



# ХОЛОД в биологии и медицине

Актуальные проблемы криобиологии,  
трансплантологии и биотехнологии

## Тезисы конференции молодых ученых “Холод в биологии и медицине 2009” 28–29 мая 2009, г. Харьков

<i>Правдюк А.И., Петренко Ю.А.</i> Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер.....	210
<i>Сиренко А.Ю., Зубов П.М., Михайлова О.А., Марценюк В.Ф.</i> Влияние режимов охлаждения на содержание реактивных форм кислорода в клетках <i>Candida albicans</i> .....	211
<i>Буряк И.А.</i> Новые подходы к повышению эффективности криоконсервирования микроорганизмов с использованием биологических эффектов оксидантов.....	212
<i>Сосимчик И.А., Черкашина Д.В., Лебединский А.С., Сомов А.Ю.</i> Митохондриально-адресованные антиоксиданты снижают интенсивность свободнорадикальных процессов и нарушение дыхательной активности печени крыс при гипотермическом хранении.....	213
<i>Бызов Д.В., Михайлова И.П., Сычичкова О.П., Сандомирский Б.П.</i> Низкотемпературная обработка как первый этап создания бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов.....	214
<i>Есипова Ю.С., Компаниец А.М.</i> Подход к оптимизации состава криозащитной среды на основе непроницающего криопротектора – оксиэтилированного глицерина для замораживания эритроцитов человека.....	215
<i>Давыдова Е.В., Сақун А.В.</i> Влияние температуры на проницаемость мембран клеток для криопротекторов.....	216
<i>Чиж Н.А.</i> Исследование ультраструктуры печеночной артерии после криоденервации.....	217
<i>Сироус М.А., Гольцев К.А., Рассоха И.В.</i> Влияние факторов криоконсервирования на иммуногенные свойства эритроцитов.....	218
<i>Венцовская Е.А., Шило А.В.</i> Изменение цикла бодрствование-сон после искусственного гипометаболического состояния у крыс.....	219
<i>Кучков В.Н.</i> Вклад активности воды и адсорбции в осмотическое действие криопротекторов в суспензии эритроцитов лошади.....	220
<i>Панасенко Ю.В., Пономарева В.Л.</i> Сохранность плазмид в криоконсервированных клетках <i>Escherichia coli</i> .....	221
<i>Богданчикова О.А., Компаниец А.М.</i> Влияние режимов замораживания на криоконсервирование тромбоцитов человека под защитой многокомпонентных криопротекторных сред.....	222
<i>Сафранчук О.В., Бондарович Н.А., Гольцев А.Н.</i> Особенности модификации морфофункциональной организации раковых стволовых клеток аденокарциномы Эрлиха после криоконсервирования.....	223
<i>Бондарович Н.А., Сафранчук О.В., Сироус М.А.</i> Исследование содержания стволовых раковых клеток как дополнительный критерий оценки эффективности превентивной терапии онкопатологии криоконсервированными клетками фетальной печени.....	224
<i>Бровко Е.В.</i> О механизмах активации противовирусной защиты препаратом “Гемокорд”.....	225
<i>Иванов Е.Г., Гулевский А.К.</i> Репаративная регенерация хрящевой ткани после криовоздействия сочетанного с механической травмой под влиянием низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови.....	226
<i>Филиппова М.С., Волкова Н.А., Куцын В.Н., Воробьев В.В.</i> Моделирование компрессионной патологии межпозвоночных дисков и оценка эффективности клеточной терапии.....	227
<i>Порожан Е.А., Останков М.В.</i> Использование метода сенсibilизации иммунокомпетентных клеток для оценки терапевтического эффекта криоконсервированных в разных режимах фетальных нервных клеток при ЭАЭ.....	228
<i>Тищенко Ю.О., Киришча В.В., Бондаренко Т.П.</i> Сравнительный анализ морфологии и эндокринной функции аллотрансплантатов овариальной ткани и неонатальных яичников крыс.....	229
<i>Шиндер А.В., Єрмакова Н.Ю.</i> Біологічна дія екстрактів тваринного походження при холодових травмах шкіри та слизової оболонки рота.....	230
<i>Ляшенко Т.Д., Сукач А.Н., Холодный В.С.</i> Влияние глиального клеточного микроокружения на нейрогенез изолированных клеток мозга новорожденных крыс.....	231
<i>Бабиниц О.М., Марценюк В.Ф., Шатилова Л.Е., Высеканцев И.П.</i> Адсорбция метиленового синего и клеток <i>Saccharomyces boulardii</i> энтеросорбентами на различной основе.....	232
<i>Кравченко М.А.</i> Криоэкстракция как метод получения биологически активных липидных субстанций, обладающих иммуномодулирующим потенциалом.....	233
<i>Беспалова І.Г., Рогоза Л.А.</i> Пептидний склад сироватки крові шурів в залежності від фізіологічного стану шкіри.....	234

Дьяконенко Г.Ю., Лисак Ю.С., Компанієць А.М. Вплив передпосівної обробки насіння пшениці кріопротекторами на вміст розчинних вуглеводів у рослинах та їх морозостійкість.....	235
Лебединець Д.В., Рассоха И.В., Порожан Е.А., Кожина О.Ю. Особенности изменения цитокино-иммунного статуса крыс разного возраста после введения криоконсервированных фетальных нервных клеток в остром периоде ишемического инсульта.....	236
Сиренко А.Ю., Марущенко В.В. Влияние радиального разброса скоростей охлаждения в замораживаемом образце на колониеобразующую способность <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	237
Помозова В.А., Пеков Д.Б., Бирик И.В. Морфофункциональная характеристика миокарда крыс при охлаждении на фоне применения природных антиоксидантов.....	238
Помозова В.А., Бабий Н.В., Бабий Т.В. Исследование органов дыхания при холодовом воздействии на фоне введения растительных антиоксидантов.....	239

**cold**   
**in biology and medicine**  
 Current problems in cryobiology,  
 transplantology, and biotechnology

**Abstracts of the Conference of Young Scientists “Cold in Biology and Medicine 2009”  
 May, 28–29th, 2009, Kharkov, Ukraine**

<i>Pravdyuk A.I., Petrenko Yu.A.</i> Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microbeads .....	210
<i>Sirenko A. Yu., Zubov P.M., Mikhaylova O.A., Martsenyuk V.F.</i> Effect of Cooling Regimens on Content of Reactive Oxygen Species in <i>Candida albicans</i> Cells.....	211
<i>Buryak I.A.</i> New Approaches to Increase Cryopreservation Efficiency for Microorganisms Using Biological Effects of Oxidants.....	212
<i>Sosimchyk I.A., Cherkashina D.V., Lebedinsky A.S., Somov A. Yu.</i> Mitochondria-Targeted Antioxidants Decrease Free Radical Process Intensity and Impairment of Respiratory Activity in Rat Liver After Hypothermic Storage.....	213
<i>Byzov D.V., Mikhaylova I.P., Synchykova O.P., Sandomirsky B.P.</i> Low Temperature Treatment as the First Stage of Creation of Acellular Xenogeneic Vascular Scaffolds.....	214
<i>Esipova Yu.S., Kompaniets A.M.</i> Approach to Optimization of Composition of Cryoprotective Medium Based on Oxyethylated Glycerol Non-Penetrating Cryoprotectant for Freezing of Human Erythrocytes.....	215
<i>Davydova E.V., Sakun A.V.</i> Temperature Effect on Cell Membrane Permeability for Cryoprotectants.....	216
<i>Chizh N.A.</i> Study of Ultrastructure of Hepatic Artery After Cryodeneration.....	217
<i>Sirous M.A., Goltsev K.A., Rassokha I.V.</i> Effect of Cryopreservation Factors on Immunogenic Properties of Erythrocytes.....	218
<i>Ventskovskaya E.A., Shilo A.V.</i> Changes in Sleep-Wake Cycle After Artificial Hypometabolic State in Rats.....	219
<i>Kuchkov V.N.</i> Contribution of Water Activity and Adsorption into Osmotic Effect of Cryoprotectants in Suspension of Equine Erythrocytes.....	220
<i>Panasenko Yu.V., Ponomaryova V.L.</i> Integrity of Plasmids in Cryopreserved <i>Escherichia Coli</i> Cells.....	221
<i>Bogdanchikova O.A., Kompaniets A.M.</i> Effect of Freezing Regimens on Cryopreservation Efficiency of Platelets under Protection of Multicomponent Cryoprotective Solutions.....	222
<i>Safranchuk O.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N.</i> Peculiarities of Modification of Morphofunctional Organization of Cancer Stem Cells of Ehrlich Adenocarcinoma After Cryopreservation.....	223
<i>Bondarovich N.A., Safranchuk O.V., Sirous M.A.</i> Study of Content of Cancer Stem Cells as Additional Assessment Criterion for Efficiency of Preventive Therapy of Oncological Pathologies with Cryopreserved Fetal Liver Cells.....	224
<i>Brovko E.V.</i> About Mechanisms of Antiviral Protection with “Hemocord” Preparation.....	225
<i>Ivanov Ye.G., Gulevsky A.K.</i> Reparative Regeneration of Cartilage Tissue After Cryoeffect Combined with Mechanical Trauma under Influence of Low Molecular Cord Blood Fraction (Below 5 KDa).....	226
<i>Filippova M.S., Volkova N.A., Kutsin V.N., Vorobyev V.V.</i> Modeling of Compression Pathology of Intervertebral Discs and Assessment of Cell Therapy Efficiency.....	227
<i>Porozhan Ye.A., Ostankov M.V.</i> Use of Sensibilization of Immune Competent Cells for Assessment of Therapeutic Effect of Cryopreserved under Different Freezing Regimens Fetal Neuronal Cells at Experimental Allergic Encephalomyelitis.....	228

<i>Tischenko Yu.O., Kiroshka V.V., Bondarenko T.P.</i> Comparative Analysis of Morphology and Endocrine Function of Allografts of Rats' Ovarian Tissue and Neonatal Ovary.....	229
<i>Shinder A.V., Yermakova N.Yu.</i> Biological Effect of Extracts of Animal Origin under Cold Traumas of Skin and Oral Mucous.....	230
<i>Lyashenko T.D., Sukach A.N., Kholodnyy V.S.</i> Effect of Glial Cell Microenvironment on Neurogenesis of Isolated Brain Cells of Newborn Rats.....	231
<i>Babinets O.M., Martsenyuk V.F., Shatilova L.E., Vysekantsev I.P.</i> Adsorption of Methylene Blue and <i>Saccharomyces boulardii</i> Cells with Differently Based Enterosorbents.....	232
<i>Kravchenko M.A.</i> Cryoextraction as Method for Obtaining of Biologically Active Lipid Substances Having Immune Modulating Potential.....	233
<i>Bespalova I.G., Rogoza L.A.</i> Peptide Composition of Rat's Blood Depending on Physiological State of Skin.....	234
<i>Dyakonenko G.Yu., Lysak Yu.S., Kompaniets A.M.</i> Effect of Pre-Sawing Treatment of Wheat Seeds with Cryoprotectants on Content of Soluble Carbohydrates in Plants and Their Frost-Hardiness .....	235
<i>Lebedinets D.V., Rassokha I.V., Porozhan E.A., Kozhina O.Yu.</i> Peculiarities of Cytokine-Immune Status Changing of Variously Aged Rats After Introduction of Cryopreserved Fetal Nerve Cells at Acute Ischaemic Stroke.....	236
<i>Sirenko A.Yu., Maruschenko V.V.</i> Effect of Radial Dispersion of Cooling Rates in Frozen Sample on Colony-Forming Ability of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	237
<i>Pomozova V.A., Pekov D.B., Bibik I.V.</i> Morphofunctional Characteristics of Rat's Myocardium During Cooling on Background of Application of Natural Antioxidants.....	238
<i>Pomozova V.A., Babiy N.V., Babiy T.V.</i> Study of Respiratory Organs During Cold Effect on Background of Introduction of Plant Antioxidants.....	239

## Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер

А.И. ПРАВДИЮК, Ю.А. ПЕТРЕНКО

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

## Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microbeads

A.I. PRAVDYUK, YU.A. PETRENKO

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

Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы является перспективным направлением клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. Благодаря своей структуре альгинатный гидрогель позволяет инкапсулированным клеткам обмениваться питательными веществами, продуктами метаболизма, сигнальными молекулами и терапевтическими агентами с окружающей средой и в то же время обеспечивает иммуноизоляцию инкапсулированных клеток. Культивирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в составе альгинатных микросфер позволяет изучать некоторые свойства этих клеток, которые не проявляются при монослойном культивировании. К таким свойствам можно отнести, например, способность к индуцированной хондрогенной дифференцировке. При изучении свойств МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, необходима разработка эффективных методов их криоконсервирования для дальнейшего накопления и долгосрочного хранения.

В данной работе проведено сравнительное изучение влияния криоконсервирования под защитой ДМСО на сохранность и метаболическую активность МСК человека в виде суспензии одиночных клеток и инкапсулированных в альгинатные микросферы.

