, J. G. BAUST²

¹CPSI Biotech, Inc., New York, USA

²Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, New York, USA

Основным ограничивающим фактором криохирургической абляции было определение количества погибших клеток при криогенных воздействиях. Несмотря на огромные достижения в моделировании тепловых профилей зоны замораживания с целью определения наилучшего местоположения криозонда и продолжительности криовоздействия, необходимо провести дополнительные исследования для определения процента клеток, выживших или погибших при конкретной температуре в зоне криовоздействия. Для отображения уровня клеточной гибели при определенных температурах во время криовоздействия в данной работе была использована недавно разработанная тканеинженерная модель рака простаты человека.

Клетки рака предстательной железы человека (PC-3) помещали в коллагеновые матрицы диаметром 40 мм и толщиной 3 мм с плотностью 2×10^6 клеток/мл. Перед замораживанием матрицы были сложены по 10 шт (общая высота 30 мм), помещены в солевой раствор при 37°C, а затем заморожены с использованием криозонда калибра 17 (криохирургический аппарат Galil Seed Net® Gold). Температуру в зоне криовоздействия контролировали набором термопар типа T. Через 24 ч после отогрева матрицы исследовали с помощью тестов на целостность мембран для визуализации зон полного, частичного и минимального разрушения клеток. Результаты показали, что одиночная игла криозонда калибра 17 через 15 мин криовоздействия создает эллиптическую зону замораживания длиной ~45 мм, диаметром ~34 мм в самом широком месте. Кроме того, при использовании разработанной нами модели были выявлены гибель/выживаемость клеток в зоне криовоздействия в соответствующих тепловых зонах. При температурах ниже -60°C живых клеток не было, при -40°C выжило примерно 5% клеток, при -20°C около 75%, а при температурах выше -20°C - 85% и более в одном цикле замораживания.

Показано, что при использовании тканеинженерных моделей рака простаты человека можно соотнести уровни клеточной гибели/выживаемости с конкретными тепловыми зонами в зоне криогенного воздействия. Такие данные могут предоставить врачам дополнительные параметры для оптимизации криохирургических процедур путем обеспечения необходимого воздействия на клетки абляционных температур.

Since its inception, a major limiting factor of cryosurgical ablation has been determining the extent of cell death within the cryogenic lesion. Although great strides have been made in modelling the thermal profile of the freeze zone to aid a proper probe placement and freeze duration, much remains to be accomplished in determining the percentage of cells that survive or perish at a specific isotherm within the lesion. To that end, we have employed a recently developed tissue engineered human prostate cancer model for use in mapping the levels of cell death at specific temperatures within the cryogenic lesion.

Human prostate cancer (PC-3) cells were suspended in collagen matrices 40 mm in diameter and 3 mm thick at a density of 2×10^6 cells/ml. Just prior to freezing, matrices were stacked ten high (30 mm), placed in a 37°C saline bath, and then frozen using a 17-gauge cryoprobe (Galil Seed Net® Gold cryosurgical device). Temperatures were monitored through out the cryogenic lesion using an array of type T thermocouples. At 24 hr post-thaw, matrices were assessed using membrane integrity assays to visualize the zone of complete, partial, and minimal cell destruction. Results show that a single 17-gauge cryoneedle generated an elliptical freeze zone of ~45 mm in length with a diameter of ~34 mm at its widest point after 15 min of freezing. Additionally, by utilizing our engineered model, cell death/survival was visualized within the lesion and mapped to specific thermal zones. At temperatures below -60°C no cell survival was observed, at 40°C approximately 5% of cells survive, at -20°C there was approximately 75% survival, and at temperatures above -20°C cell survival was at or above 85% for a single freeze cycle.

We have shown that by employing our engineered human prostate model we can begin to correlate levels of cell death/survival to specific thermal zones within the cryogenic lesion. Ultimately, such data may provide physicians with additional parameters for the optimization of cryosurgical procedures by ensuring proper exposure of cells to ablative temperatures.

Целенаправленное изменение экспрессии интегринов увеличивает холодovou чувствительность андроген-независимого рака простаты

Targeted Modulation of Integrin Expression Increases Freeze Sensitivity of Androgen-Insensitive Prostate Cancer

J. M. BAUST^{1,2,3}, D. P. KLOSSNER^{1,2,3}, R. G. VAN BUSKIRK^{1,2,3}, A. A. GAGE^{3,4}, V. MOURAVIEV⁵, T. J. POLASCIK⁵, J. G. BAUST^{1,2}

¹Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, New York, USA

²Department of Biological Sciences, Binghamton University, Binghamton, New York, USA

³CPSI Biotech, Inc., Owego, New York, USA

⁴Department of Surgery, SUNY Buffalo, Buffalo, New York, USA

⁵Division of Urology, Department of Surgery, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA

Криоабляция – эффективный метод первичной терапии при лечении рака предстательной железы. Однако предположение, что замораживание является неизбежным летальным стрессом, подвергается сомнению, исходя из клинического опыта и экспериментальных данных о зависимости гибели клеток от времени и температуры. Возрастная трансформация андрогензависимой (АЗ) в андроген-независимую (АН) форму является основной проблемой в терапии рака предстательной железы. АН-клетки отличаются морфологически и обладают устойчивостью ко многим видам терапии. Эту устойчивость связывают с гиперэкспрессией $\alpha\beta4$ -интегринов в результате потери андрогенного рецептора (АР). В этой связи мы исследовали влияние повышенной экспрессии интегринов в результате исчезновения АР на установленную повышенную холодovou толерантность АН – рака простаты. Кроме того, исследовано целенаправленное изменение экспрессии интегринa в сочетании с криоабляцией на гибель клеток рака простаты.

Изучение экспрессии интегринa $\alpha\beta4$ показало, что клетки АН-линии сверхэкспрессировали этот белок, при этом наблюдались морфологические изменения и увеличивались показатели адгезии. В частности, при замораживании до -15°C АН-клетки продемонстрировали повышенную устойчивость к холодovou повреждению по сравнению с АЗ-клетками (55 и 18% соответственно). Молекулярные исследования показали значительное снижение уровня каспаз 8, 9 и 3 в АН-клетках после замораживания. Ингибирование $\alpha\beta4$ -интегринов в АН-образцах приводило к увеличению активности каспаз и росту гибели клеток.

Установлено, что экспрессия интегринов существенным образом влияет на устойчивость клеток к криоабляции. Полученные данные показывают, что угнетение функционирования $\alpha\beta4$ -интегринов приводит к значительному увеличению холодovou чувствительности клеток рака простаты АН-формы. Результаты показали, что понимание роли андроген-рецептор – зависимой экспрессии интегринов в клеточном ответе на замораживание может быть основой разработки новых дополнительных подходов в лечении рака предстательной железы.

Cryoablation has emerged as a primary therapy to treat prostate cancer. While effective, the assumption that freezing serves as a ubiquitous lethal stress is challenged by clinical experience and experimental evidence demonstrating time-temperature related cell death dependence. The age-related transformation from an androgen-sensitive (AS) to an androgen-insensitive (AI) phenotype is a major challenge in the management of prostate cancer. AI cells exhibit morphological changes and treatment resistance to many therapies. This resistance has been linked with $\alpha\beta4$ integrin overexpression as a result of androgen receptor (AR) loss. As such, we investigated the influence of increased integrin expression as a result of AR loss, on the reported increased freeze tolerance of AI prostate cancer. Further, we evaluated the targeted modulation of integrin expression in combination with cryoablation on prostate cancer cell death.

Investigation into $\alpha\beta4$ integrin expression revealed that AI cell lines overexpressed this protein, thereby altering morphology and increasing adhesion characteristics. For instance, following freezing to -15°C , AI cells were found to exhibit increased resistance to freezing injury compared to AS cells (55% vs. 18%, respectively). Molecular investigations revealed a significant decrease in caspase 8, 9, and 3 levels in AI cells following freezing. Inhibition of $\alpha\beta4$ integrin in AI samples resulted in increased caspase activity and enhanced cell death.

These studies demonstrate that integrin expression significantly influences cell tolerance to cryoablation. The data demonstrate that the inhibition of $\alpha\beta4$ integrin function results in a significant increase in freeze sensitivity of AI prostate cancer cell. The results show that understanding the role of androgen-receptor related integrin expression in cell response to freezing may lead to novel options for neo-adjunctive approaches to treat prostate cancer.

Реакция неонатальных вентрикулярных кардиомиоцитов крысы на кратковременные температурные воздействия

Responses of Neonatal Rat Ventricular Cardiomyocytes to Brief Thermal Exposures

K.K. SNYDER^{1,2}, J.M. BAUST^{1,2}, R.G. VAN BUSKIRK^{1,2}, J.G. BAUST²

¹CPSI Biotech, Owego, New York, USA

²Binghamton University, Institute of Biomedical Technology Department of Biological Sciences, Binghamton, New York, USA

Криотерапия становится методом лечения для выявления и абляции предсердных и желудочковых тахикардий. Криотерапия использует сверхнизкие температуры для обратимой остановки электрофизиологической активности с целью определения целевой области для абляции с минимальным повреждением тканей. Последующее применение замораживания в целевых областях приводит к абляции клеток и устранению аритмии. Были проведены исследования *in vitro* с использованием кардиомиоцитов новорожденных крыс для изучения эффективности процедур криотерапии у млекопитающих.

В неонатальных вентрикулярных кардиомиоцитах, охлажденных до температур выше 0°C и отогретых до нормотермических температур, наблюдали восстановление показателей метаболической и сократительной активности, а также сохранение на уровне контроля внутриклеточного свободного кальция. В кардиомиоцитах, подвергнутых воздействию температур ниже -2°C, не восстанавливалась сократительная функция и значительно снижалась метаболическая активность по сравнению с контрольной группой. В кардиомиоцитах, подвергнутых воздействию температуры выше 50°C или ниже -13°C, почти полностью разрушались клеточные структуры.

Криокартинирование предоставляет более широкий диапазон обратимых воздействий по сравнению с тепловыми процедурами, что свидетельствует о том, что криотерапия может обеспечить практическую альтернативу для процедур картирования. Криотерапия также демонстрирует потенциал для абляции в сердечно-сосудистой системе.

Cryotherapy is emerging as a treatment method to identify and ablate atrial and ventricular tachyarrhythmias. Cryotherapy utilizes ultra-hypothermic temperatures to reversibly halt electrophysiological activity to identify target area for ablation with minimal damage to the tissue. Subsequent application of freezing temperatures to the target areas results in cellular ablation and elimination of the arrhythmia. An *in vitro* study was performed utilizing neonatal rat cardiomyocytes to investigate the efficacy of cryotherapy procedures in mammalian systems.

Mammalian neonatal ventricular cardiomyocytes cooled to >0°C, and rewarmed to normothermic temperature, regained metabolic and contractile activity with intracellular free calcium levels maintained near controls. Cardiomyocytes exposed to temperature <-2°C did not regain contractile function and exhibit an apparent depression in metabolic activity as compared to controls. Cardiomyocytes exposed to temperature >50°C or <-13°C yielded near complete ablation of the cellular system.

Cryomapping displays a wider range of reversibility as compared to heat-based procedures suggesting that cryotherapy may provide a more practical alternative for mapping procedures. Cryotherapy also demonstrates ablative potential in myocardial systems.

Исследование *in vitro* апоптоза и некроза при холодовом хранении на модели клеток дыхательных путей человека

In Vitro Assessment of Apoptosis and Necrosis Following Cold Storage in a Human Airway Cell Model

W.L. CORWIN^{1,2}, J.M. BAUST^{1,2}, R.G. VAN BUSKIRK^{1,2}, J.G. BAUST²

¹Cell Preservation Services, Inc., Owego, New York, USA

²Institute of Biomedical Technology, State University of New York, Binghamton, New York, USA

Достижения в области медицинских технологий повышают эффективность трансплантируемых клеток и тканей, но конкретные молекулярные реакции клеток на низкотемпературное хранение полностью не исследовано. Несмотря на большое внимание, уделяемое разработке составов растворов для перфузирования тканей при хранении для повышения их жизнеспособности, исследования сложных молекулярных изменений, которые происходят во время холодового воздействия и их последующего влияния на конечный результат, по-прежнему немногочисленны. Понимание природы клеточного стресса на молекулярном уровне имеет фундаментальное значение, поскольку такие сведения указывают на критические аспекты в процедурах хранения и трансплантации тканей, а также в развитии новых технологий и процессов в других областях клеточной биологии, биотехнологии и т.д.

Цель работы – количественная оценка уровня гибели клеток после гипотермического хранения на модели клеток легких для создания основы перспективных углубленных молекулярных исследований, направленных на улучшение процедуры трансплантации легких.

Нормальные фибробласты легких человека (IMR-90) хранили в течение 1, 2 и 3 суток при 4°C в минимальной среде, полной среде и среде ViaSpan. Жизнеспособность оценивали через 1, 2 и 3 суток после хранения с использованием метаболического индикатора Alamar Blue™. Для определения уровня вовлечения процессов апоптоза и некроза использовали проточную цитометрию и дополнительно результаты подтверждали с помощью визуализации с флуоресцентной микроскопией через 1, 4, 8 и 24 ч после хранения с помощью теста на апоптоз Vybrant®.

Анализ показал, что в образцах со средой ViaSpan жизнеспособность клеток после 24 ч хранения при 4°C составила 68% (±4%), а репопуляция – 103% (±6%) в течение 3 суток. Хранение в других средах привело к полной потере жизнеспособности клеток после 24 ч гипотермического хранения и отсутствию репопуляции. Увеличение срока хранения до 3 суток, привело к полной потере жизнеспособности клеток в каждом варианте исследований. Анализ апоптотических и некротических популяций в образцах, хранившихся в среде ViaSpan, показал, что через 8 ч после гипотермического хранения 5% клеточной популяции было в состоянии апоптоза, а 20% – в состоянии некроза. Результаты подтвердили высокий уровень чувствительности данной клеточной системы к холодовому хранению, которое привело к значительному уровню гибели клеток вследствие как апоптоза, так и некроза. Эти данные свидетельствуют о необходимости более глубокого понимания молекулярных изменений в клетках как результата холодового воздействия.