Суспензию МСК человека помещали в 1,2%-й раствор альгината натрия, после чего с помощью сконструированного пневматического генератора капель распрыскивали в раствор  $\text{CaCl}_2$ . Полученные альгинатные микросферы, содержащие МСК, а также исходную суспензию одиночных клеток замораживали по 2-этапной программе в среде, содержащей 5 или 10% ДМСО, а также 10% ЭТС. Образцы хранили в жидком азоте в течение недели, после чего отогревали на водяной бане при 40°C и отмывали от криопротектора.

После удаления криопротектора сохранность деконсервированных МСК оценивали по результатам двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом и этидиум бромидом с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. О метаболической активности МСК судили по степени восстановления редокс-индикатора Alamar Blue при культивировании в течение 12 ч.

Установлено, что процедура инкапсуляции не оказывала существенного влияния на жизнеспособность и метаболическую активность МСК. После криоконсервирования под защитой как 5, так и 10% ДМСО альгинатные микросферы сохраняли структурную целостность, а заключенные в них МСК характеризовались жизнеспособностью и метаболической активностью, сопоставимыми с соответствующими показателями деконсервированной суспензии одиночных МСК.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности сохранения жизнеспособности и метаболической активности инкапсулированных в альгинатные микросферы МСК после криоконсервирования.

Encapsulation of cells into alginate microbeads is perspective trend of cell biotechnology, tissue engineering and transplantology. Due to its structure alginate hydrogel enables the encapsulated cells to exchange nutrients, metabolic products, signal molecules and therapeutic agents with environment and at the same time provides immune isolation of encapsulated cells. Culturing of mesenchymal stromal cells (MSCs) in alginate microbeads allows the studying of some properties of these cells, not manifesting during monolayer culturing. For instance, the ability to induced chondrogenic differentiation may be referred to such properties. When studying the properties of MSCs encapsulated in alginate microbeads the development of effective methods of their cryopreservation for further accumulation and long-term storage is necessary.

This study deals with comparative investigation of cryopreservation effect with DMSO protection on survival and metabolic activity of human MSCs as the suspension of single cells and those encapsulated into alginate microbeads.

Human MSCs suspension was placed into 1.2% sodium alginate solution, afterwards using the designed pneumatic generator of drops it was sprayed into  $\text{CaCl}_2$  solution. The resulted alginate microbeads containing MSCs as well as initial suspension of single cells were frozen according to two-stage program in the medium containing either 5 or 10% DMSO, as well as 10% FBS. The samples were stored in liquid nitrogen during a week, afterwards they were thawed on water bath at 40°C and washed-out from cryoprotectant.

After cryoprotectants removal the integrity of thawed MSCs was assessed on the results of double staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide using confocal laser scanning microscope. Metabolic activity of MSCs was judged on the degree of recovery of redox-indicator Alamar Blue during culturing for 12 hrs.

It has been established that encapsulation procedure did not render significant effect on viability and metabolic activity of MSCs. After cryopreservation under protection not only 5 but also 10% DMSO alginate microbeads preserved structural integrity and encapsulated in them MSCs were characterized with viability and metabolic activity, comparable with corresponding indices of frozen-thawed suspension of single MSCs.

The findings testify to the possible preservation of viability and metabolic activity of encapsulated into alginate microbeads MSCs after cryopreservation.

## Влияние режимов охлаждения на содержание реактивных форм кислорода в клетках *Candida albicans*

А.Ю. Сиренко, П.М. Зубов, О.А. Михайлова, В.Ф. Марценюк  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### Effect of Cooling Regimens on Content of Reactive Oxygen Species in *Candida albicans* Cells

A.YU. SIRENKO, P.M. ZUBOV, O.A. MIKHAYLOVA, V.F. MARTSENYUK

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

Криоконсервирование – наиболее эффективный метод длительного хранения микроорганизмов, широко используемый в практике коллекций и банков микроорганизмов. Тем не менее процесс криоконсервирования может индуцировать различные стрессы за счет формирования внутриклеточного льда, осмотического шока или токсичности криопротекторов с развитием окислительного стресса, результатом которого может стать образование реактивных форм кислорода (РФК), вызывающих необратимые повреждения клеток и их дисфункцию.

Цель работы – сравнительное изучение оценки сохранности клеток *C. albicans* после замораживания по различным режимам охлаждения, учитывая способность к колониеобразованию, и определение содержания внутриклеточных РФК.

Объектом исследования были клетки *C. albicans* ATCC 885, криоконсервированные по различным режимам.

Грибы *C. albicans* выращивали на сусло-агаре, инокулировали в жидкую среду на основе суслу пивного и культивировали до стадии середины логарифмического роста. Клетки замораживали со скоростями 7 и 200°C/мин до –70°C, затем погружали в жидкий азот. В качестве среды консервирования использовали среду культивирования (с или без добавления 5%-го ДМСО) или дистиллированную воду. Криоконсервированные образцы размораживали на водяной бане, переводили в фосфатный буфер. Количество целых клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли “чашечным” методом Коха. Содержание РФК в клетках *C. albicans* исследовали с помощью проточного цитофлуориметра (FACSCalibur, BD, USA) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 meta (Carl Zeiss, Германия). При измерении содержания внутриклеточных РФК использовали 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA). Полученные результаты обрабатывали с помощью программ WinMDI 2.9 и LSM Image Examiner.

Результаты проведенного исследования показали, что жизнеспособность клеток *C. albicans* в процессе криоконсервирования зависит от режимов охлаждения и состава среды консервирования. Наиболее высокие показатели обеспечивал режим замораживания со скоростью 7°C/мин в среде, содержащей 5%-й ДМСО. Было также установлено, что показатели содержания РФК в клетках *C. albicans* коррелировали с потерей жизнеспособности клеток после криоконсервирования. Это позволяет предположить, что РФК накапливаются в клетках, потерявших способность к колониеобразованию, т. е. в клетках, получивших в процессе криоконсервирования летальные и условно-летальные повреждения. Определение содержания РФК с помощью зонда DCF может быть использовано для оценки сохранности функциональных свойств микробных клеток после криоконсервирования.

Cryopreservation is the most efficient method of long-term storage of microorganisms and it is widely used in the practice of collections and banks of microorganisms. Nevertheless, the process of cryopreservation may induce different stresses due to the formation of intracellular ice, osmotic shock or toxicity of cryoprotective agents with the development of oxidative stress, the result of which may be the formation of reactive oxygen species (ROS) causing the irreversible damages of cells and their dysfunction.

The research aim was a comparative study of the assessment of cell integrity of *C. albicans* cells after freezing according to different cooling regimens, considering the ability to colony formation and examining the content of intracellular ROS.

As the research object there were used *C. albicans* cells ATCC 885, cryopreserved according to different regimens.

The *C. albicans* fungi were grown on wort-agar, inoculated into liquid medium based on beer wort and cultured up to the stage of the middle of logarithm growth. The cells were frozen with the rates of 7 and 200°C/min down to –70°C, then they were immersed into liquid nitrogen. As the cryopreservation medium there was used the culturing one (with or without adding 5% DMSO) or distilled water. Cryopreserved samples were thawed on water bath and then removed into phosphate buffer. The number of integral cells was counted in Goryaev's chamber. Cell viability was examined with “plate” Koch's method. The content of ROS in *C. albicans* cells was examined with flow cytometer (FACS Calibur, BD, USA) and laser scanning confocal microscope LSM 510 meta (Carl Zeiss, Germany). When measuring the content of intracellular ROS the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate was used. The obtained results were processed with the software WinMDI 2.9 and LSM Image Examiner.

The results of performed study have shown that viability of *C. albicans* cells during cryopreservation depends on cooling regimens and composition of the cryopreservation medium. Higher indices were provided with freezing regimens with the rate of 7°C/min in the medium, containing 5% DMSO. There was also established that indices of ROS content in *C. albicans* cells correlated with the loss of cell viability after cryopreservation. This allows us to suppose that ROS are accumulated in cells that lost the ability to colony formation, *i. e.* in the cells which were lethally or relatively lethally damaged. The examining of ROS content with DCF probe may be used for assessment of integrity of functional properties of microbe cells after cryopreservation.

# Новые подходы к повышению эффективности криоконсервирования микроорганизмов с использованием биологических эффектов оксидантов

И.А. БУРЯК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## New Approaches to Increase Cryopreservation Efficiency for Microorganisms Using Biological Effects of Oxidants

I.A. BURYAK

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

Способность клеток к выживанию в цикле замораживания-оттаивания зависит не только от влияния защитных сред и температурных режимов при криовоздействиях, но и от подготовки клеток перед замораживанием, а также условий внешней среды после замораживания. На выживание микроорганизмов в цикле замораживания-оттаивания влияют состав суспендирующего раствора, фаза роста, условия культивирования перед замораживанием.

Цель работы – изучение возможностей вовлечения естественных защитных сил микроорганизмов в их выживание в цикле замораживания-оттаивания, что дополнило бы известные методы искусственной криозащиты. В основе предлагаемого подхода лежит использование реакций клеток на действие оксидантов. Спектр биологических эффектов оксидантов чрезвычайно широк и зависит от дозы окислителей. Установлено, что низкие дозы различных оксидантов оказывают митогенное действие на делящиеся клетки в культуре. В то же время средние дозы оксидантов приводят к временной остановке роста клеток, которая является результатом экспрессии генов, отвечающих за защиту и репарацию клеток. При этом в клетках синтезируются также белки теплового шока. В работе исследовали влияние озона на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, подвергнутых криоконсервированию. Суспензии дрожжей в физиологическом растворе замораживали до  $-196^{\circ}\text{C}$  погружением в жидкий азот и оттаивали на водяной бане при  $30^{\circ}\text{C}$ . Затем в суспензии дрожжей вводили дозированные количества озона и через 30 мин производили посев на агаризованную питательную среду. Жизнеспособность клеток оценивали по количеству сформировавшихся макроколоний. Установлено, что в диапазоне низких концентраций озона (менее  $0,13 \text{ мг O}_3/\text{л}$  или  $2,2 \text{ мг O}_3/\text{кл}$ ) повышается жизнеспособность дрожжей. В диапазоне концентраций  $0,13\text{--}0,38 \text{ мг O}_3/\text{л}$  (дозы  $2,2\text{--}6,3 \text{ мг O}_3/\text{кл}$ ) не наблюдали ни повышение жизнеспособности деконсервированных дрожжей, ни их инактивацию, т.е. имела место задержка роста культуры.

Таким образом, на примере озона показано, что в криобиологии могут быть использованы оксиданты в определенных низких дозах для повышения пролиферативной активности микроорганизмов после замораживания-оттаивания. Перспективным для криобиологии может быть также использование средних доз оксидантов для временной остановки роста клеток с целью их стабилизации перед процедурой криоконсервирования.

Cell ability to survive during freeze-thawing cycle depends not only in the action of cryoprotective media and temperature regimens at cryoeffects, but also on preparing the cells prior to freezing, as well as the environmental conditions after freezing. Composition of suspending solution, growth phase, culturing conditions prior to freezing affect the survival of microorganisms in freeze-thawing cycle.

The research aim is to study the possible involvement of natural protective forces of microorganisms into their survival during freeze-thawing, that would supplement the traditional methods of artificial protection. In the base of proposed approach is the use of cell reactions on the effect of oxidants. The spectrum of biological effects of oxidants is quite wide and depends on the dose of oxidants. It has been found that low doses of different oxidants render mitogenic effect on dividing cells in culture. At the same time the medium doses of oxidants result in provisional termination of cell growth, resulting from expression of genes responsible for cell protection and reparation. Herewith heat shock proteins are also synthesized in the cells. In the research there was studied the ozone effect on viability of *Saccharomyces cerevisiae*, subjected to cryopreservation. Yeast suspensions in physiological solution were frozen down to  $-196^{\circ}\text{C}$  by plunging into liquid nitrogen and thawed on water bath at  $30^{\circ}\text{C}$ . Then into yeast suspensions there were introduced dosed amounts of ozone and in 30 min the seeding on agarized nutritive medium was performed. Cell viability was assessed on the number of formed macrocolonies. It has been established that within the range of low ozone concentrations (less than  $0.13 \text{ mg O}_3/\text{l}$  or  $2.2 \text{ mg O}_3/\text{cell}$ ) the yeast viability increases. Within the concentration range of  $0.13\text{--}0.38 \text{ mg O}_3/\text{l}$  (doses of  $2.2\text{--}6.3 \text{ mg O}_3/\text{cell}$ ) neither increase of frozen-thawed yeast nor their inactivation were found, i.e. there was delay in culture growth.

Thus, exemplifying ozone it has been shown that in cryobiology there may be used oxidants under certain low doses to increase proliferative activity of microorganisms after freeze-thawing. The perspective for cryobiology may be also the use of average doses of oxidants for provisional termination of cell growth to stabilize them prior to cryopreservation procedure.

## Митохондриально-адресованные антиоксиданты снижают интенсивность свободнорадикальных процессов и нарушение дыхательной активности печени крыс при гипотермическом хранении

И.А. Сосимчик, Д.В. Черкашина, А.С. Лебединский, А.Ю. Сомов  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Mitochondria-Targeted Antioxidants Decrease Free Radical Process Intensity and Impairment of Respiratory Activity in Rat Liver After Hypothermic Storage

I.A. SOSIMCHYK, D.V. CHERKASHINA, A.S. LEBEDINSKY, A.YU. SOMOV  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Одним из основных факторов повреждения органа при гипотермическом хранении (ГХ) является усиление продукции активных форм кислорода (АФК). Дыхательная цепь митохондрий считается главным источником АФК в процессе ишемии печени и, следовательно, поиск и применение соединений, которые защищают орган от перепроизводства свободных радикалов при холодовом хранении печени, является перспективным направлением в криобиологии и трансплантологии. В связи с этим особого внимания заслуживают митохондриально-адресованные антиоксиданты, открытые группой В.П. Скулачёва. В частности, на ряде моделей *in vitro* и *in vivo* было показано, что пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ<sub>1</sub>), избирательно накапливаясь в митохондриях, проявляет мощную антиоксидантную активность. Однако эффективность SkQ на модели холодового ишемического повреждения печени до настоящего времени показана не была.

Цель работы – исследование влияния присутствия SkQ<sub>1</sub> в растворе хранения на дыхательную активность и интенсивность перекисных процессов в печени после гипотермического хранения.

Печень крыс хранили в течение 18 ч при 4°C в сахарозо-солевом растворе, содержащем SkQ<sub>1</sub> в концентрациях от 0,1 до 5 мкМ. Скорость поглощения кислорода после ГХ устанавливали в гомогенатах печени с помощью электрода Кларка. Уровень ТБК-активных продуктов в гомогенатах определяли в бутанольной фракции, спектрофотометрируемой при 535 нм. Интенсивность Fe<sup>2+</sup>-аскорбат индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по скорости образования ТБК-активных продуктов.

Показано, что гипотермия приводит к увеличению базального уровня ТБК активных продуктов, интенсивности индуцированного ПОЛ, а также к снижению дыхательного контроля (ДК) за счет повышения скорости дыхания в состоянии 4. Это свидетельствует о нарушении ионной проницаемости внутренней мембраны митохондрий.

Введение в среду хранения SkQ<sub>1</sub> в концентрации 100 нМ не влияло на интенсивность ПОЛ и на дыхательные параметры. При повышении концентрации SkQ<sub>1</sub> дозозависимо снижал накопление ТБК-активных продуктов в ходе ГХ, а также интенсивность Fe<sup>2+</sup>-индуцированного ПОЛ. В концентрациях 500 нМ и 1 мкМ SkQ<sub>1</sub> вызывал увеличение ДК за счет снижения скорости дыхания в состоянии 4 до исходного уровня. Однако при концентрации 5 мкМ угнетал скорость дыхания в состоянии 3.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что введение в среду ГХ SkQ<sub>1</sub> в концентрациях от 500 нМ до 1 мкМ предотвращает активацию свободнорадикальных процессов, что позитивно влияет на уровень энергетического сопряжения митохондрий.

It is well-known that one of the main factors of organ impairment after hypothermic storage (HS) is reactive oxygen species (ROS) overproduction. Respiratory chain of mitochondria is the major ROS source during liver ischemia, and therefore the search and application of substances that can protect organ against free radicals during hepatic preservation is hopeful trend for cryobiology and transplantology. Therefore, mitochondria-targeted antioxidants developed by Skulachev's group deserve special attention. Particularly, it was demonstrated that plastoquinonil-decyl-triphenylphosphonium (SkQ<sub>1</sub>) selectively accumulates in mitochondria and displays strong antioxidant activity in models *in vitro* and *in vivo*. However, SkQ efficiency was not shown in the model of cold ischemia hepatic injury up to the present moment.

The aim of the research was to verify the efficiency of SkQ<sub>1</sub> presence in preservation medium on liver lipid peroxidation (LPO) intensity and mitochondrial respiratory parameters after cold storage.

Rat livers were stored during 18 hrs at 4°C in sucrose-based solution contained SkQ<sub>1</sub> in concentrations from 0.1 to 5 μM. Oxygen consumption rate in liver homogenates after HS was examined with a Clark oxygen electrode. TBARS levels in homogenates were studied in n-butanol-extracted lipid fractions spectrophotometrically at 535 nm. Fe<sup>2+</sup>-ascorbate induced LPO intensity in liver homogenates was determined by TBARS accumulation rate.

It was shown that hypothermia resulted in the increase of TBARS basal level and induced LPO intensity, as well as in decrease of respiratory control index (RCI) due to the increasing of respiratory rate in state 4. This testify to indicating of inner mitochondrial membrane ionic permeability impairment.

Addition of 100 nM SkQ<sub>1</sub> to the preservation solution had no influence on free radical processes and respiratory parameters. Increasing of SkQ concentration led to TBARS level and induced LPO intensity reduction in dose-dependent manner during HS. Concentrations of 500 nM and 1 μM of SkQ<sub>1</sub> induced RCI increase due to the reduction of respiration in state 4 up to the initial level. But SkQ in 5 μM concentration depressed respiratory rate in state 3, so RCI was not recovered.

This research proves that supplementation of HS solution with SkQ<sub>1</sub> in concentrations from 500 nM to 1 μM prevents activation of free radical reactions, positively affecting a mitochondrial energetic coupling level.

## Низкотемпературная обработка как первый этап создания бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов

Д.В. БЫЗОВ, И.П. МИХАЙЛОВА, О.П. СЫНЧИКОВА, Б.П. САНДОМИРСКИЙ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Low Temperature Treatment as the First Stage of Creation of Acellular Xenogeneic Vascular Scaffolds

D.V. BYZOV, I.P. MIKHAYLOVA, O.P. SYNCHKOVA, B.P. SANDOMIRSKY  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Единственный радикальный метод лечения окклюзионных и травматических поражений магистральных сосудов – оперативный: замена или шунтирование участка поврежденной артерии с целью реваскуляризации зоны ишемии. Перспективными, особенно для протезирования артерий малого диаметра ( $d \leq 6$  мм), являются биоинженерные сосудистые протезы на основе бесклеточных ксеногенных сосудистых каркасов, способных обеспечивать адекватные механические свойства. Эндотелиальный слой таких скаффолдов может состоять из аутологичных клеток реципиента, заселенных *in vitro* до трансплантации; возможно также самостоятельное применение скаффолдов с заселением аутологичными клетками непосредственно в организме реципиента.

Цель исследования – изучение влияния низких температур на артерии свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов.

В работе использовали методы оценки упругоэластичных свойств сосудов – измерение давления разрыва и определение механической прочности при растяжении. Морфологическое состояние стенки сосудов оценивали по гистологическим срезам, окрашивание – гематоксилин-эозином, пикрофуксином по методу Ван-Гизона и Вейгерта. Структуру внутреннего слоя сосудов выявляли методом импрегнации серебром клеточных границ эндотелия.

Забор сосудов от половозрелых свиной производили с соблюдением правил биоэтики. Препарированные сосуды погружали в жидкий азот, после их полного оттаивания исследовали. При использовании способа выявления межклеточных границ эндотелия путем импрегнации серебром установлена частичная девитализация эндотелия. Охлаждение сосудов до  $-196^\circ\text{C}$  приводило к изменению их прочностных характеристик. Испытание на разрыв продемонстрировало тенденцию к повышению прочностных свойств замороженных-отогретых сосудов, наблюдалось также достоверное увеличение механической прочности в экспериментах при растяжении.

Таким образом, низкотемпературная обработка ксеногенных кровеносных сосудов обеспечивает один из этапов технологии создания бесклеточных сосудистых скаффолдов: сохранение адекватных механических свойств исходного материала при частичной децеллюларизации, позволяя также решить проблему хранения биологического материала.

Single radical treatment method for occlusion and trauma of great vessels is operation, i.e. substitution or bypass of the damaged artery site with the aim of revascularization of ischemia zone. The perspective ones, especially for prostheses for arteries of small diameter (less than 6 mm) are bioengineered vascular prostheses based in acellular xenogeneic vascular scaffolds capable to provide adequate mechanical properties. Endothelial layer of these scaffolds may consist of recipient's autologous cells seeded *in vitro* prior to transplantation; also possible independent use of scaffolds with seeding with autologous cells directly in a recipient's organism.

This research aim was to study the effect of low temperatures on porcine arteries when creating acellular xenogeneic vascular scaffolds.

In the research there were used the methods of tough and elastic properties of vessels: measuring the burst pressure and finding the mechanical strength when stretching. Morphological state of vessel wall was estimated on histological sections, stained with hemotoxylin-eosin, picrofuchsin according to Van-Gieson and Weigert methods. The inner layer structure of vessels was examined by silver impregnation of endothelium cell boundaries.

The sampling of vessels from mature pigs was carried out with meeting all the requirements of bioethics. The vessel preparations were plunged into liquid nitrogen, after their complete thawing were investigated. When using the method of revealing the endothelium intercellular boundaries by silver impregnation there was found a partial devitalization of endothelium. Cooling of vessels down to  $-196^\circ\text{C}$  resulted in the change of their strength characteristics. The examinations of burst pressure demonstrated the tendency to a rise of the strength properties of frozen-thawed vessels, as well there was observed statistically significant increase in mechanical strength in the experiments at tension.

Thus, low temperature treatment of xenogeneic blood vessels provides one of the stages of the protocols for the creation of vascular scaffolds: preservation of adequate mechanical properties of initial material at partial decellularization, allowing to solve the task of biological material storage.



# Подход к оптимизации состава криозащитной среды на основе непроникающего криопротектора – оксиэтилированного глицерина для замораживания эритроцитов человека

Ю.С.Есипова, А.М.Компаниец

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

## Approach to Optimization of Composition of Cryoprotective Medium Based on Oxyethylated Glycerol Non-Penetrating Cryoprotectant for Freezing of Human Erythrocytes

YU.S. ESIPOVA, A.M. KOMPANIETS

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

Цель исследования – оптимизация состава криозащитной среды для замораживания эритроцитов человека, содержащей оксиэтилированный глицерин (ОЭГ) в качестве криопротектора, с помощью метода полного трехфакторного эксперимента. Оценивался уровень сохранности эритроцитов человека после замораживания-отогрева в зависимости от концентрации компонентов, входящих в состав криозащитных растворов – ОЭГ, сахарозы, хлористого натрия. В качестве параметра оптимизации (сохранность эритроцитов после замораживания-отогрева) выбран показатель их осмотической хрупкости в 0,9%-м растворе хлористого натрия ( $Y_1$ ). Независимыми факторами были выбраны:  $X_1$  – концентрация ОЭГ;  $X_2$  – сахарозы;  $X_3$  – хлористого натрия. Полученная математическая модель адекватно описывает изучаемый процесс при доверительной вероятности 95%. Расчет данных эксперимента позволил получить адекватное уравнение регрессии со значимыми коэффициентами:

$$Y_1 = 17,6 - 1,5X_1 + 0,3X_2 + 0,76X_1X_2 - 0,4X_1X_3 + 0,5X_1X_2X_3.$$

Анализ полученного уравнения регрессии показал, что увеличение сохранности эритроцитов по параметру оптимизации  $Y_1$  может быть получено при снижении концентрации криопротектора и увеличении концентрации сахарозы в криозащитной среде. Отсутствие в уравнении фактора  $X_3$  свидетельствует о его незначительном влиянии в исследуемом диапазоне изменений на параметр оптимизации.

Таким образом, данный подход позволил исследовать эффективность криозащитных сред в зависимости от концентрации компонентов и определить интервалы оптимально сочетающихся концентраций веществ.

The research aim was optimization of cryoprotective medium composition for human erythrocytes freezing, containing oxyethylated glycerol (OEG) as cryoprotectant by means of a complete three-factor experiment. Survival level of human erythrocytes after freeze-thawing was estimated depending on concentration components, comprised of OEG, sucrose, NaCl cryoprotective solutions. As optimization parameter (erythrocytes survival after freeze-thawing) the index of their osmotic fragility in 0.9% NaCl solution ( $Y_1$ ) was selected. The independent factors such as OEG concentration  $X_1$ , sucrose  $X_2$ , NaCl  $X_3$  were selected. Obtained mathematical model equally describes the studied process with 95% confidence coefficient. The experimental data calculation enabled to obtain the regression equation with significant coefficients,

$$Y_1 = 17,6 - 1,5X_1 + 0,3X_2 + 0,76X_1X_2 - 0,4X_1X_3 + 0,5X_1X_2X_3.$$

Analysis of obtained regression equation showed that the increasing of erythrocyte survival for  $Y_1$  optimization parameter could be obtained at the reduction of cryoprotectant concentration and the increasing of sucrose one in cryoprotective medium. Absence of  $X_3$  factor in the equation testifies to its insignificant effect in the researched range of changes on optimization parameter.