As advances in medical technology improve the ability and efficacy of cells and tissues to be transplanted, there remains a void in our knowledge of the specific molecular response of cells to low temperature storage. While much focus has been given to the formulation of solutions to perfuse the tissue during storage to increase viability, investigations into the complex molecular changes that occur during cold exposure and their subsequent effect on outcome remain limited. An understanding of cellular stress on a molecular level is of fundamental importance as such information proves critical to tissue storage and transplantation as well as to the development of new technologies and processes in non-related areas of cell biology, bioprocessing, etc. The intent of this study was to begin to quantify the levels of cell death following hypothermic storage in a lung cell model in order to establish a foundation for future in depth molecular studies in support of improved lung transplantation.

Normal human lung fibroblast (IMR-90) cells were stored statically for 1, 2 and 3 days at 4°C in basal media, complete media, and ViaSpan. Post-storage viability was assessed at 1, 2 and 3 days post-storage using the metabolic indicator Alamar Blue™. To determine the level of apoptotic and necrotic involvement, flow cytometry was performed and corroborated via visualization under fluorescent microscopy at 1, 4, 8 and 24 hours post-storage using the Vybrant® apoptosis assay.

Sample analysis revealed that cells stored in ViaSpan were 68% (±4%) viable after 24 hours of storage at 4°C and repopulated to 103% (±6%) within 3 days. The other solutions resulted in complete cell loss after 24 hours of hypothermic storage with no re-growth observed. Extension of the storage interval to 3 days resulted in complete cell loss in all conditions. Analysis of the apoptotic and necrotic populations in the ViaSpan stored samples revealed that 5% of the population was apoptotic at 8 hours post-storage while around 20% of the same population was found to be necrotic. The data revealed a high level of sensitivity to cold storage for this cell system, resulting in a significant amount of cell death, through both apoptosis and necrosis. These data highlight the critical need for a more indepth understanding of the molecular changes that occur as a result of cold exposure in cells.

Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на фенотипические характеристики Т-клеток тимуса животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬШЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Phenotype Characteristics of Thymus T Cells of Animals With Experimental Allergic Encephalomyelitis

YE.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV

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

Этиопатогенетические механизмы развития рассеянного склероза (РС), вероятно, связаны с нарушениями в главном органе иммуногенеза – тимусе, который отвечает за становление естественной толерантности в организме. Концептуальное понимание РС основывается на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ). Возможные терапевтические подходы к нейродегенеративным патологиям аутоиммунного генеза должны базироваться на использовании препаратов надсистемного действия, так как наблюдается разбалансировка нейроиммуноэндокринного блока. К таким препаратам можно отнести фетальные нервные клетки (ФНК), применение которых оптимизирует процесс криоконсервирования.

Цель исследования – изучить Т-клетки тимуса с разным фенотипом в динамике развития ЭАЭ до и после применения криоконсервированных ФНК (кФНК).

ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой. Суспензию ФНК из мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации криоконсервировали по двум режимам (P1 и P2) на программном замораживателе УОП-06. Животные были разделены на 6 групп: 1 – здоровые животные; 2 – животные с ЭАЭ; 3 – ЭАЭ + введение нативных ФНК; 4 – ЭАЭ+ кФНК (криоконсервирование согласно P1); 5 – ЭАЭ+ кФНК (P2); 6 – контроль. Суспензию клеток вводили внутривентриально на 14-е сутки развития ЭАЭ в дозе 5×10^6 клеток/животное. Субпопуляционный состав Т-клеток тимуса исследовали в динамике на 7–35-е сутки развития патологии методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD3, CD8, CD25 (FITC), CD4 (PE) (BD, США). При статистической обработке результатов применяли критерий Манна-Уитни.

Полученные результаты продемонстрировали способность кФНК влиять на субпопуляционный состав Т-клеток тимуса. Более раннее и существенное снижение клинических признаков проявления патологии наблюдалось после применения кФНК (P2). На 35-е сутки наблюдения уровень CD3⁺, CD4⁺CD25⁻, CD8⁺-клеток, иммунорегуляторный индекс приближались к контрольным значениям в группах 3, 4 и 5. Содержание CD4⁺CD25⁺-клеток к концу срока наблюдения в 3 и 5-й группах достигало контрольного уровня.

Таким образом, установлена зависимость терапевтического эффекта кФНК от восстановления содержания CD4⁺CD25⁺-клеток тимуса при развитии ЭАЭ. Рассматриваются возможные причины патогенеза ЭАЭ в разбалансировке субпопуляционного состава Т-клеток тимуса и пути коррекции подобного рода нарушений введением кФНК.

Etiopathogenetic mechanisms of multiple sclerosis (MS) development are likely related to the impairments in main organ of immune genesis, thymus, responsible for the setting of natural tolerance in an organism. Conceptual understanding of MS is based on the model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Possible therapeutic approaches to neurodegenerative pathologies of autoimmune genesis should be based in the preparations of over-system effect, since there is a misbalancing of neuroimmune endocrine block. Fetal nerve cells (FNCs) can be referred to such preparations, and cryopreservation optimizes their application possibility.

The research aim is to study thymus T-cells with different phenotype in dynamics of EAE development prior to and after use of cryopreserved FNCs (cFNCs).

EAE was induced in rats according to Davydova method. FNCs suspension derived from brains of rats' embryos of 11th gestation day were cryopreserved according to two regimens (R1 and R2) by means of programmable freezer UOP-6. The animals were divided into 6 groups: 1 – healthy animals; 2 – those with EAE, 3 – the ones with EAE + introduction of native FNCs; 4 – animals with EAE + cFNCs (cryopreserved according to R1 regimen); 5 – those with EAE + cFNCs (R2); 6 – control. Cell suspension was intraperitoneally introduced to the 14th day of EAE development in a dose of 5×10^6 cells per animal. Subpopulational composition of thymus T-cells was studied in the dynamics to the 7–35 days of pathology development by means of flow cytometry using monoantibodies to CD3, CD8, CD25 (FITC), CD4 (PE) (BD, USA). The results were statistically processed using the Mann-Whitney criterion.

The findings demonstrated the ability of cFNCs to affect subpopulational composition of thymus T-cells. Earlier and more significant reduction of clinical pathology manifestation signs was observed after use of cFNCs in R2. To the 35th observation day the level of CD3⁺, CD4⁺CD25⁻, CD8⁺ cells, immune regulatory index reached to the control values in the groups 3, 4 and 5. Content of CD4⁺CD25⁺ cells to the end of observation term in groups 3 and 5 approached to the control level.

Thus, there has been found the dependence of therapeutic effect of cFNCs on recovery of CD4⁺CD25⁺ thymus cells at EAE development. Possible causes of EAE pathogenesis in misbalancing of subpopulational composition of thymus T-cells and the ways of correction of similar impairments of cFNCs are under consideration.

Стадия гистогенеза овариальной ткани как фактор, определяющий ее морфофункциональное развитие после трансплантации

Ю.О. Тищенко², В.В. Киروشка¹, Т.П. Бондаренко¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Stage of Histogenesis of Ovarian Tissue as Factor Determining Its Morphofunctional Development After Transplantation

Yu.O. Tischenko², V.V. Kiroshka¹, T.P. Bondarenko¹

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

²V.N. Karazin Kharkov National University

До настоящего времени в репродуктивной физиологии остаются открытыми вопросы, связанные с изучением фолликулогенеза в половозрелой и неонатальной овариальной ткани в условиях трансплантации.

Цель работы – исследование динамики фолликулогенеза и стероидогенной функции овариальной ткани различных стадий гистогенеза в условиях гетеротопической трансплантации. Трансплантацию овариальной ткани осуществляли под капсулу левой почки одновременно с двухсторонней овариэктомией. Измерение концентрации гормонов в плазме крови животного-реципиента и гистологический анализ трансплантатов осуществляли на 10-, 30-, 60- и 100-е сутки после имплантации.

Показано, что при ауто трансплантации половозрелой овариальной ткани структура имплантатов морфологически соответствует физиологической норме на всех сроках наблюдения. При аллотрансплантации на гистологических срезах к 100-м суткам выявлено уменьшение числа фолликулов и образование фиброзной ткани (до 30% от всей площади трансплантата). При трансплантации неонатальной овариальной ткани отмечается качественно иная морфологическая картина развития. Уже к 10-м суткам наблюдается развитие фолликулярных полостей, которые сохраняются и на более длительных сроках после трансплантации. На 30-е сутки имплантаты неонатальной овариальной ткани представляют следующую морфологическую структуру: у 30% исследуемых особей наряду с кистами отмечаются участки, характерные для половозрелой ткани (от 3 до 10% от всей площади трансплантата), у остальных – структура соответствует склерокистозным яичникам. Увеличение сроков наблюдения приводит к полному склерозированию ткани трансплантата.

Изучение стероидогенной функции показало ее восстановление при ауто трансплантации на всех этапах эксперимента, тогда как при аллотрансплантации наблюдается снижение уровня половых гормонов по отношению к контролю, начиная с 60-х суток. При трансплантации неонатальной овариальной ткани концентрация как эстрадиола, так и прогестерона была значительно ниже физиологических значений на всех исследуемых сроках.

Можно сделать вывод, что динамика фолликулогенеза и синтез половых гормонов в трансплантатах овариальной ткани напрямую зависят от стадии ее гистогенеза. При трансплантации половозрелой овариальной ткани наблюдается сохранение ее морфофункциональных характеристик, тогда как при трансплантации неонатальной происходит атипичное морфологическое развитие на всех этапах наблюдения, при этом ее эндокринная функция отмечается только на ранних стадиях после имплантации (30 суток).

Till now in reproductive physiology the questions related to the study of follicle genesis in mature and neonatal ovarian tissue under transplantation have remained open.

The research aim is to investigate the dynamics of follicle genesis and steroidogenic function of ovarian tissue of different histogenesis stages under conditions of heterotopic transplantation. Ovarian tissue was transplanted under capsule of left kidney simultaneously with bilateral ovariectomy. Hormone concentration in blood plasma of a recipient animals and histological analysis of grafts were examined to the 10, 30, 60 and 100th days after implantation.

It has been shown that at autotransplantation of mature ovarian tissue the structure of implants morphologically corresponds to physiological norm at all observation terms. At allotransplantation on histological sections to the 100th day there was found the reduction of the number of follicles and formation of fibrous tissue (up to 30% from the total area of transplant). During transplantation of neonatal ovarian tissue there has been noted qualitatively different morphological picture of the development. Even to the 10th day there was observed the development of follicular cavities, which will be preserved as well on longer terms after transplantation. To the 30th day the implants of neonatal ovarian tissue represent the following morphological structure: in 30% of the studied individuals along with cysts there were noted the sites of tissue characteristic for mature (from 3 to 10% from total area of the graft) in the rest the structure corresponds to sclerocyst ovaries. The rise in the observation term results in a complete sclerosis of the transplant tissue.

Study of steroidogenic function has demonstrated its recovery at autotransplantation at all the stages of experiment, whilst during allotransplantation the reduction of the level of sexual hormones in respect to the control starting from the 60th day. During transplantation of neonatal ovarian tissue the concentration of both estradiol and progesterone was significantly lower than physiological values at all the studied terms.

Thus, one may conclude that dynamics of follicle genesis and synthesis of sexual hormones in the grafts of ovarian tissue directly depends on its histogenesis stage. During transplantation of mature ovarian tissue there is observed the preservation of its morphofunctional characteristics, meanwhile during transplantation of neonatal one there is occurred atypical morphological development within all the stages of observation, herewith its endocrine function is found only at early post-implantation stages (30 days).

Моделирование некроза миокарда у крыс

Н.А. ЧИЖ, И.В. СЛЕТА, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, А.В. ШИЛО, Б.П. САНДОМИРСКИЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modeling of Myocardium Necrosis in Rats

N.A. CHIZH, I.V. SLETA, S.YE. GALCHENKO, A.V. SHILO, B.P. SANDOMIRSKY
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Ежегодно в Украине регистрируется около 50 тысяч случаев инфаркта миокарда (ИМ), а смертность больных с ИМ составляет 30–50%. Изучение патогенетических механизмов ИМ и создание на этой основе современных методов лечения невозможно без адекватной экспериментальной модели. Используемая в настоящее время модель ИМ, получаемая при перевязке коронарной артерии, приводит к появлению непредсказуемых областей некроза сердечной мышцы и высокой летальности животных. Это обусловило поиск новых вариантов моделирования ИМ, позволяющих стандартизировать местоположение и размеры зоны некроза миокарда.

Цель работы – разработать способ получения предсказуемой зоны некроза миокарда методом локальной криодеструкции.

Работа проведена на 32 беспородных крысах-самках массой 180–250 г. Криовоздействие на стенку левого желудочка осуществляли в течение 30 секунд криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности –196°C. Анализ ЭКГ-исследований проводили с использованием программного обеспечения “Полиспектр”. Морфологическую картину миокарда оценивали на 1-, 7- и 14-е сутки после криовоздействия по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином.

Исследование гистологических препаратов показало, что применяемые криовоздействия приводили к развитию у экспериментальных животных зоны некроза, соответствующей диаметру криоаппликатора, с четкой локализацией деструктивных явлений в субэпикардиальной области вплоть до трансмурального поражения сердца.

По данным ЭКГ-исследования на 1-е сутки после криовоздействия у 40% животных выявлено наличие Q- или QS-зубцов с отрицательным зубцом Т в I- и avL-отведениях. Такие изменения в ЭКГ соответствуют показателям ЭКГ при переднебоковом трансмуральном инфаркте миокарда. Данная электрокардиографическая картина сохранялась на 7- и 14-е сутки после криовоздействия на миокард крыс. У остальных животных после криовоздействия отмечался лишь отрицательный зубец Т в I- и avL-отведениях, что соответствует показателям ЭКГ при субэпикардиальном инфаркте в тех же топографических областях сердца.

Экспериментальные данные показали, что криохирургическое воздействие на миокард может быть методикой стандартного воспроизведения некрозов миокарда, необходимой для биологических и медицинских исследований.

Annually in Ukraine about 50 thousands cases of myocardial infarction (MI) are registered and the death rate makes 30–50%. The study of pathogenetic mechanisms of MI and designing on this base of modern treatment methods is impossible without adequate experimental model. Presently applicated MI model, obtained by coronary artery ligation, results in appearance of unpredictable area of cardiac muscle necrosis and high lethality of animals. This fact stipulates the search of the new variants of MI modeling, that enable the standardization of location and dimensions of myocardium necrosis zone.

The research aim is to design the scheme for obtaining the predictable zone of myocardium necrosis by means of local cryodestruction.

The research was performed in 32 breedless female rats of 180–250g. Cryoeffect on a wall of left ventricle was performed for 30 sec with cryodevice with 3 mm applicator diameter and the temperature of operating surface of –196°C. The ECG studies were analyzed using the “Polyspectr” software. Morphological picture of myocardium was assessed to the 1st, 7th and 14th days after cryoeffect on histological sections stained with hematoxylin and eosin.

The study of histological preparations has demonstrated that applied cryoeffects resulted in the development in experimental animals of necrosis zone corresponding to the diameter of cryoapplicator with distinct localization of destructive phenomena in subepicardial area up to transmural lesion of heart.

According to the data of ECG studies to the 1st day after cryoeffect in 40% of animals there was found the presence of either Q or QS deflections with negative T deflection in I and avL leads. These changes in ECG correspond to the ECG indices at anteriolateral transmural myocardial infarction. This ECG picture was kept to the 7th and 14th days after cryoeffect on rat myocardium. In the rest of animals after cryoeffect there was noted just a negative T deflection in I and avL leads, corresponding to the indices of ECG at subepicardial infarction at the same topographic cardiac areas.

Experimental data have shown that cryosurgical effect on myocardium may be the method of standard simulation of myocardium necrosis, necessary for biological and medical investigations.

Влияние криоконсервированных клеток фетальной печени на иммуноморфологические особенности кожи при atopическом дерматите

Л.А. НОСЕНКО, М.А. СИРОУС, М.В. ОСТАНКОВ, И.В. РАССОХА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Fetal Liver Cells on Immune Morphological Peculiarities of Skin at Atopic Dermatitis

L.A. NOSENKO, M.A. SIROUS, M.V. OSTANKOV, I.V. RASSOKHA, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Атопический дерматит (АД) является важной медико-социальной проблемой, значимость которой определяется неуклонным ростом заболеваемости, его хроническим, рецидивирующим течением и сложностью в проведении терапии. Это системное заболевание связано не только с реакцией иммунокомпетентных клеток на антигены *in situ*, но и отображает “возбуждение” иммунной системы в целом. Перспективным методом лечения АД, как иммунозависимой патологии, могут быть препараты из фетальных тканей. Высокая эффективность этих препаратов как иммунокорректоров при различных аутоиммунных заболеваниях обусловила необходимость их криоконсервирования и длительного хранения для дальнейшего использования в клинической практике.

Цель работы – экспериментальное обоснование возможности применения криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) для лечения АД.

Экспериментальный АД моделировали на 6-месячных крысах линии Вистар 6 месяцев по методу Залкан П.М. и Ивлевой Е.А. (1965). Ежедневно в течение 21-х суток в кожу спины крысы втирали 5%-й спиртово-ацетоновый раствор динитрохлорбензола. КФП криоконсервировали по методу Цуцаевой А.А. и соавт. (1983). Степень выраженности АД оценивали от 0 до 5 баллов по общему состоянию, поведению, а также по толщине кожной складки и проявлению воспаления на 1-, 3-, 5- и 7-е сутки после сенсibilизации и лечения. Для выявления иммунных нарушений на локальном уровне проводили иммунофенотипирование клеток кожного инфильтрата методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) и моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD16, CD72, CD4, CD25 (BD Pharmingen, США). Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента-Фишера.

Морфологический субстрат клеточного инфильтрата участка манифестации у крыс с АД характеризовался преобладающим большинством Т-хелперов/индукторов с недостаточной численностью Т-супрессорно-цитотоксических. На 5-е сутки у крыс с АД после лечения криоконсервированными КФП были отмечены снижение кожной воспалительной реакции, а также количества лимфоцитов и клеток Лангерганса. Наблюдали повышение хемотаксиса нейтрофилов и моноцитов, восстановление фагоцитоза, повышение субпопуляции Т-супрессоров и активности естественных киллеров, транзиторное повышение содержания IgA и снижение концентрации IgE и Т-регуляторов.

Таким образом, криоконсервированные клетки фетальной печени оказывали выраженный эффект при лечении АД.

Atopic dermatitis (AD) is an important medical and social problem, the value of which is determined by constant growth of morbidity, its chronic, recurrent course and complexity in therapy performance. This system disease is not only associated with reaction of immune competent cells (ICCs) on AG *in situ*, but also it reflects “excitation” of the whole immune system. The perspective method of AD treatment as immune dependent pathology could be the application of fetal tissues preparations. Their high efficiency as immune correcting agents under different autoimmune diseases, stipulated the need of their cryopreservation and long-term storage for following use in clinical practice.

The research aim is to experimentally substantiate the possible use of cryopreserved fetal liver cells (FLC) to treat AD.

Experimental AD as the model of delayed response was initiated in Wistar rats aged of 6 months according to the method of Zalkan P.M. and Ivleva E.A. (1965). Each day during 21 day the 5% alcohol-acetone solution of dinitrochlorobenzol was applied into back skin of rats. FLCs were cryopreserved according to the method of Tsusayeva A.A. *et al.* (1983). The manifestation degree of AD was examined by animal’s general state, behaviour, as well as on the thickness of skin fold and manifested inflammation to the 1st, 3th, 5th and 7th days after sensibilization and treatment, assigning the points from 0 to 5. To reveal immune disorders at a local level there was performed an immune phenotyping of skin infiltrate cells by means of flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA) and monoantibodies to CD3, CD4, CD8, CD16, CD72, CD4 and CD25 molecules (BD Pharmingen, USA). The obtained results were statistically processed by parametric method using the Student-Fisher t-criterion.

Morphological substrate of cell infiltrate of the manifestation site in the rats with AD was characterized with prevailing majority of helper/inducer T cells with insufficient number of suppressor-cytotoxic T cells. To the 5th day in rats with AD after treatment with cryopreserved FLCs was found the reduction of skin inflammatory reaction as well as number of lymphocytes and Langerhans cells. There was observed the rise in chemotaxis of neutrophils and monocytes, recovery of phagocytosis, increase in T suppressor subpopulation and activity of natural killers; transitory enhancement of IgA content and reduction of IgE and regulator T cell concentration.

Thus the cryopreserved cells of fetal liver contributed significantly in AD treatment.

Криоконсервированный препарат сыворотки кордовой крови в профилактике акушерского антифосфолипидного синдрома

В.Ю. ТРИФОНОВ, В.Ю. ПРОКОПЮК, О.В. ФАЛЬКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreserved Preparation of Cord Blood Serum in Prevention of Obstetric Antiphospholipid Syndrome

V.YU. TRIFONOV, V.YU. PROKOPYUK, O.V. FALKO

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

Акушерский антифосфолипидный синдром (АФС) – актуальная проблема современного акушерства, поскольку он приводит к невынашиванию, плацентарной дисфункции, гестозу, синдрому потери плода и является причиной неудач в репродуктивных технологиях. Несмотря на то, что антифосфолипидные антитела (аФЛ) негативно влияют как на эндометрий, так и на предэмбриональный эмбрион, лечение начинается, как правило, только с конца I триместра беременности. В работе рассмотрена возможность прегравидарной профилактики осложнений АФС с использованием криоконсервированного препарата кордовой крови “Криоцелл-криокорд”, способного позитивно влиять на иммунную, репродуктивную системы и реологические свойства крови.

В нативных и криоконсервированных образцах определяли содержание маркерных компонентов сыворотки кордовой крови: хорионического гонадотропина, альфа-фетопропротеина, пролактина. Изучали влияние препарата “Криоцелл-криокорд” на изолированные иммунокомпетентные клетки в реакции бласттрансформации лимфоцитов. В эксперименте с моделированием АФС на лабораторных животных изучали влияние препарата на состояние гемостаза, иммунной и репродуктивной систем. Исследовали эффективность препарата “Криоцелл-криокорд” в прегравидарной подготовке женщин с привычным невынашиванием, обусловленным АФС.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что оптимальным режимом криоконсервирования для сыворотки кордовой крови является быстрое замораживание и хранение при -20°C , обеспечивающее сохранность и активность эссенциальных соединений в получаемом препарате “Криоцелл-криокорд”. При АФС наблюдаются атрофические изменения, микротромбозы в эндометрии, яичниках, истощение тимуса. Применение препарата “Криоцелл-криокорд” позволяет ликвидировать как характерные для АФС проявления гиперкоагуляции, нарушения иммунной системы, так и изменения в органах репродуктивной системы. Эффекты “Криоцелл-криокорда” реализуются через центральные механизмы, а не на уровне компонентов крови, и сохраняются в течение нескольких овариальных циклов. Применение препарата в прегравидарной подготовке женщин с АФС позволяет снизить концентрации аФЛ в крови, нормализовать овариально-менструальный цикл, улучшить состояние эндометрия, снизить частоту осложнений беременности (невынашивание, плацентарная дисфункция, гестоз, синдром задержки развития плода), улучшить состояние новорожденных, прогнозировать исход беременности и родов.

An obstetric antiphospholipid syndrome (APS) remains an actual problem of current obstetrics and is often accompanied with such pathology as: premature delivery, placental dysfunction, hestosis, syndrome of fetus losing and is a reason of failures in reproductive technologies. In spite of the fact that antiphospholipid antibodies (aPL) negatively affect both endometrium and pre-implantation embryo a treatment begins as a rule only from the end of the first pregnancy trimester. In the work the possibility of pre-conceptional prevention of obstetric antiphospholipid syndrome complications with using cryopreserved preparation of cord blood “Cryo-cell-Cryocord”, which is capable to positively affect immune, reproductive system and rheological blood properties was studied.

The content of marker components such as: chorionic gonadotropin, α -fetoprotein and prolactin was investigated in native and cryopreserved samples. The effect of “Cryo-cell-Cryocord” preparation on isolated immune competent cells in reaction of lymphocyte blast-transformation was studied. In the experiment with APS modeling in laboratorial animals the preparation effect on homeostasis state, immune and reproductive system was studied. The efficiency of “Cryo-cell-Cryocord” at pre-conceptional preparation of women with recurrent premature delivery, due to APS was investigated.

The obtained results testified to the fact that optimal regimen of cryopreservation for cord blood serum was rapid freezing and storage under -20°C , providing viability and activity of essential substances in derived “Cryo-cell-Cryocord”. Under APS there were observed atrophic changes, microthrombosis in endometrium, ovaries and thymus exhaustion. Application of “Cryo-cell-Cryocord” enables to eliminate not only characteristic for APS hypercoagulation manifestations and disorders of immune system, but also changes in reproductive system organs. The effects of “Cryo-cell-Cryocord” are implemented by central mechanisms, but not at blood components’ level, and are preserved for several ovarian cycles. Application of “Cryo-cell-Cryocord” at pre-conceptional preparation of patients with APS enables to reduce aPL antibodies concentrations in woman blood, normalize ovarian-menstrual cycle, improve endometrium state, decrease frequency of pregnancy complications such as: premature delivery, placental dysfunction, gestosis, syndrome of fetal growth retardation, improve newborn state and forecasting of pregnancy and delivery incomes.

Влияние экстрактов из эмбрионов кур на иммунную систему и сердце крыс

В.Г. КУЗНЕЦОВА, Г.Ф. ЖЕГУНОВ
Харьковская государственная зооветеринарная академия

Effect of Extracts From Chicken Embryos on Immune System and Heart of Rats

V.G. KUZNETSOVA, E.F. ZHEGUNOV
Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov

В настоящее время актуальна проблема профилактики и лечения иммунодефицитов у животных и человека. Особое внимание уделяется созданию новых эффективных лекарственных средств для лечения и коррекции иммунного статуса организма.

Широкое распространение получило использование биопрепаратов, приготовленных на основе эмбриональных и фетальных тканей. Это обусловлено тем, что такие ткани обладают свойствами, характерными для ранних стадий развития.

Цель работы – получение различных экстрактов из эмбрионов кур, определение их иммуностимулирующего действия, а также изучение влияния таких экстрактов на сократительные свойства миокарда крыс.

Иммуностимулирующую активность исследуемых экстрактов проверяли на крысах с экспериментальной лейкопенией. Животным вводили криоэкстракты цельные, после денатурации белка, гидрофобные фракции экстрактов.

Установлено, что экстракты из эмбрионов кур проявляют иммуностимулирующую активность. Количество лейкоцитов в крови экспериментальных животных восстанавливается быстрее, чем у контрольных. При введении экспериментальным животным экстрактов после денатурации белка установлено, что скорость восстановления лейкоцитов, а также пролонгированность действия экстрактов увеличиваются. При введении гидрофобной фракции исследуемых экстрактов отмечена наибольшая их активность. Количество лейкоцитов восстанавливалось до нормы уже на вторые сутки после введения и оставалось на высоком уровне значительно дольше. Во всех случаях отмечен более выраженный эффект после введения криоэкстрактов.

Для изучения влияния исследуемых экстрактов на сердечную деятельность крыс применяли метод электрокардиографического исследования. Отмечено, что в течение эксперимента показатели сократительной способности миокарда крыс достоверно не изменялись.

Таким образом, биологически активные вещества из эмбрионов кур оказывают положительное влияние на функционирование иммунной системы крыс. Применение экстрактов из эмбрионов кур в ветеринарной практике может значительно облегчить лечение различных заболеваний иммунной системы животных.

Nowadays the problem of prevention and treatment of immune deficient states in animals and humans is quite actual one. A special attention is paid to the creation of new effective medicines to treat and correct immune status of an organism.

The use of biological preparations based on embryonic and fetal tissues has been widely spread. This is stipulated by the fact that these tissues have some properties inherent only to early stage of development.

The research aim was to obtain different extracts from chicken embryos, examining their immune stimulating effect as well as study the effect of these extracts on contractile characteristics of rat myocardium.

Immune stimulating activity of the studied extracts was tested in rats with experimental leucopenia. The animals were introduced with the whole extracts, extracts after protein denaturation and hydrophobic fractions of extracts.

It has been established that the extracts from chicken embryos manifest immune stimulating activity. The number of leucocytes in blood of experimental animals recovers more rapidly than in the animals of the control group. During injection to experimental animals of extracts after protein denaturation it has been found that the recovery rate of leucocyte number as well as prolongation of the influence of extracts increase. During introduction of hydrophobic fraction of the studied extracts their highest activity has been noted. The number of leucocytes restored up to the norm already to the 48 hrs of introduction and remained at a high level much longer. In all the cases there has been noted more manifested effect after introduction of cryoextracts.