Thus, this approach enabled to study the efficiency of cryoprotective media depending on concentration of components and determine intervals of optimally combining concentrations of substances.

# Влияние температуры на проницаемость мембран клеток для криопротекторов

Е.В. ДАВЫДОВА, А.В. САКУН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Temperature Effect on Cell Membrane Permeability for Cryoprotectants

E.V. DAVYDOVA, A.V. SAKUN

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

Пассивная проницаемость клеточной мембраны определяется ее общей структурой, свойствами отдельных компонентов, входящих в ее состав, а также системой взаимодействий между ними. Представления о механизмах проницаемости биологических мембран развивались наряду с изучением их структурной организации. Именно исследования проницаемости биологических и искусственных мембран явились основой для существующих представлений о строении биологических мембран. Одна из важных характеристик транспортных процессов – их зависимость от температуры. Проникновение воды и растворенных веществ через различные структурно обусловленные пути в клеточной мембране характеризуется разными значениями энергии активации этого процесса. Отклонение аррениусовой зависимости транспортного процесса от простого линейного соотношения свидетельствует о том, что один или несколько факторов, определяющих его течение, изменяет свои характеристики в зависимости от температуры. Изучение температурной зависимости пассивной проницаемости может предоставить ценную информацию о процессах, происходящих в клеточной мембране при охлаждении. В ряде работ установлена связь между изломами аррениусовых зависимостей транспортных процессов с фазовыми переходами в липидах мембран.

В работе исследовали влияние температуры 0–37°C на проницаемость мембран эритроцитов и дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* для криопротекторов 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида. Показано, что аррениусовая зависимость проницаемости мембран эритроцитов для указанных неэлектролитов характеризуется существенными изменениями значения энергии активации в нескольких температурных диапазонах, в частности в интервале температур 8–12°C. Это критическая температура как для гипотонического лизиса, так и гипертонического криогемолиза. Термотропный переход в мембранах эритроцитов при 8–12°C наиболее выражен и связан со структурными изменениями, в которые вовлечены все компоненты мембраны (липиды, цитоскелетные и интегральные белки). Получены изломы аррениусовой зависимости проницаемости для криопротекторов и при других температурах. Это свидетельствует о том, что снижение температуры ниже физиологической приводит к непрерывным изменениям во взаимоотношениях структурных элементов мембраны – липидов, белков и воды, которые проявляются в характерных температурных точках.

Passive permeability of cell membrane is determined with its total structure, properties of some components comprised and interaction system among them. Notions on biological membrane permeability mechanisms have developed with studying their structural organization. Just the researches of biological and artificial membrane permeability were the base of current notions on the biological membrane structure. One of the important characteristics of transport process is their dependence on temperature. Water and dissolved substances penetrating through the different structurally determined pathways in a cell membrane is characterized with different values of activation energy of this process. Deviation of Arrhenius' dependence of transport process from the simple linear ratio testifies to the fact, that one or some factors, determining their development, change its characteristics depending on temperature. Studying of the temperature dependence of passive permeability may provide valuable information about the processes, taking place in cell membrane at cooling. In some works the relationship between kinks of Arrhenius' dependence of transport processes with phase transitions in membrane lipids has been established.

In the work the effect of temperature within the range of 0–37°C on permeability of erythrocyte membranes and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells for 1,2-propane diol and dimethylsulfoxide to cryoprotectants have been studied. It has been shown that Arrhenius' dependence of erythrocyte membrane permeability for these non-electrolytes is characterized with significant changes of activation energy values in some temperature ranges, particularly in the range of 8–12°C. This is critical temperature not only for hypotonic lysis, but also for hypertonic cryohemolysis. Thermotropic transfer in erythrocyte membranes at 8–12°C is the most expressed and connected with structural changes, into which all the components of membrane were involved (lipids, cytoskeletal and integral proteins). The kinks of Arrhenius' curve of permeability for cryoprotectants have been obtained at other temperatures. This confirms that temperature reduction lower than physiological one results in continuous changes in interactions of membrane structural elements as lipids, proteins and water, manifesting in specific temperature points.

# Исследование ультраструктуры печеночной артерии после криоденервации

Н.А. Чиж

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Study of Ultrastructure of Hepatic Artery After Cryodenervation

N.A. CHIZH

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

Улучшение кровоснабжения печени способствует усилению регенерации клеточных элементов паренхимы органа и нормализует его функциональное состояние. Увеличение артериального кровотока можно достичь путем периаартериальной денервации, которая приводит к вазодилатации сосуда за счет блокады сосудосуживающих импульсов симпатической нервной системы. Высокая чувствительность нервной ткани к низким температурам позволяет использовать локальное криовоздействие как один из способов выполнения денервации *a. hepatica communis*.

Цель работы – изучение морфологических характеристик стенки *a. hepatica* после криоденервации для оценки степени эффективности операции.

Экспериментальная работа проведена на 18 образцах *a. hepatica*, взятых у беспородных белых крыс-самцов массой 180–230 г сразу и через 3 недели после низкотемпературной периаартериальной денервации. Криоденервация выполнялась с помощью криоинструмента КД-3 с температурой аппликатора  $-120^{\circ}\text{C}$ . Структурную организацию *a. hepatica* оценивали по световой микроскопии полутонких эпоновых срезов, окрашенных метиленовым и толуидиновым синим. Ультраструктуру клеток *a. hepatica* исследовали с помощью электронной микроскопии.

Данные световой и электронной микроскопии образцов *a. hepatica* показали, что непосредственно после криоденервации нервные волокна адвентициальной оболочки были фрагментированы и характеризовались значительными изменениями деструктивного характера с полным разрушением митохондрий, разрывами мембран аксонов и шванновских клеток. Криовоздействие приводило также к локальному слущиванию эндотелия, при этом внутренняя эластическая мембрана сохраняла свою целостность, как и большая часть эластических волокон мышечной оболочки.

Через 3 недели после криоденервации наблюдали признаки восстановления эндотелия, который был представлен несплошным слоем клеток, лежащих на внутренней эластической мембране. Адвентициальная оболочка в составе рыхлой соединительной ткани содержала прослойки коллагеновых волокон, а также остатки детрита нервных волокон. К этому сроку признаков регенерации нервных волокон адвентициальной оболочки в зоне локального криоповреждения не наблюдалось.

После проведения криовоздействия на печеночную артерию крыс в ранние сроки отмечалась деструкция адвентиции сосуда с полным разрушением нервных волокон. Через 3 недели после криоденервации *a. hepatica* наблюдалось восстановление всех слоев сосудистой стенки, за исключением сети нервных волокон адвентициальной оболочки.

Improved blood supply of liver contributes to strengthening of regeneration of organ parenchyma cell elements and normalizes its functional state. The enhancing of arterial blood flux may be achieved by periaarterial denervation resulting in vessel vasodilatation due to the blocking of vasoconstricting pulses of sympathetic nervous system. The high sensitivity of nerve tissue to low temperatures allows the use of local cryoeffect as one of the ways of performing *a. hepatica communis* denervation.

The research aim is to investigate morphological characteristics of *a. hepatica* wall after cryodenervation for assessment of surgery efficiency rate.

Experimental work was performed in 18 samples of *a. hepatica*, derived from breedless male white rats in 180–230 g at once and in 3 weeks after low temperature periaarterial denervation. Cryodenervation was done by means of cryoinstrument KD-3 with applicator temperature of  $-120^{\circ}\text{C}$ . Structural organization of *a. hepatica* was estimated using light microscopy of semi-thin epon slices stained with methylene and toluidine blue. Ultrastructure of *a. hepatica* cells was investigated by means of electron microscopy.

The data of light and electron microscopy of the samples of *a. hepatica* have shown that just after cryodenervation the nerve fibers of adventitial membrane were disintegrated to the fragments and were characterized with significant destructive changes with complete breaking-down of mitochondria, ruptures of axons and Schwann cells' membranes. Cryoeffect resulted also in local endothelium exfoliation, herewith inner elastic membrane preserved its integrity as well as the major part of elastic fibers of muscular tunic.

In 3 weeks after cryodenervation there were observed the signs of endothelium recovery, which represented discontinuous layer of cells laying on inner elastic membrane. Adventitial layer as a component of loose connective tissue contained interior layers of collagen fibers as well as the rests of detritus of nerve fibers. To this term no signs of regeneration of nerve fibers of adventitial membrane in the zone of local cryodamage were observed.

After cryoeffect on hepatic artery of rats at early terms there was found the destruction of vessel adventitia with complete breaking-down of nervous fibers. In 3 weeks after *a. hepatica* cryodenervation there was observed the recovery of all the layers of vascular wall excluding the net of nervous fibers of adventitial membrane.

# Влияние факторов криоконсервирования на иммуногенные свойства эритроцитов

М.А. СИРОУС, К.А. ГОЛЬЦЕВ, И.В. РАССОХА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Cryopreservation Factors on Immunogenic Properties of Erythrocytes

M.A. SIROUS, K.A. GOLTSEV, I.V. RASSOKHA

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

Модификация структуры клеточной мембраны эритроцитов и освобождение скрытых антигенных эпитопов приводят к изменению их иммуногенных характеристик, что может сопровождаться формированием аутоантител и быть причиной развития аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА). Модификации антигенного (иммуногенного) спектра эритроцитов можно добиться воздействием различных физических факторов, например прогреванием, которое используется в экспериментальных исследованиях при индукции АИГА. Интересным представляется изучение вопроса о подобном рода перестройках эритроцитов после их криоконсервирования.

Цель работы – изучить влияние различных режимов криоконсервирования на иммуногенные характеристики эритроцитов мышей в системе *in vivo*.

Мышей линии C57Bl/6J разделили на шесть групп, которым однократно внутрибрюшинно в количестве  $3 \times 10^9$  клеток /на мышшь вводили: 1-й группе – нативные сингенные эритроциты; 2-й – сингенные эритроциты, прогретые при температуре 49,5°C; 3-й – эритроциты, криоконсервированные под защитой 30% ПЭО-1500 без отмывки от криопротектора после размораживания; 4-й – эритроциты, криоконсервированные под защитой 30% глицерина с 3-кратной отмывкой от криопротектора после размораживания; 5- и 6-й – сингенные эритроциты, которые только экспонировали с криопротекторами. Эритромассу объемом 1,8 мл замораживали в полиэтиленовых ампулах Nunc до температуры –196°C путем быстрого погружения в жидкий азот. Оттаивание производили на водяной бане при температуре 42–44°C. Контроль за образованием противэритроцитарных аутоантител (ААТ) с помощью прямой реакции Кумбса осуществляли на 13-е сутки после введения эритроцитов. Показатель потенциала иммуногенности эритроцитов (ПИЭ) использовали для сравнения обобщенного эффекта модификации иммуногенности эритроцитов в разных группах.

Установлено, что максимально выраженный иммунный ответ на сингенные эритроциты в виде продукции ААТ наблюдался после их тепловой обработки при 49,5°C. Эритроциты, криоконсервированные с 30%-м глицерином и с ПЭО-1500, обладали менее выраженными иммуногенными свойствами, однако и они индуцировали развитие аутоиммунной реакции примерно у 50% мышшь-реципиентов.

Полученные результаты свидетельствуют о появлении иммуногенных свойств у сингенных эритроцитов после криоконсервирования. Возможно, что модификация мембранных структур эритроцитов является следствием реализации эффекта замораживания-отогрева, поскольку влияние на этот процесс криопротекторов “в чистом виде” не отмечалось.

Modification of structure of erythrocyte cell membrane and release of latent antigen epitopes results in the alteration of their immunogenic characteristics that may be accompanied with the formation of autoantibodies and be the cause of the development of autoimmune hemolytic anemia (AIHA). Modification of antigenic (immunogenic) spectrum of erythrocytes may be achieved by the effect of different physical factors, e.g. heating, used in experimental studies to induce AIHA. The study of the question about similar re-arrangements of erythrocytes after their cryopreservation is interesting.

The research aim was studying the effect of different regimens of cryopreservation on immunogenic characteristics of mice erythrocytes *in vivo*.

The C57Bl/6J mice were divided into 6 groups, which were injected intraperitoneally once in a dose of  $3 \times 10^9$  cells/per mouse: to the 1<sup>st</sup> group native syngeneic erythrocytes, to the 2<sup>nd</sup> one syngeneic erythrocytes, heated at 49.5°C; to the 3<sup>rd</sup> one erythrocytes, cryopreserved under 30% PEO-1500 protection with no washing-out of cryoprotectant after thawing; to the 4<sup>th</sup> one erythrocytes, cryopreserved under 30% glycerol protection with three-fold washing-out from cryoprotectants after thawing, to the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> ones syngeneic erythrocytes only exposed to cryoprotectants. The erythromass of 1.8 ml volume was frozen in Nunc polyethylene ampoules down to –196°C by rapid immersion into liquid nitrogen. Thawing was performed on water bath at 42–44°C. The formation of anti-erythrocyte autoantibodies (AAB) using direct Coombs reaction was controlled to the 13<sup>th</sup> day after introduction of erythrocytes. The erythrocyte immunogenicity potential index (IPI) was used to compare total effect of modification of immunogenicity of erythrocytes in different groups.