To investigate the effect of the studied extracts on cardiac activity of rats there was applied the method of electrocardiographic study. It has been noted that within the experiment the counts of contractile ability of rat myocardium did not change statistically and significantly.

Thus it has been established that biologically active substances from chicken embryos render positive effect on functioning of immune system of rats. Use of extracts from chicken embryos in veterinary practice may significantly simplify the treatment of different diseases of animal immune system.

Оценка иммуномодулирующей активности липидного криоэкстракта плаценты

М.А. КРАВЧЕНКО, М.А. СИРОУС, А.И. ОСЕЦКИЙ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Assessment of Immune Modulating Activity of Lipid Placental Cryoextract

M.A. KRAVCHENKO, M.A. SIROUS, A.I. OSETSKY, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Разработка новых эффективных средств иммунокоррекции с использованием комплементарных организму молекулярных субстанций тканевого происхождения является актуальной задачей современной иммунофармакологии. Известный факт иммуномодулирующей активности субстанций липидной природы обуславливает необходимость усовершенствования технологии их получения из биологически активного тканевого сырья, к которому относится плацента. Использование для этих целей криотехнологий, в частности методов криоэкстракции, позволяет минимизировать влияние ряда повреждающих факторов на биологический материал, а также дифференцированно выделить липидную фракцию плаценты (ЛФП).

Цель работы – оценка иммунотропного потенциала ЛФП на модели аутоиммунной патологии в виде адьювантного артрита (АА).

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Wistar. АА индуцировали субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда. ЛФП получали методом криогенного молекулярного фракционирования из тканей плаценты свињи. ЛФП, растворенную в растительном масле, вводили с 14-х суток после индукции АА, семикратно внутримышечно в дозах 50, 100 и 200 мг/кг, объем инъекции составлял 0,1 мл. Контрольной группе животных с АА вводили растительное масло в аналогичном объеме. Динамику индекса артрита, фагоцитарную активность клеток перитонеальной полости, содержание белков острой фазы в сыворотке крови, гематологические показатели определяли на 14, 21, 28 и 35-е сутки развития АА.

Установлены четкие клинико-лабораторные признаки развития АА при выбранном методе индукции патологии. С началом введения ЛФП у животных в опытных группах прекращалось нарастание клинических симптомов АА, что коррелировало с таким же характером изменений лабораторных показателей. Проявление терапевтического эффекта имело дозозависимый характер и сохранялось некоторое время даже после окончания лечения. Данные наблюдения свидетельствуют об иммунокорректирующей эффективности субстанций липидной природы с проявлением их антиартритической активности. Необходимо дальнейшее изучение механизмов реализации такого рода активности тканевых липидных криоэкстрактов для оценки возможности клинического их применения при лечении аутоиммунных заболеваний.

Development of new effective means of immune correction using complementary to an organism molecular substances of tissue origin is an actual task of current immune pharmacology. The known fact of immune modulating activity of the substances of lipid origin stipulates the need in improvement of technology for their obtaining from biologically active tissue raw materials, where the placenta is referred to. Use of cryotechnologies for these aims, in particular, the cryoextraction methods, enables the minimizing the effect of some damaging factors on biological material, as well as allows to isolate differentially lipid placental fraction (LPF).

The research aim was to assess an immune tropic potential of LPF in the model of autoimmune pathology as adjuvant arthritis (AA).

The experiments were performed in Wistar male rats. AA was induced by means of subplantar injection of a complete Freund's adjuvant. LPF was derived by the method of cryogenic molecular fractionation from the tissue of porcine placenta. LPF, diluted in vegetable oil, was introduced starting from the 14th day after AA induction, seven times intramuscularly in the doses of 50, 100 and 200 mg/kg, the injection volume made 0.1 ml. The control group of animals with AA was injected with vegetable oil in the same volume. The dynamics of arthritis index, phagocyte activity of the cells of peritoneal cavity, content of proteins of an acute phase in blood serum, haematological counts were examined to the 14th, 21st, 28th and 35th days of AA development.

There have been established the distinct clinical and laboratory signs of AA development at the chosen method of pathology induction. With the beginning of LPF injection to the animals in experimental groups the accumulation of clinical symptoms of AA ceased, that correlated with the same character of changes in laboratory indices. The manifestation of therapeutic effect was of dose-dependent character and kept some time even after treatment termination. The observation data testify to immune correcting efficiency of the substances of lipid origin with the manifestation of their anti-arthritis activity. An actual is the need in further investigation of the implementation mechanisms of such an activity for tissue lipid cryoextracts to estimate their possible clinical use to treat autoimmune diseases.

Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови на морфологические изменения в хряще коленного сустава при механической травме

Е.Г. ИВАНОВ, А.К. ГУЛЕВСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low Molecular Fraction (Below 5 kDa) of Cord Blood on Morphological Changes in Knee Articular Cartilage at Mechanical Trauma

Ye.G. IVANOV, A.K. GULEVSKY

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

Ранее по данным биохимических исследований выявлен положительный эффект от введения низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови коров (ФКК) на течение репаративных процессов в суставном хряще. Известно, что успешная регенерация хряща после механической травмы зависит не только от накопления в нем необходимых биохимических компонентов, но и от того, образуют ли эти компоненты нормальную структуру хряща. Неясно, способна ли ФКК восстановить первоначальную архитектуру суставного хряща в ходе его регенерации после механической травмы.

Цель работы – изучение влияния ФКК на морфологические изменения в травмированном хряще.

Выделение ФКК осуществляли методом ультрафильтрации. Для гистологического исследования выделяли фрагменты бедренной кости с зоной хрящевого повреждения и заключали в целлоидин. Гистологические срезы изготавливали на санном микротоме Reichert, окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван Гизона. Гистологический анализ проводили с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss), цифровой фотокамеры Canon Power Shot A610 и компьютерной программы AxioVision (Carl Zeiss).

Проведенное исследование выявило на 28-е сутки наблюдения однонаправленность репаративного процесса в хряще животных, получавших ФКК и у животных, которых не лечили. У животных, получавших ФКК, отмечен высокий уровень репаративного остеогенеза и формирования в зоне дефекта суставного хряща хондroidной ткани и волокнистого хряща. Имело место восстановление конгруэнтности хрящевой ткани с частичным восстановлением его архитектуры. В то же время у животных, не получавших лечения, поверхность регенерата хряща неравномерна, а конгруэнтность суставных поверхностей нарушена и, даже на расстоянии от дефекта, отмечалось истончение хрящевого покрытия. Визуально площадь новообразованной ткани в области регенерата у этих животных была значительно меньше, чем у получавших ФКК. При гистохимическом исследовании макромолекулярной организации суставного хряща животных, получавших ФКК, при постановке реакции на наличие и упорядоченность глюкозаминогликанов (ГАГ) отмечается неравномерное, но интенсивное метакроматическое окрашивание всего суставного хряща, что свидетельствует о наличии ГАГ и нарушении их топографии. У животных, не получавших лечения, в сохранившемся суставном хряще метакроматическое окрашивание не определено, что свидетельствует об отсутствии ГАГ.

Таким образом, гистологическим исследованием установлено, что ФКК оказывает существенное положительное влияние на репаративные процессы в механически травмированном хряще.

Previously we have revealed by means of biochemical studies a positive effect of the introduction of low molecular fraction (below 5 kDa) of bovine cord blood (CBF) on the proceeding of reparative processes in articular cartilage. It is known that successful regeneration of cartilage after mechanical trauma depends not only on accumulation of biochemical components in cartilage being essential for regeneration, but also on the fact whether these components form normal cartilage structure.

The research aim of this work was to investigate the effect of CBF on morphological changes in a traumatized cartilage.

CBF was derived by ultra-filtration. For histological study there were isolated the fragments of femoral bone with the zone of cartilage damage and embedded into celloidin. Histological sections were made with Reichert sledge microtome and stained with haematoxylin and eosin according to Van Gieson. Histological analysis was done by means of Primo Star light microscope (Carl Zeiss, Germany), Canon Power Shot A610 digital camera and Axio Vision (Carl Zeiss, Germany) software.

The performed study revealed to the 28th observation day the mono-direction of reparative process in cartilage of the animals received CBF and non-treated ones. In the animals received CBF there was found a high level of reparative osteogenesis and formation of chondroid tissue and fibrous cartilage in the defect zone of articular cartilage. Recovery of cartilage tissue congruence took place, however a complete renewal of cartilage architecture was not observed. At the same time in non-treated animals the surface of cartilage regenerate was non-uniform, and the congruence of articular surfaces was impaired and even at the distance from the defect there was thinning of cartilage coat. Visually the area of newly formed tissue in the regenerate area in these animals was significantly smaller if compared with those received the CBF. Histochemical investigation of macromolecular organization of articular cartilage of the animals received CBF when testing the reaction for the presence and ordering of glucosamine glycans (GAG) showed non-uniform, but intensive metachromatic staining of the whole articular cartilage area, confirming the presence of GAG and the impairment of their topography. In non-treated animals in the preserved articular cartilage metachromatic staining was not found, that testified to the absence of glucosamine glycans.

Thus, the histological investigation showed that CBF renders significant positive effect on reparative processes in mechanically traumatized cartilage.

Влияние криоконсервированных клеток фетальной печени на состояние иммунной системы у мышей линии С3Н до клинического проявления рака молочной железы

Н.А. БОНДАРОВИЧ, О.В. САФРАНЧУК, М.В. ОСТАНКОВ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Preventively Introduced Cryopreserved Fetal Liver Cells on Indices of Immune System in C3H Mice Prior to Clinical Manifestation of Breast Cancer

N.A. BONDAROVICH, O.V. SAFRANCHUK, M.V. OSTANKOV, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Развитие онкологических заболеваний затрагивает все системы организма и, прежде всего, иммунную, которая отвечает за противоопухолевую резистентность. Превентивное лечение опухолевого процесса возможно при использовании методов молекулярно-генетической идентификации предрасположенности к его развитию. Для изучения механизмов реализации противоопухолевой активности клеток фетальной печени (КФП) хорошей моделью являются мыши линии С3Н с генетически детерминированным развитием рака молочной железы (РМЖ).

Цель работы – изучить влияние превентивно введенных криоконсервированных КФП на показатели иммунной системы (ИС) мышей линии С3Н до клинического проявления РМЖ.

Эксперименты выполнены на 6-месячных мышках-самках линии С3Н и СВА (контроль) весом 15–18 г в соответствии с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). Опытным животным в хвостовую вену вводили нативные или криоконсервированные (по методу Цуцаевой А.А. и соавт., 1983) КФП мышей линии С57BL (14 суток гестации) по 0,2 мл в дозе 1 или 5×10^6 клеток/мышь. Показатели Т-клеточного звена иммунитета определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD, США) с использованием моноклональных антител (МАТ) к антигенам CD3, CD4, CD8, Ia, CD25 в селезенке и тимусе; стволовые раковые клетки (СРК) в молочной железе – с использованием МАТ к CD44, CD24, CD133. Исследовали циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), цитотоксическую активность естественных киллеров, фагоцитарную и адгезивную активность. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Применение КФП в качестве превентивной терапии у мышей линии С3Н снижало гранулоцитарную гиперплазию костного мозга, бластную реакцию в селезенке и плазмоцитарную реакцию в лимфатических узлах. В ИС леченых мышей наблюдали снижение содержания Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^+$), Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$), активированных Ia^+ -клеток, ЦИК и повышение Т-хелперов/индукторов ($CD4^+$) в селезенке, общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в тимусе. Показатели фагоцитарной и адгезивной активности клеток перитонеальной полости соответствовали контрольным значениям. Содержание в молочной железе СРК с фенотипом $CD44^+CD24^-$ было ниже, чем у мышей без лечения, но выше контрольных значений. Способность угнетать пролиферацию опухолевых клеток и восстанавливать показатели ИС проявляли в большей степени криоконсервированные КФП в дозе 5×10^6 клеток/мышь и нативные КФП в дозе 1×10^6 клеток/мышь.

Development of oncological diseases concerns all the systems of an organism and primarily immune system, responsible for anti-tumour resistance. Preventive treatment of tumour process is possible when using the methods of molecular-genetic identification of predilection to its development. To study the mechanisms of implementation of anti-tumour activity of fetal liver cells (FLCs) the C3H mice with genetically determined development of breast cancer (BC) are the convenient model.

The research aim was to investigate the effect of preventively introduced cryopreserved FLCs on immune system indices of C3H mice prior to clinical manifestation of BC.

The experiments were performed in 6-months female C3H and CBA (control) mice with the weight of 15–18 g in accordance with the European convention on protection of vertebrate animals used in scientific purposes (Strasbourg, 1985). Into caudal vein of experimental animals we introduced either native or cryopreserved (according to the method of Tsutsayeva A.A. *et al.*, 1983) FLCs of C57BL mice (14th gestation day) by 0.2 ml in a dose of 1 or 5×10^6 cells per mouse. The indices of T cell link of immunity were examined by the method of flow cytometry (FACS Calibur, BD, USA) using monoclonal antibodies (MABs) to CD3, CD4, CD8, Ia, CD 25 in spleen and thymus; cancer stem cells (CSCs) in mammary gland using MABs to CD44, CD24, CD133. There have been studied circulating immune complexes (CIC), cytotoxic activity of natural killers, phagocyte and adhesive activity. Statistical processing was performed by the method of Student-Fisher.

FLC introduction as preventive therapy in C3H mice reduced granulocyte hyperplasia of bone marrow, blast reaction in spleen and plasmocyte reaction in lymph nodes. In immune system of treated mice there was observed the reduction of the content in regulatory T cells ($CD4^+CD25^+$), suppressor/cytotoxic T cells ($CD8^+$), activated Ia^+ cells, CIC and rise of helper/inducer T cells ($CD4^+$) in spleen, total T lymphocytes ($CD3^+$) in thymus. Indices of phagocytic and adhesive activity of peritoneal cavity cells corresponded to the control values. SCS content in mammary gland with $CD44^+CD24^-$ phenotype was lower than in mice with no treatment, but higher than the control values. The ability to suppress the proliferation of tumour cells and restore the immune system indices was manifested in a greater extent by cryopreserved FLCs in a dose of 5×10^6 and native FLCs in a dose of 1×10^6 cells/mouse.

Применение замораживания и гамма-облучения для создания сосудистых ксеноскаффолдов

Д.В. БЫЗОВ, Б.П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Freezing and Gamma-Radiation to Create Vascular Xenoscaffolds

D.V. BYZOV, B.P. SANDOMIRSKY

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

В настоящее время в кардиоваскулярной тканевой инженерии разрабатываются методики использования бесклеточных ксеногенных тканей в качестве каркасов биоконструкций. Механические характеристики скаффолдов, степень их иммуногенности и полученные результаты связаны с применяемым методом девитализации. Детергентно-энзимная обработка значительно снижает упругоэластические свойства сосудистых скаффолдов, вызывает агрегацию тромбоцитов за счет формирования стойких связей с коллагеновыми волокнами.

Цель работы – изучение влияния низких температур и гамма-излучения на артерии свиньи при создании девитализированных сосудистых скаффолдов малого диаметра (≤ 6 мм).

Внутригрудные и общие сонные артерии выделяли в стерильных условиях у половозрелых свиней в течение 30 мин после забоя с соблюдением правил биоэтики. Препарированные сосуды подвергали воздействию низких температур, после их полного отогревания на водяной бане (37°C) – гамма-облучению. Морфологическую структуру сосудов оценивали с помощью оптической микроскопии ($\times 200$): импрегнация серебром межэндотелиальных границ, окраска гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. В работе оценивали упругоэластические свойства сосудов: определение прочности в продольном (strength-test) и радиальном направлениях под действием внутреннего давления (burst-test).

После воздействия низких температур (погружение в жидкий азот) отмечены обширные деэндотелизированные поля, чередующиеся с участками сохранившейся эндотелиальной выстилки, а также единичные группы эндотелиоцитов. Гамма-облучение вызывает полную деэндотелизацию.

Для каждого коллагенового волокна нативной артерии характерна выраженная извитость, а для охлажденных до -196°C сосудов извитость волокон снижена, они уплотнены и утолщены. Продольная ориентация и структурная целостность коллагеновых и эластиновых волокон сохраняются и после гамма-облучения.

При измерении прочности в продольном и радиальном направлениях статистически значимых ухудшений механических свойств обработанных низкими температурами облученных артерий по сравнению с нативными сосудами не выявлено.

Низкие температуры и гамма-облучение могут быть использованы для девитализации сосудистых ксеноскаффолдов, что является этапом создания биоинженерных сосудистых протезов.

The methods for using acellular xenogenous tissues as the matrix for biological constructs in cardiovascular tissue engineering are developed today. Mechanical parameters of the scaffolds, the degree of their immunogeneity and the application results are directly associated with the devitalization method. Detergent-enzymatic treatment significantly reduces tough-elastic properties of vascular scaffolds, causes aggregation of platelets due to the formation of stable bonds with collagen fibers.

The research aim was to investigate the effect of low temperatures and gamma-radiation on porcine arteries when creating devitalized vascular scaffolds of small diameter ($d \leq 6$ mm).

Intra-thoracic and common carotid arteries were isolated from mature pigs 30 min later their slaughtering under sterile conditions meeting all the bioethical requirements. The prepared vessels were subjected to the effect of low temperatures and after complete thawing on water bath (37°C) they were gamma-irradiated. Morphology of the vessels was assessed by means of light microscopy ($\times 200$): silver impregnation of inter-endothelial boundaries, staining with hematoxylin-eosin and picrofuchsin according to Van Gieson. In the research we used the methods of estimation of tough-elastic properties of the vessels: strength-test, the determination of vessel longitudinal strength, and burst-test, the examination of vessel strength in radial direction using inner pressure.

After low temperature effect (plunging into liquid nitrogen) we found vast de-endothelized areas, interchanging with the sites of preserved endothelial embedding, as well as single groups of endotheliocytes. Gamma-radiation causes a complete de-endothelization.

Each of collagen fibers of native artery demonstrated the manifested tortuosity, meanwhile in cooled down to -196°C vessels it was reduced, and the fibers were packed and thickened. Longitudinal orientation and structural integrity of collagen and elastin fibers were preserved after gamma-radiation as well.

Measuring of the longitudinal and radial strength did not demonstrate statistically significant decline of mechanical properties of low-temperature-treated irradiated arteries if compared with native vessels.

Low temperatures and gamma-radiation may be used for devitalization of vascular xenoscaffolds that is the stage in designing the bioengineered vascular prostheses.

Морфологические особенности первичной культуры клеток надпочечников, полученной из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани

О.С. СИДОРЕНКО, В.С. ХОЛОДНЫЙ, Т.М. ГУРИНА, Е.И. ЛЕГАЧ, Г.А. БОЖОК
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological Peculiarities of Primary Culture of Adrenal Cells, Obtained From Native and Cryopreserved Tissue Fragments

O.S. SIDORENKO, V.S. KHOLODNYI, T.M. GURINA, YE.I. LEGACH, G.A. BOZHOK
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Первичная культура клеток (ПКК) эндокринных органов широко используется в качестве объекта биомедицинских исследований. Для ее длительного хранения применяется криоконсервирование, перед которым нативная ткань подвергается механическому измельчению на фрагменты, ферментативной обработке, полученные клетки культивируются.

Цель работы – получить ПКК из нативных и криоконсервированных фрагментов ткани надпочечников новорожденных поросят и изучить ее морфологические особенности.

Клетки, полученные из нативных надпочечных желез ферментативным методом, культивировали в среде 199 с 10 и 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Фрагменты надпочечников криоконсервировали под защитой 10% ДМСО с высокой (>100°C/мин) и низкой (5°C/мин до –70°C) скоростями охлаждения с последующим погружением в жидкий азот.

После 1-х суток культивирования клетки, полученные из нативных надпочечных желез, прикреплялись к поверхности и распластывались. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из крупных фибробластоподобных и веретенообразных клеток и достигающий 80% конфлюентности. При замене на 3-и сутки питательной среды на аналогичную, но содержащую 2% ЭТС, к 6–7-м суткам культивирования в ПКК наблюдались разрежение монослоя и формирование сфероподобных структур, прикрепленных к монослою. При переносе сфероподобных структур в среду культивирования, содержащую 10% ЭТС, отмечалось их прикрепление к поверхности и выделение из них нейроноподобных клеток в последующие 2–3-и сутки.

При культивировании клеток, полученных из криоконсервированных фрагментов надпочечных желез (замороженных с высокой и низкой скоростями охлаждения), к 3-м суткам были обнаружены одиночные живые клетки, плавающие в среде, а также прикрепившиеся, но не распластанные. В таких культурах не происходили пролиферация клеток и формирование монослоя.

Таким образом, ПКК надпочечников новорожденных поросят в виде монослоя может быть получена из нативных фрагментов ткани. После криоконсервирования фрагментов как с высокой, так и с низкой скоростями охлаждения не наблюдается формирование монослоя. Возможно, это является следствием совместного действия криоповреждающих факторов и ферментативной обработки. Кроме того, при снижении концентрации ЭТС в среде культивирования в ПКК надпочечников новорожденных поросят, полученной из нативных фрагментов, формируются сферические колонии клеток, из которых в дальнейшем выселяются клетки, морфологически отличающиеся от клеток первичного монослоя.

Primary cell culture (PCC) of endocrine organs is widely used as the object of biomedical researches. For its long-term storage the cryopreservation is used, prior to which native tissue is subjected to mechanical fragmentation, enzymatic processing, and culturing of obtained cells.

The research aim was to obtain PCC from native and cryopreserved fragments of newborn pig adrenal tissues and study their morphological peculiarities.

The cells obtained from native adrenal glands by means of enzymatic method were cultured in medium 199 with 10 and 2% fetal calf serum (FCS). Adrenal fragments were cryopreserved under 10% DMSO protection with high (>100°C/min) and low (5°C/min down to –70°C) cooling rates with following plunging into liquid nitrogen.

After first 24 hrs of culturing the cells obtained from native adrenal glands adhered to the surface and flattened. To the 3rd–4th days the monolayer, consisting of large fibroblast-like and spindle-like cells and achieving 80% confluence, was formed. After changing the nutrient medium at the 3rd day to similar one, but containing 2% FCS in PCC we found monolayer loosening and formation of sphere-like structures adhered to monolayer to the 6–7th culturing days. After transfer of sphere-like structures into culturing medium, containing 10% FCS we observed their adherence to a surface and release of neurone-like cells within the following 2–3 days.

During culturing the cells obtained from cryopreserved adrenal fragments (frozen both with high and low cooling rates) to the 3rd day we found single living cells, floating in the medium, as well as adhered ones, but not flattened. In these cultures no proliferation and formation of monolayer took place.

Thus, the PCC of newborn pig adrenal glands as the monolayer may be obtained from native tissue fragments. After cryopreservation of the fragments with both high and low cooling rates no formation of monolayer was observed. Probably it was the consequence of combined action of cryodamage factors and enzymatic processing. In addition, when lowering the concentration of FCS in culturing medium, the newborn pig adrenal PCC obtained from native fragments gave the formation of spheric cell colonies, and following release of the cells morphologically different from primary monolayer cells.

Сохранение дифференцировочного потенциала мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер после криоконсервирования

А.И. ПРАВДЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Preservation of Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microbeads After Freeze-Thawing

A.I. PRAVDYUK

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

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают уникальной способностью к мультилинейной дифференцировке, что позволяет использовать их в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Инкапсуляция МСК в альгинатные микросферы (АМС) является одним из перспективных подходов тканевой инженерии. Механизмы и степень криоповреждений клеток в суспензиях и составе АМС могут отличаться. Поэтому влияние криоконсервирования на сохранение функциональных параметров клеток в составе альгинатного гидрогеля требует детального изучения.

Цель работы – исследование дифференцировочного потенциала МСК после криоконсервирования в составе АМС.

Инкапсуляцию проводили путем распыления раствора альгината натрия с МСК в раствор, содержащий ионы кальция. Жизнеспособность инкапсулированных клеток определяли по комбинированному окрашиванию флуоресцентными красителями при помощи конфокальной микроскопии. Для оценки метаболической активности МСК применяли Alamar Blue-тест. Дифференцировку деконсервированных МСК в составе АМС проводили путем их культивирования в средах, содержащих соответствующие индуцирующие факторы. Продукты дифференцировки определяли биохимическими и гистологическими методами.

В экспериментах на МСК, выделенных из мезодермально-мезенхимальных тканей плодов человека, было установлено, что быстрое замораживание приводит к изменению оптических свойств альгинатного гидрогеля и критическому снижению жизнеспособности инкапсулированных клеток, тогда как медленное замораживание позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток в составе АМС. Максимальные значения сохранности и метаболической активности клеток в АМС были получены при медленном программном замораживании с использованием инициации кристаллизации в присутствии 10% ДМСО. В связи с этим данный протокол применяли при криоконсервировании АМС с МСК, выделенными из костного мозга взрослого человека, которые в составе АМС демонстрировали высокую жизнеспособность после деконсервирования и сохраняли ее в течение периода культивирования. Они, как и клетки, не подвергавшиеся замораживанию, были способны к направленной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Таким образом, медленное программное замораживание с инициацией кристаллизации позволяет обеспечить высокую сохранность инкапсулированных в АМС мезенхимальных стромальных клеток и сохранить их дифференцировочный потенциал.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) possess an unique ability to multi-lineage differentiation allowing their use in regenerative medicine and tissue engineering. Encapsulation of MSCs into alginate microbeads (AMBs) is one of perspective approaches of tissue engineering. Mechanisms and extent of cryodamages of cells in suspensions and inside the AMBs may differ. Therefore the cryopreservation effect on functional parameters of cells inside the alginate hydrogel demands a detailed study.

The research aim was to investigate the differentiation potential of MSCs after cryopreservation inside the AMBs.

Encapsulation was performed by means of spraying the sodium alginate solution containing MSCs into the solution with calcium ions. Viability of encapsulated cells was assessed by combined staining with fluorescent dyes and confocal microscopy. To assess metabolic activity of MSCs the Alamar Blue test was used. Differentiation of frozen-thawed MSCs inside the AMBs was performed by means of their culturing in the media containing corresponding inducing factors. The products of differentiation were examined with biochemical and histological methods.

The experiments in MSCs, derived from mesodermal mesenchymal tissues of human fetuses, showed that rapid freezing resulted in the change of optic properties of alginate hydrogel and critical reduction of viability of encapsulated cells. Meanwhile slow freezing allowed the significant preservation of viability of AMB encapsulated cells. Maximum values of survival and metabolic activity of cells in AMBs were obtained after controlled rate slow freezing with ice nucleation in presence of 10% DMSO. In this connection this protocol was applied to cryopreserve the AMBs with MSCs, isolated from adult bone marrow. These cells showed a high post-thaw viability and preserved it during culturing. Like non-frozen cells they were able for directed differentiation into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages.

Thus controlled rate slow freezing with ice nucleation enables high post-thaw integrity of MSCs encapsulated in AMBs as well as their differentiation potential preservation.

Изучение влияния низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) на фагоцитарную и метаболическую активность деконсервированных нейтрофилов

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, О.Л. ГОРИНА, Н.Н. МОИСЕЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Influence of Cord Blood Low-Molecular (Below 5 kDa) Fraction on Phagocytic and Metabolic Activities of Frozen-Thawed Neutrophils

A.K. GULEVSKY, O.L. GORINA, N.N. MOISEYEVA

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

Известно, что в сохранившихся клетках даже при оптимальных режимах замораживания после отогрева обнаруживаются нелетальные нарушения метаболизма деконсервированных клеток: нуклеиновых кислот, белков, АТФ и др. Поэтому необходимо восстановление структурно-функциональных свойств клеток в специальных реабилитирующих средах.

Цель работы – изучить влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови (ФКК) и препарата сравнения “Актовегин” в составе реабилитирующих сред на фагоцитарную и метаболическую активность лейкоцитов после криоконсервирования.