It has been established that maximum manifested immune response to syngeneic erythrocytes as AAB production was observed after their heat treatment at 49.5°C. Erythrocytes cryopreserved with 30% glycerol and PEO-1500 had less manifested immunogenic properties, however they induced the development of autoimmune reaction approximately in 50% recipient mice.

The obtained results testify to the appearance of immunogenic properties in syngeneic erythrocytes after cryopreservation. Probably, the modification of membrane structures of erythrocytes is likely the consequence of realization of the effect of freeze-thawing, since the influence on this process of only cryoprotectants was not found.

# Изменение цикла бодрствование-сон после искусственного гипометаболического состояния у крыс

Е.А. ВЕНЦКОВСКАЯ<sup>1</sup>, А.В. ШИЛО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Changes in Sleep-Wake Cycle After Artificial Hypometabolic State in Rats

E.A. VENTSKOVSKAYA<sup>1</sup>, A.V. SHILO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Изучение естественных и создание обратимых искусственных гипометаболических состояний (ИГМС) являются одними из наиболее актуальных направлений криобиологии и криомедицины. Перспективными считаются методы достижения ИГМС, основанные на действии факторов, участвующих в инициации природного гипометаболизма. Эти факторы (гипоксия, гипотермия, гиперкапния, газовые смеси, H<sub>2</sub>S и др.) потенциально опасны для негибернирующего организма, поэтому необходим контроль функциональной активности задействованных систем организма. Полагают, что изменение цикла сон-бодрствование может отражать взаимоотношение между анаболическими процессами всего организма и синтетическими процессами в ЦНС после влияния факторов, способствующих погружению в ИГМС.

У крыс линии Вистар (7–8-месячных, массой 220–250 г) изучали изменение цикла бодрствование-сон после выхода из ИГМС, достигаемого методом Анджуса-Бахметьева-Джайя (метод “закрытого сосуда” – комбинированное действие гипоксии, гипотермии, гиперкапнии). Животных содержали в отдельных клетках в звукопоглощающей камере (свет:темнота (12:12),  $T_{cp} = 22–24^{\circ}\text{C}$ ) со свободным доступом к воде и пище. Проводили длительную регистрацию цикла бодрствование-сон (от 2 до и 3–4 суток после выхода из ИГМС) с последующим выделением фаз сна по общепринятым критериям.

В зависимости от времени появления первых эпизодов парадоксального сна (ПС) после выхода из ИГМС животных разделили на 2 группы. У 1-й группы ПС появлялся на 4-м часе регистрации и составлял 8%, с 6 по 9-й час регистрации доля ПС повышалась до 12–14% за счет увеличения количества (с  $2,5 \pm 0,4$  до  $4,5 \pm 0,5$ ) и длительности (с  $97,6 \pm 9$  до  $117 \pm 6,33$  с) эпизодов. Во 2-й группе ПС выявлялся на 6–7-м часе после выхода из ИГМС и достигал 9% за счет увеличения количества эпизодов с  $1,7 \pm 0,3$  до  $2,9 \pm 0,4$ . В то же время в обеих группах первые эпизоды медленноволнового сна (МВС) появлялись в конце 2-го часа наблюдения, их суммарная длительность составляла 48% (бодрствование – 52%). На 3-м часе наблюдения доля МВС повышалась до 83% (бодрствование – 7%) за счет увеличения длительности эпизодов с  $28,3 \pm 1,5$  до  $102,9 \pm 7,5$  с, к 10-му часу снижалась до 41%. Следует отметить, что общее количество МВС и ПС составило 53,5 и 8,3% соответственно и достоверно не отличалось от контрольных величин (за 21 ч регистрации, без учета времени пребывания животных в ИГМС).

Таким образом, ИГМС не приводит к изменению суточного количества сна: первоначальное отсутствие МВС и ПС компенсируется в последующие часы как за счет увеличения длительности эпизодов МВС и ПС, так и увеличения количества эпизодов ПС. Структура и цикличность сна нормализуются в течение 24 ч после ИГМС.

The study of natural and creation of reversible artificial hypometabolic states (AHMS) are the most actual directions of cryobiology and cryomedicine. Perspective methods of AHMS achievement are based on the factors involved in the initiation of natural hypometabolism. These factors (hypoxia, hypothermia, hypercapnia and its combination, H<sub>2</sub>S, etc.) are potentially dangerous for non-hibernators. So it is necessary to control the functional activity of operated systems of organism. It is believed that a change in sleep-wake cycle might reflect the relationship between the anabolic processes of the organism and synthetic processes in the CNS after the impact of the factors involved in the initiation of AHMS.

The changes in sleep-wake cycle after AHMS caused by Andjus-Bakhmet'ev-Giaja method (method of “closed tank”: combined influence of hypoxia, hypothermia and hypercapnia) in Wistar rats (7–8 months, 220–250 g weight) were studied. The animals were individually kept in the cages in sound-attenuated chamber (light:dark (12:12),  $T_a = 22–24^{\circ}\text{C}$ ) with access to water and food *ad libitum*. The registration of sleep-wake cycle was carried out during 2 days prior to and 3–4 days after AHMS. The vigilance states were visually scored according to the common criteria.

Animals have been divided into 2 groups depending on the time of first paradoxical sleep (PS) episodes occurrence in the course of awoken from AHMS. The first episode of PS in the 1<sup>st</sup> group revealed during 4 hr of record and was 8%, from 6 till 9 hrs of record the amount of PS was increased to 12–14% due to an number increase (from  $2.5 \pm 0.4$  to  $4.5 \pm 0.5$ ) and duration of episodes (from  $97.6 \pm 9$  to  $117 \pm 6.33$  s). In the 2<sup>nd</sup> group PS appeared at 6–7 hrs after awakening from AHMS and reached 9% due to increasing of episodes' number from  $1.7 \pm 0.3$  to  $2.9 \pm 0.4$ . At the same time in both groups of animals first episodes of slow wave sleep (SWS) were observed at the end of the 2<sup>nd</sup> hrs of the record, its total duration was 48% (wake – 52%). At the 3<sup>rd</sup> hr of observation the percentage of SWS was increased up to 83% (wake – 7%) due to increasing the duration of episodes from  $28.3 \pm 1.5$  to  $102.9 \pm 7.5$  s, and decreased to 41% by the 10<sup>th</sup> hr. One should be noted that the total amount of SWS and PS was 53.5 and 8.3%, respectively, and did not differ significantly from the control quantity (during 21 hrs of record, without time when animals were in AHMS).

Thus, AHMS does not alter the daily amount of sleep: initial absence of SWS and PS is compensated in subsequent hours by increasing the duration of SWS and PS episodes, and by increasing the number of PS episodes. The sleep structure and sleep-wake cycle are normalized during 24 hrs after AHMS.

## Вклад активности воды и адсорбции в осмотическое действие криопротекторов в суспензии эритроцитов лошади

В.Н. Кучков

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

## Contribution of Water Activity and Adsorption into Osmotic Effect of Cryoprotectants in Suspension of Equine Erythrocytes

V.N. KUCHKOV

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

Активность воды ( $A_w$ ) в системе определяется как отношение парциального давления водяного пара над раствором к давлению насыщенного пара над чистой водой при той же температуре. Данная величина показывает долю свободной воды в биологическом объекте. От соотношения свободной и связанной воды зависит характер процессов кристаллообразования в системе при замораживании.

В работе определяли активность воды в суспензиях эритроцитов лошади в присутствии 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и диметилсульфоксида (ДМСО) в различных концентрациях. В таком криобиологическом аспекте эритроциты лошади, в отличие от эритроцитов человека, изучены недостаточно, хотя их криоконсервирование представляет интерес для ветеринарной медицины. Это послужило основанием для выбора данных клеток при проведении настоящих исследований.

Использовали экспериментальную установку на базе осмометра ОМКА 1С-01 с разработанной нами криоскопической ячейкой, позволяющей измерять температуру замерзания водных систем с погрешностью  $\pm 0,006^\circ\text{C}$ .

Установлено, что с повышением концентрации криопротекторов в суспензии эритроцитов от 0,1% и выше величина  $A_w$  линейно уменьшается. При низких концентрациях (менее 0,1%) существенное влияние на осмотическое действие криопротекторов в образце оказывают адсорбционные взаимодействия. Эффекты адсорбции 1,2-ПД и ДМСО на мембранах эритроцитов лошади оценивали по изменению величины  $A_w$  в суспензиях в области концентраций криопротекторов от 0,004 до 0,06%.

Показано, что в исследуемом концентрационном диапазоне зависимости  $A_w = A_w(C)$  для рассматриваемых криопротекторов подобны и имеют форму кривой с перегибом, который обнаруживается при концентрации 0,015% для 1,2-ПД и 0,03% для ДМСО. Объяснением существования данных перегибов может быть конкуренция криопротектора с водой за места сорбции. В области концентраций более 0,04% для 1,2-ПД и 0,05% для ДМСО активность воды в системе зависит только от количества молекул криопротектора в единице объема.

Таким образом, экспериментально доказано существование двух концентрационных областей, в которых адсорбционные взаимодействия и активность воды определяют осмотическое действие криопротекторов в суспензии эритроцитов лошади. В области низких концентраций ключевым фактором, влияющим на осмотическое действие криопротекторов, является адсорбция. С ростом концентрации криопротектора вклад адсорбции уменьшается, а его осмотическое действие зависит от активности воды в суспензии.

Activity of water ( $A_w$ ), is defined as the partial pressure of water vapor over the solution to pressure of saturated vapor over pure water at the same temperature. This value shows the free water share in biological object. Character of crystal forming processes in the system depends on ratio of free and bound water.

In this work the water activity in suspensions of equine erythrocytes at the presence of 1,2-propane diol (1,2-PD) and dimethylsulfoxide (DMSO) in different concentrations were determined. In contrary to human erythrocytes, equine erythrocytes have been studied insignificantly in cryobiology, though their cryopreservation is of interest for veterinary medicine. This served as the base for selection of these cells when carrying out these researches.

Experimental facility based on OMKA 1C-01 osmometer with developed by us cryoscopic cell, enabling to measure temperature of water systems freezing with an inaccuracy of  $\pm 0.006^\circ\text{C}$  was used.

It has been established that with the increase of cryoprotectant concentrations from 0.1% and higher,  $A_w$  value linearly decreases. At low concentrations (lower than 0.1%) the effects of cryoprotectant adsorption on erythrocytes have been observed. Effects of 1,2-PD and DMSO cryoprotectants adsorption on  $A_w$  value in suspensions of equine erythrocytes within the range of cryoprotectants' concentrations from 0,004 to 0.06% were studied.

It has been shown that within the studied concentration range the  $A_w = A_w(C)$  dependencies for the observed cryoprotectants are similar and are of bound curve, being at 0.015% concentration for 1,2-PD and 0.03% for DMSO. An explanation of these bends may be cryoprotectant competition with water for the sorption areas. Within the range of concentrations above 0.04% for 1,2-PD and 0.05% for DMSO the water activity in the system depends on cryoprotectant molecule number in a volume unit of the studied system.

Thus, the presence of two concentration areas, determining cryoprotectant effect on water activity in suspension of equine erythrocytes has been experimentally proved. Within the range of low concentrations the key factor of cryoprotectant effect on water activity is adsorption. With the growth of cryoprotectant concentration the adsorption decreases and osmotic action of cryoprotectant depends on water activity in suspension.

# Сохранность плазмид в криоконсервированных клетках *Escherichia coli*

Ю.В. ПАНАСЕНКО<sup>1</sup>, В.Л. ПОНОМАРЕВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Integrity of Plasmids in Cryopreserved *Escherichia coli* Cells

YU.V. PANASENKO<sup>1</sup>, V.L. PONOMARYOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Значительную роль в патогенности и вирулентности бактерий играют плазмиды. Являясь внехромосомными факторами наследственности, они детерминируют ферменты агрессии, адгезины, токсины, β-лактамазу и другие факторы патогенности.

При разработке новых антимикробных препаратов, диагностических тест-систем, рациональных схем антибиотикотерапии, вакцин нового поколения учитывают наличие плазмид в патогенных и условно-патогенных бактериях.

Плазмиды и плазмидные штаммы бактерий также широко используются в генной инженерии для получения промышленных штаммов – продуцентов биологически активных веществ. Обязательное депонирование таких штаммов предусмотрено законодательством некоторых стран, в том числе и Украины.

Было показано, что криоконсервирование – надежный метод длительного хранения плазмидных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в жизнеспособном состоянии. Замораживание этих бактерий в различных защитных средах с различными скоростями охлаждения, а также последующее хранение при температуре жидкого азота обеспечивают высокую сохранность их пролиферативных свойств.

Непременным условием хранения плазмидных штаммов бактерий в коллекциях микроорганизмов является сохранность генетического материала в бактериальных клетках.