Установлено, что фагоцитарный индекс (ФИ) деконсервированных лейкоцитов достоверно снижался по сравнению с нативными клетками в 1,5 раза. После инкубации деконсервированных лейкоцитов в реабилитирующей среде с ФКК (0,15 мг/мл) или “Актовегином” (1,5 мг/мл) ФИ не увеличивался. При изучении поглотительной активности лейкоцитов установлено, что фагоцитарное число (ФЧ) деконсервированных нейтрофилов снижалось по сравнению с ФЧ нативных клеток. После 45 минут инкубации деконсервированных нейтрофилов в среде, содержащей “Актовегин” или ФКК, поглотительная активность фагоцитов увеличивалась в 1,2 раза. Инкубация деконсервированных нейтрофилов с ФКК или “Актовегином” в течение 120 минут приводила к резкому снижению данного показателя, что, вероятно, является следствием интенсивного переваривания стафилококка. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты, полученные при изучении коэффициента завершенности фагоцитоза (КФЧ). Показано, что КФЧ деконсервированных нейтрофилов снижался до $0,88 \pm 0,04$ отн. ед. (для нативных клеток – $1,24 \pm 0,05$ отн. ед.). После добавления в среду инкубации деконсервированных лейкоцитов ФКК или “Актовегина” КФЧ фагоцитов увеличивался в 1,7 раз и 1,43 раза соответственно, по сравнению с контролем. Результаты НСТ-теста показали, что процент активированных нейтрофилов (содержащих диформаза) достоверно ($p < 0,05$) уменьшался после криоконсервирования по сравнению с нативными значениями. После добавления в среду инкубации деконсервированных лейкоцитов ФКК или “Актовегина” количество НСТ-положительных клеток достоверно ($p < 0,05$) увеличивалось до $64,00 \pm 2,67$ и $62,80 \pm 1,42\%$ соответственно по сравнению с контролем ($43,2 \pm 1,8\%$).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о целесообразности включения низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота и “Актовегина” в соответствующих концентрациях в состав реабилитирующих сред для восстановления функционального потенциала деконсервированных лейкоцитов.

It is known that even using of optimal freezing regimens lead to appearance in survived frozen-thawed cells of post-thaw non-lethal metabolic disorders in nucleic acids, proteins, ATP *etc.* That is why thawed cells need to recover their structure functional properties in special rehabilitating media.

The aim of the work was to study the influence of the cord blood low molecular (below 5 kDa) fraction (CBF) and the reference preparation Actovegin as part of rehabilitating media on phagocytic and metabolic activities of leucocytes after freeze-thawing.

It was shown that phagocytic index (PI) of frozen-thawed leucocytes was 1,5 times lower comparing to native cells, the difference was statistically significant. After incubation of frozen-thawed leukocytes in the rehabilitating medium with CBF (0.15 mg/ml) or with Actovegin (1.5 mg/ml) PI did not increase. Study of leucocytes' consumption activity showed that phagocytic number (PN) of frozen-thawed neutrophils decreased comparing to PN of native cells. After 45 min incubation of frozen-thawed neutrophils in the medium, containing either Actovegin or CBF, phagocyte consumption activity was 1.2 times higher. Incubation for 120 min of frozen-thawed neutrophils with either CBF or Actovegin led to a drastic decline of this index, that probably was a consequence of intensive digestion of staphylococci. The data on index of phagocytosis completion (IPC) confirm this assumption. IPC of frozen-thawed neutrophils was shown to decrease down to 0.88 ± 0.04 relative units (for native cells it made 1.24 ± 0.05 relative units). After adding CBF or Actovegin to the incubation medium of frozen-thawed leucocytes IPC was correspondingly 1.7 and 1.43 times higher than the control value. The NBT-test showed that the percentage of activated neutrophils (containing difor-mazan) decreased significantly ($p < 0.05$) after cryopreservation in comparison with the native value. After adding either CBF or “Actovegin” to the incubation medium of frozen-thawed leukocytes the percentage of NBT-positive cells increased significantly ($p < 0.05$) up to $64.00 \pm 2.67\%$ and $62.80 \pm 1.42\%$, correspondingly, as compared to the control ($43.2 \pm 1.8\%$).

Thus, the results obtained allow to conclude the expedience of adding the cattle cord blood low molecular fraction (below 5 kDa) and Actovegin under corresponding concentrations into rehabilitating media for recovering the functional potential of frozen-thawed leucocytes.

Разработка перфузионной термостатируемой системы для культивирования стромальных клеток в составе трехмерных пористых носителей

Е.А. ЛЕБЕДА, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Development of Thermostatted Perfusion System for Stromal Cell Culture Within Three-Dimensional Porous Scaffolds

E.A. LEBEDA, YU.A. PETRENKO

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

Тканевая инженерия – молодая мультидисциплинарная область биотехнологии, включающая культивирование клеток в составе трехмерных носителей на основе различных биоматериалов и направленная на создание *in vitro* функционирующих тканей для последующей имплантации. Обеспечение питания клеток в объеме носителя является сложной задачей, поскольку для ее решения необходимо использовать трехмерные структуры с заданной пористостью и механическими свойствами. В статичных условиях носители, покрываясь поверхностной пленкой из клеток, не заселяются полностью, что связано с недостаточной циркуляцией субстрата в глубине конструкции. На современном этапе применяют множество методик культивирования трехмерных биоинженерных конструкций с динамическими системами перемешивания или перфузии. Наиболее перспективным типом биореакторов для культивирования клеток в трехмерных пористых носителях являются перфузионные системы, позволяющие достигать более равномерного роста клеток по всему объему носителя, не влияя при этом на их жизнеспособность.

Цель работы – разработка перфузионной термостатируемой системы для культивирования стромальных клеток в трехмерных пористых носителях.

Разработанная модель биореактора основана на перфузии среды между двумя емкостями через пористый образец под действием собственного веса. Уровни жидкости поддерживаются с помощью перфузионного насоса, управляемого магнитными переключателями и магнитным поплавком. Применение управляющей системы позволило снизить нагрузку на перфузионный насос и использовать очень маленькие скорости перфузии среды сквозь образец. Стерильность системы обеспечивается полностью замкнутым циклом и одноразовыми составляющими. Стабильная температура поддерживается с помощью термостата, представляющего собой теплоизолированную камеру со встроенным нагревательным элементом с терморегулятором и системой принудительной конвекции.

Испытания перфузионной системы показали ее бактериальную безопасность и отсутствие негативного влияния на механические свойства трехмерного пористого носителя. При этом распределение клеток в объеме носителя при культивировании с использованием данной системы, оцененное с помощью индикатора метаболической активности клеток МТТ, было более полноценным, чем в статичных условиях. Показана возможность проведения с помощью разработанной модели перфузионной термостатируемой системы эффективного культивирования стромальных клеток в объемных носителях для тканевой инженерии.

Tissue engineering is a young multidisciplinary area of biotechnology, which includes the cultivation of cells in the three-dimensional carriers based on various biomaterials and directed to the creation of functioning tissues *in vitro* for subsequent implantation. Taking into account the need to use three-dimensional structures with a given porosity and mechanical properties, the maintaining of optimal media supply for cells in the volume of the carrier is a difficult task. In static conditions, due to lack of circulation of the substrates at whole volume of the carrier, cells do not fully populate the scaffold, forming a capsule on its outer surfaces. Nowadays there is a wide range of methods for cultivation of cells within bioengineered three-dimensional structures with the application of dynamic mixing or perfusion systems. The most promising types of bioreactors that allow cultivating cells in three-dimensional porous carriers are perfusion systems. These systems allow to obtain more uniform cell distribution and growth throughout the volume of the carrier, while not affecting the viability of cells.

This study was directed on the development of perfusion, thermostatically controlled system for the culturing of stromal cells within three-dimensional porous scaffolds.

The model developed is based on the perfusion of the culture medium between two tanks through the porous sample under its own weight. Fluid levels are maintained with the help of perfusion pump and controlled by magnetic switches and magnetic float. Application of the control system allows reducing the load on the perfusion pump and using a very small rate of perfusion medium through the sample. Sterility was maintained by a fully closed-loop and the use of disposable components. A stable temperature was maintained with a thermostat with thermally insulated chamber and controlled built-in heating element.

Experimental testing of this perfusion system has shown its bacterial safety and the absence of negative effects on the mechanical properties of three-dimensional porous scaffolds. Additionally, the distribution of cells within the volume of the carrier when cultured using this system and estimated using cells metabolic activity indicator MTT, was more uniform than in static conditions. Thus, the developed model of thermostatically controlled perfusion system showed the possibility of its application for the effective cultivation of stromal cells in three-dimensional scaffolds for tissue engineering.

Особенности влияния экстрактов печени и нервной ткани новорожденных крыс на культивирование постнатальных нервных клеток

М.В. ШЕВЧЕНКО

Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

Peculiarities of Effect of Liver Extracts and Nerve Tissue of Newborn Rats on Culturing of Postnatal Nerve Cells

M.V. SHEVCHENKO

G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogical University

Для исследования постнатального развития нервной системы, а также возникновения неврологических патологий используют культивируемые *in vitro* нервные клетки (НК) новорожденных животных.

Изучение эффекта экстрактов различных тканей животных на культивирование нервных клеток (НК) позволяет определить влияние микроокружения клеток на нейрогенез, глиогенез и их взаимосвязь, что может быть основой для создания протоколов лечения заболеваний нервной системы.

Цель работы – исследование влияния экстрактов мозга (ЭМ) и печени (ЭП) новорожденных крыс на поведение НК новорожденных крыс при краткосрочном культивировании.

Экстракты получали гомогенизацией тканей мозга и печени новорожденных крыс с последующим их центрифугированием. НК получали из мозга новорожденных крыс, отмывали в бессывороточной среде и культивировали в концентрации 4×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, обогащенной сывороткой крови. ЭМ и ЭП добавляли в концентрациях 100, 200 и 300 мкг белка/мл среды. Также определяли влияние экстрактов на пересеянные агрегаты НК.

Проведенные исследования показали, что в первые сутки культивирования ЭМ и ЭП стимулируют образование агрегатов и способствуют увеличению жизнеспособности клеток на 15%. При этом наиболее эффективной была максимальная исследованная концентрация экстрактов (300 мкг белка/мл). Выраженной зависимости интенсивности прикрепления агрегатов и последующей миграции и дифференциации клеток при добавлении экстрактов не наблюдалось. Отличий в интенсивности образования монослоя в контроле и при добавлении ЭМ не наблюдалось. Добавление ЭП замедляло скорость образования монослоя пропорционально концентрации белка в экстракте.

При пересеве агрегатов (2 суток культивирования) как в контроле, так и в присутствии экстрактов отмечалось прикрепление агрегатов и слияние неприкрепленных агрегатов. В присутствии ЭМ в концентрации 0,2 мг белка на 3-и сутки культивирования наблюдалось более интенсивное прикрепление агрегатов, чем в контроле, однако все они прикрепилась на сутки позже по сравнению с контролем (на 7-е сутки). Добавление ЭП препятствовало прикреплению агрегатов к подложке, причем этот эффект прямо пропорционально зависел от количества добавленного экстракта.

Таким образом, ЭМ и ЭП способствуют восстановлению поврежденных свежeweделенных клеток в первые сутки культивирования. Однако при пересеве агрегатов ЭМ способствует, а ЭП препятствует как прикреплению агрегатов, так и расплыванию и миграции клеток, составляющих агрегаты.

In vitro cultured nerve cells (NCs) of newborn animals represent wide opportunities for their use as the research tool for the processes of postnatal development of nervous system as well as studying the appearance of pathologies of nervous system.

Investigation of the effect of extracts of different animal tissues on NC culturing enables the revealing of the effect of microenvironment on neurogenesis, gliogenesis and their relationship, that may serve as the base for designing the treatment protocols for diseases of nervous system.

The research aim is to study the effect of newborn rat brain tissue extracts (BE) and liver extracts (LE) on behavior of their NCs at short-term culturing.

Extracts were derived by means of homogenization of brain and liver tissues of newborn rats with their following centrifugation.

NCs were derived from brain tissues of newborn rats, washed-out in serum-free medium and cultured under 4×10^6 cells/ml concentration in DMEM/F12 medium, enriched with blood serum. BE and LE were added under concentrations of 100, 200 and 300 μg of protein per ml of medium. NC aggregates were re-plated after 48 hrs of culturing.

The performed studies have shown that within the first 24 hrs of culturing, BE and LE stimulate the formation of aggregates and contribute to the rise of cell viability by 15%. Herewith the most effective was maximum concentration of extracts (300 μg of protein/ml) being studied. The manifested dependence of adherence intensity of aggregates and following migration and differentiation of cells when adding the extracts was not observed. There was no differences in monolayer forming intensity between the control and the case of BE adding. LE adding slowed-down the rate of monolayer formation.

During re-plating of aggregates (after 2 days of culturing) both in the control and in the case of extracts' presence the adherence of aggregates and fusion of non-adhered aggregates was observed. In BE presence in the first 24 hrs of culturing there was observed more intensive adherence of aggregates than in the control, though the adherence of all the aggregates took place 24 hrs later if compared with the control (to the 7th day). Adding of LE inhibited the aggregates' adherence to surface, moreover this effect was in direct proportion to amount of added extract.

Thus, both BE and LE contribute to a recovery of damages in freshly isolated NCs during the first 24 hrs of culturing. However during further culturing the BE facilitates and LE prevents adherence of aggregates, as well as flattening and migration of NCs, being the part of aggregates.

Окрашивание фибробластов кожи взрослого человека карбоцианиновыми красителями DiI и DiO

В.В. МУЦЕНКО, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Labeling of Adult Human Skin Fibroblasts With Carbocyanine Dyes DiI and DiO

V.V. MUTSENKO, YU.A. PETRENKO

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

Для проведения мониторинга клеток в экспериментах *in vivo*, а также для определения поведения клеток при культивировании *in vitro* в составе трехмерных биоинженерных конструкций необходимы поиск и подбор эффективных маркеров и красителей. Длинноцепочечные диалкилкарбоцианины, представителями которых являются DiI и DiO, относятся к флуоресцентным красителям с высокой интенсивностью свечения, при этом вопросы об их влиянии на функциональные свойства стромальных клеток остаются недостаточно изученными.

Цель работы – определить оптимальные условия окрашивания фибробластов кожи карбоцианиновыми красителями DiI и DiO, а также оценить влияние окрашивания на жизнеспособность, адгезивные свойства, метаболическую и пролиферативную активность клеток.

В работе использовали культивированные фибробласты кожи взрослого человека. Клетки окрашивали либо при монослойном культивировании, либо после их трипсинизации и окрашивания в суспензии. Для окрашивания клеток карбоцианиновыми красителями DiI и DiO в концентрациях 10^{-6} , $2,5 \times 10^{-6}$, 5×10^{-6} и 10^{-5} М вносили порционно при постоянном перемешивании. После 30 мин экспозиции в темноте красители дважды отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1000 об/мин в течение 7 мин. После удаления красителя подсчитывали количество окрашенных клеток, а также определяли целостность их плазматической мембраны при окрашивании трипановым синим. Одновременно клетки помещали в условия культивирования для оценки их адгезии, метаболической и пролиферативной активности с использованием МТТ-теста.