Цель исследования – изучение сохранности плазмид в клетках плазмидных штаммов бактерий *E. coli*.

Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали “чашечным” методом Коха по способности к колониеобразованию. Сохранность плазмид определяли двумя методами: по фенотипическим маркерам бактериальных клеток на селективных средах и по сохранности структуры и количества плазмид (с помощью электрофореза).

Было установлено, что замораживание клеток в мясо-пептонном бульоне (МПБ) и в МПБ с добавлением одного из криопротекторов (ДМСО, сахароза, глицерин, сыворотка крови КРС) обеспечивало сохранность жизнеспособности не только бактериальных клеток, но и плазмидного профиля.

Полученные данные позволяют использовать криоконсервирование для долгосрочного хранения плазмидных штаммов бактериальных клеток в коллекциях микроорганизмов.

Significant role in pathogenesis and virulence of bacteria is played by plasmids. Being extra-chromosome factors of inheritance they determine the enzymes of aggression, adhesions, toxins, beta-lactamase and other pathogeneity factors.

When developing the new anti-microbe formulations, diagnostic test systems, reasonable protocols of antibiotic therapy, vaccines of new generation the presence of plasmids in pathogenic and conditionally pathogenic bacteria is taken into consideration.

Plasmids and plasmid bacteria strains are widely used in gene engineering for obtaining the industrial strains, producers of biologically active substances. Mandatory deposit of these strains is foreseen with the legislation of some countries, including Ukraine.

We have shown the cryopreservation as the reliable method of long-term storage of plasmid strains of *Enterobacteriaceae* bacteria in a viable state. Freezing of these bacteria using various protective media with different cooling rates, as well as following storage at the liquid nitrogen temperature provide a high integrity of their proliferative properties.

The precondition for the storage of plasmid bacteria strains in collections of microorganisms is the integrity of genetic material in bacterial cells.

The research aim was to study the integrity of plasmids in cells of plasmid strains of *E. coli* bacteria.

Viability of bacterial cells was assessed by means of Koch's plate method on the ability to colony formation. The integrity of plasmids was found with two methods: on phenotype markers of bacterial cells in selective media and on the integrity of structure and number of plasmids by means of electrophoresis.

It has been established that freezing of cells in meat peptone broth (MPB) and in MPB with adding one of cryoprotectants (DMSO, sucrose, glycerol, bovine blood serum) provided the integrity of viability not only bacterial cells, but also plasmid profile.

The obtained data enable to use cryopreservation for long-term storage of plasmid strains of bacterial cells in collections of microorganisms.

## Влияние режимов замораживания на криоконсервирование тромбоцитов человека под защитой многокомпонентных криопротекторных сред

О.А. БОГДАНЧИКОВА, А.М. КОМПАНИЕЦ

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

## Effect of Freezing Regimens on Cryopreservation Efficiency of Platelets under Protection of Multicomponent Cryoprotective Solutions

O.A. BOGDANCHIKOVA, A.M. KOMPANIETS

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

Оптимизация методов криоконсервирования тромбоцитов человека для клинической практики остается актуальной задачей криобиологии.

Цель работы – изучение влияния неконтролируемых режимов охлаждения концентратов тромбоцитов в различных комбинированных криозащитных растворах на сохранность морфофункциональных свойств кровяных пластинок.

Концентрат тромбоцитов (КТ) получали из дозы цельной крови, заготовленной на растворе “Глюгидир”, способом из лейкоцитомоноцитарного слоя. Образцы КТ соединяли с многокомпонентными растворами на основе криопротекторов ряда амидов и полиолов, после 30 мин насыщения их замораживали в контейнерах, размещенных на разной высоте над поверхностью зеркала азота, погружением в азот. При замораживании использовали режимы с рассчитанными скоростями: 0,5–3,5 и 16–30°C/мин. Изменение температуры регистрировали медь-константовой термопарой. Количественную сохранность тромбоцитов определяли после размораживания образцов, функциональные показатели тромбоцитов – после удаления криопротекторов.

Замораживание тромбоцитов в многокомпонентных криозащитных средах позволяет получить высокие показатели морфологической и функциональной сохранности кровяных пластинок. Замораживание со скоростью 0,5–3,5°C/мин характеризуется длительным плато кристаллизации системы (до 21 мин). При замораживании со скоростью 16–30°C/мин повышаются показатели сохранности тромбоцитов для всех исследуемых в работе многокомпонентных растворов. Это объясняется тем, что при криоконсервировании с большей скоростью значительно уменьшается длительность фазового перехода “вода-лед”, наблюдаемая на термограммах, что сокращает время нахождения тромбоцитов в концентрированном растворе. Замораживание путем погружения в азот вызывает значительное снижение всех функциональных показателей тромбоцитов, наблюдается отсутствие АДФ-агрегации. Отмечены высокие показатели сохранности тромбоцитов, криоконсервированных со скоростью 16–30°C/мин с раствором на основе диметил-ацетамида и оксиэтилированного глицерина (n = 5). Данная криозащитная среда при замораживании с большей скоростью позволяет значительно сократить время нахождения тромбоцитов в концентрированных растворах, избежать переохлаждения, которое является одним из повреждающих факторов при криоконсервировании, а также сохранить наибольшую функциональную полноценность тромбоцитов при замораживании.

Optimization of human platelet cryopreservation methods for clinical application remains a current task for cryobiology.

The research aim is the study of effect of non-controlled freezing regimens of platelet concentrates of different combined cryoprotective solutions on integrity of morpho-functional properties of blood platelets.

The concentrate of platelets (CP) was derived from the whole blood dose, procured with “Glugicyr” solution by the method of leukocyte-platelet layer (LPL). The samples of CP added to multicomponent solutions, based on cryoprotectants of amide and polyols series. After 30 min saturation they were frozen in the containers, placed at various heights above the nitrogen surface by plunging into nitrogen. During freezing the regimens with calculated rates as 0.5–3.5 and 16–30°C/min were used. Changing of temperature was recorded with copper-constantan thermocouple. Quantitative integrity of platelets after thawing of the samples and functional indices of platelets after removal of cryoprotectants were determined.

Freezing of platelets in multicomponent cryoprotective media enables to obtain the high indices of morphological and functional integrity of blood plates. Freezing with the 0.5–3.5°C/min rate is characterized with long-term crystallization plateau of the system (up to 21 min). During freezing with 16–30°C/min rate the integrity indices of platelets for all the studied multicomponent solutions are increased. This is explained by the fact that during cryopreservation with higher freezing rate there is a significant reduction in the duration of phase transition “water-ice”, observed in thermograms, that reduce the time of platelets being in a concentrated solution. Freezing with plunging into nitrogen induces significant reduction of all functional indices of platelets, the absence of ADP-induced aggregation is observed. The high integrity indices of platelets, cryopreserved with 16–30°C/min with the solution based on dimethyl acetamide and oxyethylated glycerol (n = 5) are noted. This cryoprotective medium during freezing with higher rate enables to significantly decrease the time of being platelets in concentrated solutions, to avoid over-cooling, which is one of damaging factors during cryo-preservation, and also to preserve the higher functional integrity of platelets during freezing.



# Особенности модификации морфофункциональной организации раковых стволовых клеток аденокарциномы Эрлиха после криоконсервирования

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

## Peculiarities of Modification of Morphofunctional Organization of Cancer Stem Cells of Ehrlich Adenocarcinoma After Cryopreservation

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

Изучение особенностей воздействия факторов криоконсервирования на злокачественно трансформированные клетки и ткани имеет особую значимость. Как в случае криодеструкции тканевых субстратов, так и при необходимости сохранения потенциала перевиваемых культур опухолевых линий основной мишенью действия факторов криоконсервирования являются стволовые раковые клетки (СРК). Одной из удобных моделей для исследования воздействия низких температур на опухолевые клетки в целом и СРК, в частности, является асцитическая форма аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Цель работы – оценить структурно-функциональные характеристики СРК на разных этапах роста АКЭ и характер их изменений после воздействия факторов криоконсервирования.

Объектом исследования были клетки АКЭ. Эксперименты выполнены на 7-месячных самках мышей BALB/c, которым клетки АКЭ вводили внутрибрюшинно. АКЭ получали на 7- и 14-е сутки (АКЭ-7, АКЭ-14), затем криоконсервировали в асцитической жидкости без применения криопротекторов по двухэтапной программе. Экспрессию маркеров CD44<sup>+</sup>/24<sup>-</sup> и CD44<sup>high</sup> оценивали на проточном цитофлуориметре. Жизнеспособность клеток определяли при помощи пропидий йодида.

При оценке экспрессии маркеров CD44<sup>+</sup>/24<sup>-</sup> и CD44<sup>high</sup> на клетках АКЭ до и после криоконсервирования показано, что только определенная часть клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры СРК, подвергается отрицательному влиянию криоконсервирования. Показано, что СРК разных сроков культивирования по-разному изменяют функции после аналогичных условий криоконсервирования. Такого рода изменения состояния СРК существенно влияли на темп удвоения количества клеток, кратность увеличения абсолютного количества клеток в перитонеальной полости как интегрального показателя интенсивности развития опухолевого процесса. Обсуждаются вопросы значимости исходного состояния исследуемого биообъекта в определении его криолабильности.

Study of the effect peculiarities of cryopreservation factors on malignantly transformed cells and tissues is of special value. Both in the case of cryodestruction of tissue substrates and when it is necessary to preserve the potential of inoculated cultures of tumour lines the main targets of the action of cryopreservation factors are cancer stem cells (CSCs). One of convenient models for studying the effect of low temperatures on tumour cells in a whole and on CSCs, in particular, is ascitic form of Ehrlich adenocarcinoma (EAC).

The research aim is to estimate structural and functional characteristics of CSCs at various stages of EAC and the character of their changes after cryopreservation effect.

The research objects were EAC cells. The experiments were performed in 7 months' female BALB/c mice, which were introduced intraperitoneally with EAC. EAC cells were obtained to the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days (EAC-7 and EAC-14), then they were cryopreserved in ascitic fluid with no cryoprotectants according to two-step program. The expression of CD44<sup>+</sup>/24<sup>-</sup> and CD44<sup>high</sup> markers in EAC cells prior to and after cryopreservation was estimated by means of flow cytometer. Cell viability was determined using propidium iodide (PI).

During estimation of the expression of CD44<sup>+</sup>/24<sup>-</sup> and CD44<sup>high</sup> markers in EAC cells prior to and after cryopreservation it has been shown that only certain part of cells expressing on their surface CSCs markers are subjected to negative effect of cryopreservation. It has been demonstrated that CSCs of different culturing terms in a different way change the functions after the analogous cryopreservation conditions. These changes in the state of CSCs significantly affected the rate of cell number duplication, enlargement factor of absolute number of cells in peritoneal cavity as an integral index of the intensity of tumour development. The questions about the value of initial state of the studied biological object in determining its cryolability are under discussion.

# Исследование содержания стволовых раковых клеток как дополнительный критерий оценки эффективности превентивной терапии онкопатологии криоконсервированными клетками фетальной печени

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

## Study of Content of Cancer Stem Cells as Additional Assessment Criterion for Efficiency of Preventive Therapy of Oncological Pathologies with Cryopreserved Fetal Liver Cells

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

Изучение механизмов канцерогенеза продемонстрировало наличие в опухолях стволовых раковых клеток (СРК), ответственных за инициацию и распространение рака. При раке молочной железы (РМЖ) СРК представлены гетерогенной популяцией, которая объединяет CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>hi</sup>, CD133<sup>+</sup>-клетки, локализуемые не только в опухоли, но и в нормальных тканях молочной железы (МЖ). Выявление этих клеток может иметь важное диагностическое значение, а также помочь в выборе методов лечения онкопатологии. Один из таких методов – введение в организм криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП) до клинической манифестации опухоли.

Цель работы – идентификация клеток с предполагаемым фенотипом СРК в МЖ мышей линий С3Н с генетически детерминированным развитием РМЖ без лечения или превентивно леченных криоконсервированными КФП.

Эксперименты проведены на 16-месячных мышках-самках линии С3Н и СВА (контроль). Мыши линии С3Н были разделены на 7 групп: I – без видимых проявлений РМЖ; II – с одной опухолью; III – с двумя и более опухолями; IV–VII – животные, которым в 6 месяцев превентивно были введены криоконсервированные КФП или нативные КФП в двух дозах (1 и 5×10<sup>6</sup>). Для определения содержания СРК в тканях МЖ на проточном цитометре FACS Calibur использовали моноклональные антитела к рецепторам CD44, CD24, CD133.

У мышей I группы по отношению к контролю выявлено высокое содержание предполагаемых СРК CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup> и обнаружены клетки CD44<sup>hi</sup>. При манифестации опухолевого процесса содержание этих клеток зависело от степени распространенности опухолевого процесса. Наиболее высокий уровень популяций СРК установлен у мышей III группы (с несколькими опухолями). Для мышей II группы (с единичной опухолью) характерно наличие клеток CD44<sup>hi</sup> при низком содержании CD133<sup>+</sup>-клеток. Уровень СРК у мышей леченных групп был значительно ниже, чем в I группе, при этом клетки CD44<sup>hi</sup> не выявлялись. Тем не менее максимальное приближение данных показателей к контрольным наблюдали в III и IV группах, что коррелировало с более высокой выживаемостью животных этих групп.

Таким образом, была показана обратная корреляция уровня СРК с эффективностью проводимой превентивной терапии КФП.

Результаты проведенных экспериментов позволили установить связь между содержанием СРК и степенью распространенности опухолевого процесса у мышей линии С3Н.

Investigation of cancerogenesis mechanisms demonstrated the presence in tumours of cancer stem cells (CSCs) responsible for initiation and expansion of cancer. At breast cancer (BC) the CSCs are represented by heterogeneous population comprising CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>hi</sup>, CD133<sup>+</sup> cells, localized not only in a tumour, but also in normal tissues of mammary gland (MG). The revealing of these cells may have an important diagnostic value as well as can help in the choice of the treatment methods in oncological pathology case. One of these methods is the introduction into organism of cryopreserved fetal liver cells (FLCs) prior to clinical manifestation of tumour.

The research aim is identification of cells with supposed phenotype of CSCs into MGs of C3H mice with genetically determined development of BC with no treatment and preventively treated with cryopreserved FLCs.

The experiments were carried-out in 16 months female C3H mice and in the CBA control ones. C3H mice were divided into 7 groups: 1 – with no visible manifestations of BC; 2 – with one tumour; 3 – with two or more tumours; 4–7 groups were the animals preventively injected at 6 months with either cryopreserved FLCs (1 and 5×10<sup>6</sup>) or native ones (1 and 5×10<sup>6</sup>) in double doses. For determining the CSCs in MG tissues with FACS Calibur flow cytometer there were used monoclonal antibodies to CD44, CD24, CD133 receptors.

In mice of I group in respect to the control the high content of supposed CSCs CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup> as well as CD44<sup>hi</sup> cells are found. During manifestation of tumour process the content of these cells depended on the tumour incidence rate. The highest level of CSCs population was observed in mice of III group (with several tumours). For mice of II group (with single tumour) the presence of CD44<sup>hi</sup> cells under low content of CD133<sup>+</sup> cells was characteristic. The level of CSCs in treated groups of mice was significantly lower than in I group, herewith no CD44<sup>hi</sup> cells were revealed. Nevertheless maximum approaching of these parameters to the control was observed in III and IV groups, that correlated to higher survival of animals from these groups.

Thus, an opposite correlation of CSCs level with the efficiency of carried-out preventive therapy with FLCs was shown.

The results of performed experiments enabled to establish the relationship between the content of CSCs and degree of tumour expansion rate in C3H mice.

## О механизмах активации противовирусной защиты препаратом “Гемокорд”

Е.В. БРОВКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## About Mechanisms of Antiviral Protection with “Hemocord” Preparation

E.V. BROVKO

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

Из всех известных вирусов, вызывающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей, самым распространенным является вирус гриппа. Высокая заболеваемость, высокий уровень смертности и инвалидизации пациентов в результате заболевания гриппом – актуальные проблемы здравоохранения во всем мире. Постоянная мутация вируса-возбудителя приводит к появлению новых его подтипов, проблемных для уже сформированного иммунитета человека. В связи с этим остается открытым вопрос создания неспецифической противовирусной вакцины, обеспечивающей профилактику заболеваемости гриппом.

В ИПКиК НАН Украины разработан препарат “Гемокорд”, представляющий собой криоконсервированную суспензию ядросодержащих клеток кордовой крови человека в аутологичной плазме. На этапе предварительных исследований установлено наличие противовирусной активности препарата по отношению к вирусу гриппа в экспериментах *in vitro* (торможение агглютинации эритроцитов, вызванной вирусом гриппа) и *in vivo* (предварительное введение препарата увеличивает продолжительность жизни зараженных животных). Существует предположение, что одним из возможных путей реализации такого рода активности препарата может быть активация клеток моноцитарно-макрофагальной системы (МФС). Эти клетки при контакте с конкретным штаммом вируса гриппа инициируют пролиферацию и дифференцировку конкретного клона Т-лимфоцитов, обеспечивающих распознавание индуктивного начала и активацию воспалительного каскада иммунитета. Цитокины с такой активностью вызывают существенную перестройку натуральных киллеров и повышение их цитолитического потенциала.

Цель данной работы – изучение функциональной активности клеток МФС при инфицировании вирусом гриппа в разные сроки после применения препарата “Гемокорд”.

Исследованы количественное содержание клеток МФС перитонеальной полости мышей и их фагоцитарная активность при заражении животных вирусом гриппа через 6 и 12 месяцев после введения препарата. Установлено, что “Гемокорд” стимулирует функциональную активность клеток МФС у интактных животных и животных, зараженных вирусом гриппа спустя 6 и 12 месяцев после его введения.

Таким образом, активация клеток МФС под влиянием “Гемокорда” является одним из механизмов обеспечения защитного противовирусного потенциала препарата, тем самым, возможно, продлевая жизнь животным, зараженным летальной дозой вируса гриппа. “Гемокорд” может рассматриваться как новый препарат для профилактики заболеваемости вирусом гриппа с выраженным иммуностимулирующим эффектом.

From all the known viruses causing the infectious diseases of upper respiratory tracts the most spread one is gripe virus. High morbidity, high level of mortality and disability of patients as a result of gripe are current problems of health care worldwide. Constant mutation of causal virus results in the appearance of its new subtypes, which are topical for already formed human immunity. In this connection the question of creation of non-specific antiviral vaccine, providing the prevention of gripe disease, has still remained open.

At IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine there has been designed “Hemocord” preparation, representing cryopreserved suspensions of cord blood nucleated cells in autological plasma. At the stage of preliminary studies the presence of antiviral activity of preparation in respect of the gripe virus *in vitro* (inhibition of erythrocyte agglutination, caused by gripe virus) and *in vivo* (preliminary introduction of preparation increases the survival of infected animals) was established. There is suggestion that one of possible ways of realisation of such an activity of preparation may be the activation of cells of monocyte-macrophage system (MMS). These cells during the contact with certain strain of gripe virus initiate proliferation and differentiation of certain clone of T-lymphocytes, recognizing an inductive onset and activation of inflammatory cascade of immunity. Cytokines with such an activity cause significant re-arrangement of natural killers with increasing their cytological potential.

The research aim was investigation of functional activity of MMS cells during infection with gripe virus in different terms after application of “Hemocord” preparation.

The quantitative content of MMS cells of peritoneal cavity of mice and their phagocyte activity at the infection of animals with gripe virus 6 and 12 months later preparation injection have been studied. It has been established that “Hemocord” stimulates functional activity of MMS cells in intact animals and those gripe-infected in 6 and 12 months after its injection.

Thus, the activation of MMS cells under “Hemocord” effect is one of the mechanisms providing the protective antiviral potential of preparation, thereby probably making longer the life of animals infected with lethal dose of gripe virus. “Hemocord” may be considered as a new preparation to prevent the gripe virus morbidity with manifested immune stimulating effect.

# Репаративная регенерация хрящевой ткани после криовоздействия, сочетанного с механической травмой под влиянием низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови

Е.Г. ИВАНОВ, А.К. ГУЛЕВСКИЙ

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

## Reparative Regeneration of Cartilage Tissue after Cryoeffect Combined with Mechanical Trauma under Influence of Low Molecular Cord Blood Fraction (Below 5 kDa)

YE.G. IVANOV, A.K. GULEVSKY

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

В настоящее время для стимуляции репаративной регенерации хряща в случае его механического повреждения используется криовоздействие. Возможно, что криовоздействие, сочетанное с применением биологически активных веществ, направленных на регенерацию хрящевой ткани, может привести к новому биогенному эффекту. В этом аспекте интересно изучение активности низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции, выделенной из криогемолизата кордовой крови коров (ФКК).

Цель работы – исследование криовоздействия при сочетанном использовании низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови коров на синтез полисахаридных компонентов матрикса и белков соединительной ткани хряща, на двигательную активность экспериментальных животных и динамику восстановления морфологической целостности хряща после механической травмы.

Фракцию с компонентами молекулярной массы до 5 кДа из кордовой крови крупного рогатого скота выделяли методом ультрафильтрации. Механическое повреждение хряща осуществляли наконечником бормашины, криовоздействие – металлической иглой, предварительно охлажденной в жидком азоте.

Результаты рентгенологического исследования хряща позволили установить, что ФКК существенно стимулирует регенерацию хряща после механической травмы по сравнению с контролем, но даже на 28-е сутки дефект хряща сохраняется. Следует отметить, что инъекции ФКК стимулируют нормализацию двигательной активности значительно быстрее по сравнению с группой животных, не получавших лечения.

При сравнении динамики накопления в регенерате хряща гликозаминогликановых компонентов – гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и гепарина установлено, что под влиянием ФКК происходит существенная стимуляция синтеза этих компонентов хряща уже на 14-е сутки.

Положительная динамика накопления белковых компонентов хряща (оксипролина и тирозина) в группе опытных животных по сравнению с группой животных, не получавших лечения, наблюдается весь период исследования.

Установлено, что криовоздействие на хрящ, сочетанное с применением ФКК, существенно стимулирует накопление основных компонентов матрикса и белковых компонентов, тем самым поддерживая более высокий потенциал его регенерации. В ходе исследования нормализуется двигательная активность экспериментальных животных и стабилизируется структурная целостность хряща.

Nowadays cryoeffect is used for stimulation of reparative cartilage regeneration in case of its mechanical damage. Probably that cryoeffect combined with the using of biologically active substances directed to cartilage tissue regeneration may result in a new biogenic effect. In this aspect the study of activity of low molecular (below 5 kDa) fraction isolated from cryohemolysate of cattle cord blood (CBF) is of interest.

The research aim was the investigation of the cryoeffect with combined application of low molecular fraction (below 5 kDa) of cattle cord blood on the synthesis of polysaccharide components of matrix and proteins of cartilage connective tissue, and on motion activity of experimental animals and recovery dynamics of cartilage morphological integrity after mechanical trauma.

The fraction with the components of molecular mass beyond 5 kDa from cattle cord blood was isolated by means of ultrafiltration. Cartilage was mechanically damaged with dental drill tip. Cryoeffect was performed with metal needle preliminarily cooled in liquid nitrogen.

The results of X-ray study enabled to establish that CBF stimulated the regeneration of cartilage after mechanical trauma if compared with the control, but even to the 28<sup>th</sup> day the cartilage defect was kept. It should be noted that CBF injections stimulate the normalization of motion activity much more rapid if compared with the group of animals with no treatment.

When comparing in cartilage regenerate the dynamics of accumulation of glycosaminoglycan components: hyaluronic acid, chondroitin sulfates and heparin, it is established that under CBF effect there is significant stimulation of the synthesis of these cartilage components even to the 14 day.

Positive dynamics of accumulation of cartilage protein components (oxyproline and thyrosine) in the group of experimental animals if compared with the group of animals with no treatment is observed during the whole study period.

It has been established that cryoeffect combined with the CBF using on cartilage significantly stimulates the accumulation of main components of the matrix and protein components thereby supporting higher potential of its regeneration. During the study the motion activity of experimental animals is normalized and cartilage structural integrity is significantly stabilized.

## Моделирование компрессионной патологии межпозвонковых дисков и оценка эффективности клеточной терапии

М.С. ФИЛИППОВА<sup>1</sup>, Н.А. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, В.Н. КУЦЫН<sup>2</sup>, В.В. ВОРОБЬЕВ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Харьковская областная клиническая больница

## Modeling of Compression Pathology of Intervertebral Discs and Assessment of Cell Therapy Efficiency

M.S. FILIPPOVA<sup>1</sup>, N.A. VOLKOVA<sup>1</sup>, V.N. KUTSIN<sup>2</sup>, V.V. VOROBYEV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkov Regional Clinical Hospital, Kharkov, Ukraine

Применение клеточных биотехнологий с позиций доказательной медицины требует проведения доклинических экспериментов на модели животных, максимально приближенной к патологии, формирующейся у человека. В настоящее время существует множество моделей дегенеративных повреждений тканей межпозвонковых дисков (МПД), но они имеют недостатки и в полной мере не повторяют компрессионный механизм их формирования у человека.

Цель работы – изучение эффективности клеточной терапии на новой экспериментальной модели.

Исследование проведено на 50 взрослых крысах-самцах массой 300–350 г. У всех животных под кетаминным наркозом проводили резекцию 2/5 длины хвостового отдела позвоночника на уровне  $C_{xx-xi}$ , образовавшуюся культуру подшивали под кожу спины краниальнее люмбально-сакрального сочленения. Мезенхимальные стромальные клетки культивировали по общепринятой методике на протяжении 14 суток. Животным контрольной группы через 6 недель после создания компрессии в зону поражения вводили по 0,25 мл солевого физраствора, животным опытной группы –  $10^6$  МСК. Манипуляции проводили в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.2004 г., Киев, Украина). Эффективность моделирования патологии и терапевтический эффект оценивали при помощи спиральной компьютерной томографии (КТ) и гистологических методов исследования.