Установлено, что добавление красителей DiI и DiO непосредственно при монослойном культивировании не позволило получить полноценное окрашивание клеток. Однако добавление красителей к суспензии клеток после их трипсинизации обеспечило высокую эффективность их окрашивания. При этом концентрации красителей 5×10^{-6} и 10^{-5} М были наиболее эффективными. Использование красителя DiI в различных концентрациях значительно снижало жизнеспособность клеток, что выражалось в нарушении целостности мембран клеток и снижении их адгезивных свойств и метаболической активности. Окрашивание клеток красителем DiO не отражалось на их жизнеспособности. Сохранение способности адгезии к поверхности культурального пластика, метаболическая и пролиферативная их активность не отличались от контрольных неокрашенных клеток.

For the monitoring of cells during *in vivo* experiments as well as for the determination of cells behavior during *in vitro* cell culture within three-dimensional bioengineered structures there is a strong need of choosing effective markers and dyes. Long-chain dialkylcarbocyanines DiI and DiO belong to the fluorescent dyes with high intensity of fluorescence, meanwhile the issues relating to their influence to functional properties of the stromal cells are poorly studied.

The aim of this study was to determine the optimal conditions for labeling of skin fibroblasts with carbocyanine dyes DiI and DiO, as well as to assess the influence of staining on cells viability, adhesive properties, metabolic and proliferative activity.

The *in vitro* cultured human adult skin fibroblasts were used in this study. Cell staining was performed either in monolayer culture or after cell detachment and staining in suspension. Carbocyanine dyes DiI and DiO in concentrations of 10^{-6} , $2,5 \times 10^{-6}$, 5×10^{-6} and 10^{-5} M were stepwise added during permanent shaking. After 30 min incubation in darkness, dyes were washed out twice by Hank's buffer using centrifugation at 1,000 rpm during 7 min. After the removal of the dyes, cells were counted to assess the number of stained cells as well to determine the integrity of plasma membrane, using trypan blue staining. In parallel, cells were plated for the determination of their adhesion, metabolic and proliferative activity, assessed by MTT assay.

Staining of cells with DiI and DiO directly during monolayer culture did not allow obtaining the optimal number of cells stained. However the addition of dyes to cell suspension after their detachment resulted in high staining efficiency. In this case, the most effective concentrations appeared to be 5×10^{-6} и 10^{-5} M. At the same time, the application of DiI dye in different concentrations resulted in significant decrease in cells viability, including disruption of plasma membrane, decrease in adhesive and metabolic properties. Alternatively staining of cells by DiO had no effect on viability of cells. Cells could be able to adhere onto culture plastic, their metabolic and proliferative activity did not differ from non-stained control cells.

Вопросы криоконсервирования пробиотика *Saccharomyces boulardii*

О.М. БАБИНЕЦ, Т.М. ГУРИНА, А.Л. КИРИЛЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

Tasks of *Saccharomyces boulardii* Probiotics Cryopreservation

O.M. BABINETS, T.M. GURINA, A.L. KYRYLYUK

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

Дисбактериоз кишечника является распространенным клинико-лабораторным синдромом. Для профилактики и лечения дисбактериозов используют пробиотики, пребиотики и синбиотики. Хорошую эффективность показали препараты на основе дрожжей *S. boulardii*, биологические свойства которых обусловлены прямым антимикробным действием в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способностью нейтрализовать токсины специфическими протеазами и иммуномодулирующим действием. Законодательством большинства государств, на территории которых используются биотехнологические производства, предусмотрено обязательное депонирование штаммов-продуцентов. Наиболее эффективным способом длительного хранения микроорганизмов в коллекциях является криоконсервирование. Исследования по разработке технологии криоконсервирования дрожжей *S. boulardii* не проводились.

Цель работы – изучение влияния состава консервирующей среды и режимов замораживания на жизнеспособность клеток *S. boulardii* после замораживания до -196°C и исследование сохранности биологических свойств пробиотика после криоконсервирования.

Объектом исследования была 2-суточная культура дрожжей *S. boulardii*, выращенная на скошенном сусло-агаре (8°B) при 30°C . Дрожжевые клетки смывали и ресуспендировали в сусло-бульоне (8°B), дистиллированной воде, 5%-м водном растворе ДМСО, 5 и 10%-х водных растворах сахарозы до концентрации 10^7 КОЕ/мл. Клеточные суспензии вносили в объеме 1 мл в криопробирки и замораживали при постоянной контролируемой скорости до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. Скорость охлаждения образцов была 1, 5, 10, 15 и $40^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При неконтролируемой скорости охлаждения образцы погружали в жидкий азот, отогревали на водяной бане при 37°C . Жизнеспособность клеток определяли по колониеобразованию “чашечным” методом Коха, биологические свойства – стандартными методами.

Установлено, что все использованные среды достаточно эффективны при криоконсервировании *S. boulardii*. Максимальные показатели жизнеспособности для всех сред были достигнуты при охлаждении со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При использовании неконтролируемых скоростей охлаждения (погружение в жидкий азот) были получены наихудшие результаты. При всех режимах замораживания увеличение концентрации сахарозы в водном растворе с 5 до 10% приводило к достоверному снижению жизнеспособности.

При изучении сохранности биологических свойств *S. boulardii* показано, что криоконсервирование не изменяет спектр сахаролитической активности и чувствительности к фунгицидным препаратам, а также спектр и интенсивность антагонистической активности и способности адгезии к энтероцитам крыс и эритроцитам человека.

Intestinal dysbacteriosis is the prevailing clinical and laboratory syndrome. To prevent and treat dysbacteriosis there have been widely used probiotics, prebiotics and synbiotics. High efficiency has been shown by preparations based on *S. boulardii* yeasts. Their biological properties are stipulated with direct anti-microbe effect in respect of a wide spectrum of pathogenic and opportunistic microorganisms, ability to neutralize toxins with specific proteases and immune modulating effect. The legislation in the majority of the states, where the biotechnological productions are used, foresees a mandatory depositing of producer strains. The most effective way of long-term storage of microorganisms in the collections is cryopreservation. No studies on the designing the technology of cryopreservation of *S. boulardii* yeasts have been performed yet.

The research aim was to study the effect of composition of preserving medium and freezing protocols on viability of *S. boulardii* cells after freezing down to -196°C and investigation of the integrity of biological properties of probiotics after cryopreservation.

The research object were 48 hrs culture *S. boulardii* yeasts grown with slope wort agar (8°B) at 30°C . Yeast cells were washed-out and re-suspended in wort broth (8°B), distilled water, 5% aqueous solution of DMSO, 5 and 10% aqueous solutions of sucrose up to the concentration of 10^7 CFU/ml. Cell suspensions were introduced in the volume of 1 ml into cryovials and frozen with constant controlled rate down to -40°C with following plunging into liquid nitrogen. Cooling rate of the samples was 1, 5, 10, 15, $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Under non-controlled cooling rate the samples were plunged into liquid nitrogen. The samples were thawed on water bath at 37°C . Cell viability was examined on colony formation by means of Koch's plate method, and biological properties were assessed with the standard tests.

It has been established that all the used media were quite effective during cryopreservation of *S. boulardii*. Maximum indices of viability for all the media were obtained when cooling with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. When using non-controlled cooling rates (plunging into liquid nitrogen) there were obtained the worst results. Under all the freezing regimens the rise in concentration of sucrose in aqueous solution from 5 to 10% resulted into statistically significant reduction of viability.

When investigating the integrity of biological properties of *S. boulardii* it has been demonstrated that cryopreservation did not cause the change in spectra of saccharolytic activity and sensitivity to fungicide preparations, as well as in the spectrum and intensity of antagonistic activity and adhesion ability to rat enterocytes and human erythrocytes.

Экспериментальное обоснование эффективности мультифакторных программ криоконсервирования плацентарной ткани

В.Ю. ПРОКОПЮК, О.С. ПРОКОПЮК, О.В. ФАЛЬКО, В.В. ЧИЖЕВСКИЙ, В.В. ВОЛИНА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Experimental Substantiation of Efficiency of Multifactor Cryopreservation Programs for Placental Tissue

V.YU. PROKOPYUK, O.S. PROKOPYUK, O.V. FALCO, V.V. CHIZHEVSKY, V.V. VOLINA
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В современной медицине применяют препараты плаценты в форме криоконсервированных фрагментов к способам криоконсервирования которых предъявляются два основных требования: сохранение отдельных молекул, клеток, межклеточных взаимодействий, а также структуры ткани в целом; содержание только тех веществ, которые разрешены к клиническому применению.

Ткань плаценты получали во время операции кесарева сечения и доставляли в стерильной транспортной среде в течение 1 ч, фрагментировали до размеров 0,5×0,5 см. В работе исследовали влияние различных криопротекторов (диметилсульфоксид (ДМСО), полиэтиленоксид, диметилформамид, пропандиол, сахароза), их комбинаций, криозащитных сред, режимов криоконсервирования на сохранность фрагментов плаценты. В криозащитные среды добавляли высокомолекулярные соединения, обладающие свойствами криопротекторов и которые применяют в клинической практике как противошоковые вещества, способные выводить жидкость из тканей (полиглюкин, поливинил-пирролидон, гидроксиэтилкрахмал). Для уменьшения криоповреждений использовали многоэтапные программы криоконсервирования с применением сидинга, которые разрабатывали после изучения термограмм, полученных для каждого из растворов. Проводили витальное окрашивание, гистологический анализ фиксированных препаратов.

Выявлено, что полиэтиленоксид, диметилформамид, пропандиол токсичны, вызывают разрушение структуры ткани, не обеспечивают достаточную сохранность клеток при криоконсервировании. Оптимальный в данном случае криопротектор ДМСО не полностью предотвращал разрушение структуры ткани в виде разрывов межклеточного вещества и десквамации трофобласта, что можно объяснить повышенной гидрофильностью эмбриональной мезенхимы. При добавлении в криозащитные среды поливинилпирролидона и полиглюкина структура ткани сохранялась частично. Наибольшая сохранность фрагментов ткани достигалась при введении в состав среды гидроксиэтилкрахмала и сахарозы. Использование режима сидинга в программе замораживания позволило повысить сохранность фрагментов плаценты. Состояние ткани после размораживания приближалось к нативному после кратковременной инкубации в среде DMEM.

В результате проведенной работы показано, что наилучшие результаты были получены при применении многоэтапных программ криоконсервирования с сидингом, а оптимальными криозащитными свойствами обладали среды, включающие ДМСО, сахарозу, альбумин, гидроксиэтилкрахмал.

Modern medicine utilizes the placental preparations as cryopreserved fragments. Applied cryopreservation methods should meet two main requirements: individual molecules, cells, intercellular relations and tissue structure in a whole should be preserved; and the preparation should contain only the substances, approved to clinical use.

Placental tissue was derived during Caesarean section and delivered in sterile transport medium within 1 hr, cut to 0.5×0.5 cm fragments. In the research we studied the effect of different cryoprotectants (dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide, dimethyl formamide, propane diol, sucrose), their combination, cryoprotective media, cryopreservation regimens on integrity of placental fragments. To cryoprotective media we added high molecular compounds possessing the properties of cryoprotectants and used in clinical practice as anti-shock means, capable to remove liquid from tissues (polyglucinum, polyvinyl pyrrolidone, hydroxyethyl starch). To reduce cryodamages the multi-step cryopreservation programs and seeding were used. The programs were designed after examining the thermograms obtained for each solution. Vital staining and histological investigation of fixed preparations were carried-out.

It was found that polyethylene oxide, dimethyl formamide, propane diol were quite toxic, caused the disorder in tissue structure, and did not provide the essential cell integrity during cryopreservation. Cryoprotectant DMSO was shown to be more optimal in this context, however it did not completely prevent the destruction of tissue structure such as ruptures of intercellular substance and desquamation of trophoblast, that could be explained by an increased hydrophilicity of embryonic mesenchyma. Adding of polyvinyl pyrrolidone and polyglucinum to cryoprotective media lead to a partial preservation of the tissue structure. The highest integrity of tissue fragments was achieved by introduction of hydroxyethyl starch and sucrose into the medium. Use of seeding in freezing program enables the increase of integrity of placental fragments. Post-thaw state of the tissue approached to native one after short-time incubation in DMEM.

As the result of the work performed it has been shown that the highest results were achieved when using multi-step cryopreservation protocols with seeding. Herewith the optimal cryoprotective properties were shown by the media, containing DMSO, sucrose, albumin and hydroxyethyl starch.

Применение криоконсервированных клеток фетальной печени для лечения аутоиммунной гемолитической анемии

М.А. СИРОУС, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, И.В. РАССОХА, К.А. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Cryopreserved Fetal Liver Cells to Treat Autoimmune Haemolytic Anemia

M.A. SIROUS, A.N. GOLTSEV, I.V. RASSOKHA, K.A. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Мультифакторность причин развития аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) обуславливает трудности ее диагностики и в большей степени эффективного лечения. Стратегия минимизации проявления АИГА должна быть ориентирована на восстановление сбалансированного взаимодействия иммунной, нервной и эндокринной систем, коррекцию цитокиновой сети и бодигомеостаза. Такой активностью обладают продукты фетоплацентарного комплекса, которые в виде криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации были апробированы в качестве препарата лечения АИГА у мышей.

АИГА индуцировали у мышей C57Bl/6J массой 20 г однократным внутривенным введением 3×10^9 /мышь сингенных эритроцитов, прогретых до $49,5^\circ\text{C}$ в течение 30 мин в 0,5 мл физиологического раствора NaCl. Противозэритроцитарные аутоантитела – ААТ идентифицировали с помощью прямой реакции Кумбса на 13-е сутки после введения эритроцитов. В эти же сроки оценивали гематологические показатели, состояние органов лимфогемопоэтического комплекса, адгезивную способность клеток перитонеальной полости и субпопуляционный состав Т-клеток селезенки.

Криоконсервированные или нативные КФП 14 и 19 суток гестации (КФП-14 и КФП-19) мышей CBA/CaLac однократно внутривенно вводили мышам-реципиентам C57Bl/6J в дозе 5×10^6 /мышь через несколько часов после индукции АИГА.

У всех мышей после введения сингенных термообработанных эритроцитов вырабатывались ААТ и манифестировались другие признаки развития АИГА. Каждая из апробированных форм КФП обладала терапевтическим эффектом, присущим именно фетальному материалу. Установлены различия корректирующего эффекта КФП в зависимости от их исходного состояния. Среди нативных КФП преимущество имели КФП-14, которым уступали КФП-19. Однако после криоконсервирования КФП-19 приобретали лечебный эффект, подобный нативным КФП-14.

Таким образом, в работе показана возможность применения КФП для лечения гемолитических анемий иммунного генеза в виде АИГА. Криоконсервирование придавало более высокий терапевтический потенциал КФП того срока гестации, которые в нативной форме проявляли его минимально. Обсуждаются возможные механизмы реализации ревертационного потенциала факторов криоконсервирования в отношении КФП поздних сроков гестации.

Multi-factor origin of the autoimmune hemolytic anemia (AIHA) development causes the difficulties of its diagnosis and in a greater extent the efficient treatment. The minimization strategy of AIHA manifestation should be directed to the recovery of balanced relationships of immune, nerve and endocrine systems, correction of cytokine net and body homeostasis. This activity is inherent to the products of fetoplacental complex, including cryopreserved fetal liver cells (FLCs) of different gestation terms, which were tested as the preparation to treat AIHA in mice.

AIHA was induced in C57Bl/6J mice of 20 g by means of single intraperitoneal injection of 3×10^9 /mouse syngeneic erythrocytes heated up to 49.5°C for 30 min in 0.5 ml of NaCl physiological solution. Anti-erythrocyte autoantibodies (AAB) were identified by means of direct Coombs' test to the 13th day after introduction of erythrocytes. At the same terms we assessed hematological indices, state of organs of lymphohemopoietic complex (LHPC), adhesive ability of cells of peritoneal cavity (PC) and subpopulation composition of spleen T cells.

Cryopreserved or native FLC of 14 and 19 days of gestation (FLC-14 and FLC-19) of CBA/CaLac mice were introduced into recipient mice C57Bl/6J in a dose of 5×10^6 /mouse once intravenously some hours later after AIHA induction.

In all mice the injection of heated syngeneic erythrocytes led to AAB production and manifestation of other signs of AIHA development. Each of tested forms of FLC possessed therapeutic effect inherent exactly to fetal material. There were established the differences of correcting effect of FLC depending on their initial state. Among native FLCs the advantageous were FLC-14, the FLC-19 were inferior to them. However after cryopreservation the FLC-19 gained a therapeutic effect similar to native FLC-14.

Thus in the work it has been shown the possibility of FLC use to treat haemolytic anemia of immune genesis such as AIHA. Cryopreservation added higher therapeutic potential to the FLC of the gestation term, which in native form manifested less effect. There are discussed the possible mechanisms of implementating the reverting potential of cryopreservation factors in respect of FLC of late gestation terms.

Влияние кардиотропных препаратов на электрофизиологические параметры сердца крыс при гипотермии

И.Г. ЯБЛАНОВИЧ, Г.Ф. ЖЕГУНОВ

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Effect of Cardiotropic Preparations on Electrophysiological Parameters of Rat's Heart Under Hypothermia

I.G. YABLANOVICH, G.F. ZHEGUNOV

Kharkov State Zooveterinary Academy

В связи с частым использованием низких температур в медицине проблема влияния гипотермии на эффективность лекарственных препаратов является актуальной.

Цель работы – изучение особенностей действия кардиотропных препаратов – кардиоселективных β 1-адреноблокаторов “Атенола” и “Метапролола” – на показатели ЭКГ крыс в условиях краниocereбральной и общей гипотермии.

Показано, что на направленность изменений электрокардиографических показателей сердца крыс введение “Атенола” или “Метапролола” при гипотермии не влияет. Эффект “Атенола” и “Метапролола” в условиях пониженных температур тела крыс усиливается. В некоторых случаях применения адреноблокаторов при краниocereбральной гипотермии наблюдались летальные случаи. Оба метода гипотермии усиливают влияние препаратов больше на диастолические показатели миокарда и меньше – на систолические процессы.

The problem of hypothermia effect on efficiency of medicines is an actual one because of more frequent use of low temperatures in medicine.

The research aim was to investigate the peculiarities of the effect of cardiotropic preparations, cardioselective β 1-adrenoblockers Atenol and Metaprolol on the indices of rat's ECG under craniocerebral and whole body hypothermia.

It has been established that the direction of changes of electrocardiographic indices of rats' heart, caused by introduction of either Atenol or Metaprolol under hypothermia does not change. The effect of Atenol and Metaprolol under conditions of lowered temperatures of rat's body strengthens. In some cases of the use of adrenoblockers under craniocerebral hypothermia the lethal cases were observed. Both methods of hypothermia strengthen the effect of preparations mainly on diastolic parameters and in a less extent they affect systolic processes.

Экспериментальное обоснование применения кордовой крови для лечения послеоперационных осложнений

К.А. ГОЛЬЦЕВ¹, О.Ю. КОЖИНА¹, О.В. САФРАНЧУК¹, В.И. ГРИШЕНКО¹, И.А. КРИВОРУЧКО²

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

²Харьковский государственный медицинский университет

Experimental Substantiation of Cord Blood Use to Treat Post-Operational Complications

K.A. GOLTSEV¹, O.YU. KOZHINA¹, O.V. SAFRANCHUK¹, V.I. GRISCHENKO¹, I.A. KRIVORUCHKO²

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

²Kharkov State Medical University

Как свидетельствуют данные литературы, послеоперационные гнойные осложнения являются результатом стресс-индуцированного угнетения функции иммунной системы (ИС) организма. При этом осложнения могут быть не только следствием экспансии инфекционных начал, но также минимизации трофического потенциала клеток ИС и разбалансировки взаимодействия в нейро-иммуноэндокринном блоке. В связи с этим очевидна необходимость поиска препаратов, обладающих полифункциональным лечебным эффектом в таких ситуациях.

Цель работы – оценить состояние ИС и частоту развития послеоперационных осложнений у крыс с острым гнойным перитонитом (ОГП) после лечения препаратом кордовой крови “Гемокорд” (производства ИПКиК НАН Украины).

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар в соответствии с правилами “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г.). Животные были распределены на 4 группы: 1 – крысам проводили лапаротомию и релапаротомию; 2 – моделирование ОГП без терапии; 3 – крысам с ОГП вводили антибиотик во время операции; 4 (основная) – крысам с ОГП вводили “Гемокорд”. В работе использовали иммунологические, цитоморфологические и биохимические методы исследования. Оценку всех показателей проводили на 1, 3, 5 и 7-е сутки после операции.

Во всех группах оперированных крыс наблюдали отклонения показателей клеточного (КЗИ) и гуморального (ГЗИ) звеньев иммунитета. В основном это касалось общих Т-клеток (CD3⁺), субпопуляции CD4⁺CD25⁺-клеток (T_{рег}), перитонеальных Mac-1⁺-моноклеаров и содержания циркулирующих иммунных комплексов. Все животные с ОГП без лечения (2 группа) погибли к 3-м суткам на фоне выраженного дисбаланса ИС. У крыс 3 группы прослеживалась четкая тенденция к улучшению показателей КЗИ и ГЗИ. Однако у крыс, которым вводили “Гемокорд”, эта динамика более выражена, а показатели значительно ближе к интактным животным. Важно отметить, что все показатели ИС на 7 сутки в 4 группе в наибольшей степени улучшились по сравнению с животными других групп, что коррелировало с показателями их выживаемости.

According to the literature data the post-operational purulent complications result from stress-induced suppression of the function of immune system (IS) of an organism. Herewith the matter is not only in the complications as the consequences of the expansion of infectious agents, but also minimization of trophic potential of IS cells and imbalance of interactions in neuro-immune endocrine block. In this connection the need in the search of preparations with polyfunctional therapeutic effect in these situations is evident.

The research aim is to assess the state of IS and frequency of the development of post-operative complications in rats with acute purulent peritonitis (APP) after treatment with cord blood preparation Hemocord (produced at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine).

The experiments were performed in Wistar rats meeting all the rules of European convention on protection of vertebrate animals used in scientific purposes (Strasbourg, 1985). Animals were divided into 4 groups: 1 – rats were laparatomied and re-laparatomied; 2 – APP was modelled with no therapy; 3 – rats with APP were injected with antibiotics during operation; 4 (main) – rats with APP were injected with “Hemocord”. In the work we used immunological, cytomorphological and biochemical research methods. All the indices were assessed to the 1st, 3rd, 5th and 7th post-operative days.

In all the groups of post-operative rats we observed the deviation of the indices of cellular (CIL) and humoral (HIL) immunity links. First of all, this concerns total T cells (CD3⁺), CD4⁺CD25⁺ subpopulation (regulator T cells), peritoneal Mac-1⁺ mononuclears and content of circulating immune complexes. All the animals with APP with no treatment (group 2) died to the 3rd day on the background of manifested disbalance of IS. In the rats of the 3rd group there was found a distinct trend to the improvement of the indices of CIL and HIL. However in the rats injected with Hemocord this dynamics was more manifested and the indices were closer to intact animals. It is important to note that all the indices of IS to the 7th day in the group 4 in the greatest extent improved if compared with the animals of other groups, that correlated with those of their survival.

Влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток на маркеры иммунного воспаления ткани головного мозга при развитии ишемического инсульта

Д.В. ЛЕБЕДИНЦ, М.А. СИРОУС, М.В. ОСТАНКОВ, И.В. РАССОХА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Fetal Nerve Cells on Markers of Immune Inflammation of Brain Tissue Under Development of Ischemic Stroke

D.V. LEBEDINETS, M.A. SIROUS, M.V. OSTANKOV, I.V. RASSOKHA, A.N. GOLTSEV
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Современная медикаментозная нейротропная терапия не способна кардинально улучшить репаративные возможности нервной ткани при ишемическом инсульте (ИИ). Трансплантация криоконсервированных фетальных нервных клеток (кФНК) является одним из основных путей замещения анатомических и/или функциональных нейродегенеративных дефектов. Для успешного применения кФНК в клинике необходимо экспериментально обосновать возможность лечения ими ИИ и провести исследования по изучению механизмов действия такой терапии.

Цель работы – изучить влияние кФНК на маркеры иммунного воспаления ткани головного мозга при развитии ИИ: антитела (АТ) к С-реактивному белку (С-РБ), к общему белку миелина (ОБМ) и ДНК.

Работа выполнена на 6- и 18- месячных крысах-самцах линии Вистар в соответствии с правилами “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). ФНК получали из мозга плодов крыс 11 суток гестации гомогенизацией в среде 199. Криоконсервировали ФНК с 10% ДМСО на программном замораживателе УОП-1 производства СКТЬ с ОП ИПКиК НАН Украины. ИИ моделировали окклюзией средней мозговой артерии (СМАо). ФНК вводили внутривентриально по 0,2 мл (5×10^6 клеток) через 6 ч после СМАо. В сыворотке крови определяли АТ к С-РБ методом латексной агглютинации, а к ОБМ и ДНК – иммуноферментным методом. Крыс без лечения, а также после введения криоконсервированных, нативных ФНК и пирацетама декапитировали на 3, 7 и 28-е сутки после индукции ИИ. Поведенческое тестирование проводили, используя тесты “водный лабиринт Морриса” и “открытое поле”. Неврологический статус оценивали по 18-балльной шкале. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Прогностические уровни АТ к ОБМ и ДНК (чем выше титр, тем хуже прогноз и течение ИИ), а также повышенное содержание С-РБ снижались на 7-е сутки у всех леченых крыс. На 28-е сутки после введения кФНК у всех крыс восстанавливался исходный поведенческий и неврологический статус. Площадь дефекта мозга была меньше, чем у животных, леченых пирацетамом. Повреждение мозга не выходило за пределы неокортекса и зона ишемической полутени была окружена молодыми нейрональными клетками.

Сделан вывод, что результативность клеточной терапии в значительной степени зависит от возраста реципиента – у 6-месячных крыс способность к приживлению донорских клеток, их функциональная активность, как и снижение титра АТ к ДНК и ОБМ, были выше, чем у 18-месячных.

Current medicinal neurotropic therapy is not able to fundamentally improve reparative possibilities of nerve tissue at ischemic stroke (IS). Transplantation of cryopreserved fetal nerve cells (FNCs) is one of main ways to substitute anatomic and/or functional neurogenerative defects. For successful application of cFNCs in clinic it is necessary to experimentally substantiate the possible treatment of IS using them and to carry-out the studies on action mechanisms of this therapy.

The research aim is to investigate the effect of cryopreserved FNCs on markers of immune inflammation of brain tissue during the development of IS: antibodies (AB) to C-reactive protein (C-RP), to total myelin protein (TMP) and to DNA.

The research is performed in 6 and 18 month-old Wistar male rats in accordance with “European convention on protection of vertebrate animals used in scientific purposes” (Strasbourg, 1985). FNCs were derived from brain of rat fetuses of 11 gestation days by means of homogenization in medium 199. FNCs were cryopreserved in presence of 10% DMSO by means of programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of IPC&C). IS was modelled by occlusion of medial cerebral artery (MCAo). FNCs were introduced intraperitoneally by 0.2 ml (5×10^6 cells) 6 hrs later after MCAo. In blood serum we assessed AB to C-RP using the method of latex agglutination and AB to TMP and DNA using immune enzymatic method. Non-treated rats as well as those after injection of cryopreserved, native FNC, as well as piracetam were decapitated to the 3rd, 7th and 28th days after IS induction. Behaviour was studied using the Morris’ water labyrinth and open field tests. Neurological status was assessed by means of 18-point scale. The results were statistically processed using the Mann-Whitney criterion.

The levels of AB to TPM and DNA having the prognostic value (the higher titre is, the worse forecast and course of IS), as well as increased content of C-RP were reduced to the 7th day in all treated rats. To the 28th day after injection of cryopreserved FNCs in all rats an initial behaviour and neurological status were recovered. Brain defect area was less than in the piracetam-treated animals. Brain damage was not beyond the neocortex and zone of ischemic penumbra was surrounded with young neuronal cells.

We conclude that success of cell therapy in a great extent depends on patient’s age, in 6 month-old rats the grafting ability of donor cells, their functional activity as well as the decrease in AB titre to DNA and TPM was higher if compared with 18 moth-old rats.