По данным КТ на 60-е сутки определялось уменьшение высоты МПД на уровне  $C_{v,viii}$  по сравнению с таковой до формирования компрессии. Микроскопически наиболее выраженные изменения как со стороны фиброзного кольца, так и пульпозного ядра определялись на том же уровне. В краевых отделах фиброзного кольца наблюдались расслоение и фрагментация пучков коллагеновых волокон, обширные трещины и щели. В таких областях плотность фиброхондроцитов была снижена, а на окружающих щели участках фиброхондроциты вообще отсутствовали. Пульпозное ядро было расширено, на участках, прилегающих к внутренним отделам пульпозного ядра, плотность нотохордальных клеток была снижена, обнаружено большое количество лизированных клеток. Морфометрические исследования гистологических препаратов зоны повреждения МПД животных с терапией МСК показали, что на 30-е сутки высота МПД увеличилась вместе с плотностью фиброхондроцитов в фиброзном кольце по сравнению с таковыми в контроле.

Таким образом, нами получена адекватная модель дегенеративно-дистрофических повреждений МПД и показана положительная терапевтическая тенденция применения МСК при данной патологии.

Application of cell biotechnology based on evidential medicine demands the carrying-out of pre-clinical experiments in animal model, maximally close to pathology forming in human. Nowadays there are many models of degenerative damages of intervertebral disc (IVD) tissues, but they have short-comings and do not repeat fully the compressive mechanism of their formation in human.

The research aim was to study the efficiency of cell therapy in a new experimental model.

The study was carried out in 50 adult male rats of 300–350g weight. The resection of 2/5 length of caudal part of the spine at the level of  $C_{xx-xi}$  was carried out in all the animals under ketamine narcosis and the forming stump was stitched subcutaneously on the back more cranially with respect to lumbar-sacral joint. Mesenchymal stromal cells (MSCs) were cultured according to traditional methods for 14 days. In 6 weeks the 0.25 ml of salt physiological solution was introduced into the damage zone to the animals of the control group, the animals of experimental group were injected with  $10^6$  MSCs. Manipulations were carried out according to “General principles of experiments in animals” approved by the II National Congress on Bioethics (20.09.04 Kiev, Ukraine). Modelling efficiency for pathology and therapeutic effect were estimated with spiral computer tomography (CT) and histological research methods.

According to the CT data to the 60th day there was found the reduced height of IVD at the level of  $C_{v,viii}$  if compared with that prior to compression formation. Microscopically the most manifested changes both from the side of fibrous ring and pulpal core were found at the same level. In marginal parts of fibrous ring the stratification and fragmentation of collagen fibre bundle, big cracks and slits were observed. In these areas the density of fibrochondrocytes was reduced and on the areas surrounding slits the fibrochondrocytes were absent at all. Pulpal core was widened, the density of notochoral cells was decreased on the sites adjacent to inner parts of pulpal core, large quantity of lysed cells was found. Morphometric studies of histological preparations of IVD damage zone of animals with MSC therapy have shown that to the 30th day the IVD height was increased together with the density of fibrochondrocytes in fibrous ring if compared with that ones in the control.

Thus, we have obtained an adequate model of degenerative dystrophic damages of IVD and positive therapeutic tendency of MSCs application at this pathology has been shown.

# Использование метода сенсибилизации иммунокомпетентных клеток для оценки терапевтического эффекта криоконсервированных в разных режимах фетальных нервных клеток при ЭАЭ

Е.А. ПОРОЖАН, М.В. ОСТАНКОВ

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

## Use of Sensibilization of Immune Competent Cells for Assessment of Therapeutic Effect of Cryopreserved under Different Freezing Regimens Fetal Neuronal Cells at Experimental Allergic Encephalomyelitis

Ye.A. POROZHAN, M.V. OSTANKOV

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

Доказана связь патогенеза аутоиммунных заболеваний с нарушением внутритимической дифференцировки Т-клеток и формированием их антигенраспознающего рецепторного фенотипа. Т-лимфоциты вырабатывают толерантность к аутоантигенам в тимусе, обеспечивая защиту организма от экзогенной антигенной нагрузки. Для рассеянного склероза (РС) характерна аутоиммуноагрессия против основного белка миелина. Трансплантация фетальных нервных клеток (ФНК) при лечении нейродегенеративных заболеваний, в частности РС, предполагает их криоконсервирование как этап технологического процесса.

Цель работы – оценить влияние криоконсервированных при различных режимах режимов ФНК на степень десенсибилизации ИКК к энцефалитогенным структурам при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ).

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с правилами “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). Суспензию ФНК получали методом механической дезинтеграции фрагментов мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации. Криоконсервирование ФНК проводили с использованием 10% ДМСО на программном замораживателе УОП-1 по режимам: P1, P2 и P3. Сравнительный анализ субпопуляционного состава нФНК и кФНК осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител: nestin, GFAP,  $\beta$ -tubulin (BD Pharmingen). ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой. Суспензии нФНК и кФНК вводили внутрибрюшинно на 14-е сутки развития патологии в дозе  $5 \times 10^6$  клеток на 100 г массы животного. Степень сенсибилизации лимфоцитов селезенки животных с ЭАЭ к энцефалитогенным структурам оценивали с помощью метода сокультивирования этих клеток с ФНК. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Установлено, что криоконсервирование по режиму P1 и в большей степени по режиму P2 обеспечивало селективное перераспределение субпопуляционного состава ФНК в сторону увеличения nestin<sup>+</sup> и  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> и снижения GFAP<sup>+</sup>-клеток. Субпопуляционный состав кФНК при режиме P3 достоверно не отличался от нативного материала. Оценка эффекта ФНК на патологический процесс по степени десенсибилизации лимфоцитов показала, что режим P2 был оптимальным. Вероятно, ФНК действуют за счет активации супрессорного звена иммунитета, подавляя аутоиммунную реакцию.

Таким образом, продемонстрирована способность криоконсервирования управлять состоянием биообъекта, в частности ФНК, изменяя в разной степени при разных режимах проявления патологического процесса и, как следствие, сенсибилизацию ИКК при нейродегенеративных заболеваниях аутоиммунной природы.

The relationship of pathogenesis of autoimmune diseases with damage of intrathymic differentiation of T-cells and formation of their antigen-recognizing receptor phenotype has been proved. T-lymphocytes produce tolerance to autoantigens in thymus, providing the protection of an organism against exogenous antigen loading. For multiple sclerosis (MS) auto-immune aggression against myelin basic protein is characteristic. Transplantation of fetal neuronal cells (FNCs) when treating neurodegenerative diseases, in particular MS, supposes their cryopreservation as the stage of technological process.

The research aim is to estimate the effect of cryopreserved FNCs under different regimens on desensibilization rate of immune competent cells (ICCs) to encephalitogenic structures at experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

The experiments in animals were carried-out according to the statements of “European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and scientific purposes” (Strasbourg, 1985). The suspension of FNCs was obtained with mechanical disintegration of rat's embryo brain fragments of 11 gestation days. FNCs were cryopreserved using 10% DMSO with programmable freezer UOP-1 according to R1, R2 and R3 regimens. Subpopulation composition of nFNCs and cFNCs was comparatively analyzed using flow cytofluorimeter with monoclonal antibodies: nestin, GFAP,  $\beta$ -tubulin (BD Pharmingen). EAE was induced in rats according to the Davydova's method. The suspensions of nFNCs and cFNCs were intraperitoneally introduced to the 14<sup>th</sup> day of pathology development in a dose of  $5 \times 10^6$  cells per 100 g of animal's mass. The sensibilization rate for lymphocytes of spleen of animals with EAE to encephalitogenic structures was assessed using coculturing of these cells with FNCs. The results were statistically processed using the Mann-Whitney's criterion.

It has been shown that cryopreservation on R1 regimen and in greater extent on R2 one provided the selective redistribution of sub-population composition of FNCs towards the increase of nestin<sup>+</sup> and  $\beta$ -tubulin<sup>+</sup> and decrease in GFAP<sup>+</sup> cells. Subpopulation composition of cFNCs at R3 regimen significantly did not differ from native material. The assessment of FNCs effect on pathological process on the degree of lymphocyte desensibilization has shown that R2 regimen was an optimal one. The FNCs likely act due to activation of suppressor link of immunity, suppressing an autoimmune reaction.

Thus, the ability of cryopreservation to control the state of biological object, in particular FNCs, by altering in a different extent at various regimens the pathological process manifestation and as a consequence the sensibilization of ICCs at neurodegenerative diseases of autoimmune origin was demonstrated.

# Сравнительный анализ морфологии и эндокринной функции аллотрансплантатов овариальной ткани и неонатальных яичников крыс

Ю.О. Тищенко<sup>2</sup>, В.В. Киروشка<sup>1</sup>, Т.П. Бондаренко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Comparative Analysis of Morphology and Endocrine Function of Allografts of Rat Ovarian Tissue and Neonatal Ovary

Yu.O. Tischenko<sup>2</sup>, V.V. Kiroshka<sup>1</sup>, T.P. Bondarenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine

В настоящее время для репродуктивной физиологии, а также для клинического применения актуальными являются исследования, связанные с изучением фолликулогенеза графтов неонатальной овариальной ткани в организме половозрелого реципиента.

Цель работы – сравнительный анализ морфологии и эндокринной функции аллотрансплантатов овариальной ткани и неонатальных яичников в зависимости от исходного гормонального статуса животных-реципиентов. Животных-реципиентов разделили на следующие группы: крысы, которым аллотрансплантацию овариальной ткани или неонатальных яичников под капсулу почки осуществляли одновременно с овариэктомией (группа I) и через 2 месяца после нее (группа II).

Показано, что у животных группы I аллотрансплантаты имеют нативную структуру овариальной ткани в течение 30 суток, тогда как при трансплантации неонатальных яичников подобная картина наблюдалась только у 30% животных. При увеличении сроков наблюдения до 60 суток у 70% животных с трансплантатами овариальной ткани в группе I сохраняется ее полноценная структура. На этих же сроках морфология графтов неонатальных яичников характеризуется сохранением только стромы овариальной ткани и развитием фолликулярных кист. Анализ структуры аллотрансплантатов овариальной ткани и неонатальных яичников животных группы II к 30-м суткам показал наличие всех стадий фолликулогенеза. На 60-е сутки графты овариальной ткани животных этой группы характеризуются сохранением стромы, отсутствием развивающихся фолликул и наличием фолликулярных кист. При трансплантации неонатальных яичников выявлены развивающиеся фолликулы у 50% животных.

Изучение эндокринной функции показало ее восстановление у животных группы I в течение 60-ти суток с графтами овариальной ткани. Недостовверное снижение концентрации эстрадиола и прогестерона по отношению к контролю наблюдалось при имплантации неонатальных яичников животным группы II к 30-м суткам. В остальных случаях полноценного восстановления эндокринной функции не отмечено, но выявлено достоверное повышение уровня половых гормонов по сравнению с овариэктомизированными животными.

Можно сделать вывод, что графты овариальной ткани на длительных сроках наблюдения более полноценно сохраняют свои морфофункциональные характеристики при их трансплантации одновременно с овариэктомией, тогда как графты неонатальных яичников – при трансплантации предварительно овариэктомизированным животным.

Nowadays for reproductive physiology as well as for clinical application the studies associated to the investigations of follicle genesis of the grafts of neonatal ovarian tissue in a mature recipient organism are the actual ones.

The research aim was to comparatively analyze the morphology and endocrine function of allografts of ovarian tissue and neonatal ovary depending on initial hormonal status of recipient animals. The recipient animals were divided into the following groups: the rats allotransplanted with ovarian tissue or neonatal ovary under renal capsule simultaneously with ovariectomy (group I) and in 2 months after it (group II).

It has been shown that allografts in the animals of group I have native structure of ovarian tissue for 30 days, meanwhile during transplantation of neonatal ovary the similar picture was observed only in 30% of animals. With the extending of observation terms up to 60 days in 70% of animals with the grafts of ovarian tissue in the group I its integral structure has been kept. At the same terms the morphology of neonatal ovary grafts is characterized with preservation of just stroma of ovarian tissue and development of follicular cysts. The analysis of the structure of allografts of ovarian tissue and neonatal ovary for the animals of the group II to the 30<sup>th</sup> day has shown the presence of all stages of follicle genesis. To the 60<sup>th</sup> day the grafts of ovarian tissue of the animals of this group are characterized with preserved stroma, absence of developing follicles and presence of follicular cysts. During transplantation of neonatal ovary in 50% of animals the developing follicles were revealed.

Study of endocrine function has shown its recovery in the animals of group I for 60 days with the grafts of ovarian tissue. Insignificant reduction of estradiol and progesterone concentration in respect to the control was observed during implantation of neonatal ovary to the animals of group II to the 30<sup>th</sup> day. In the rest cases no complete recovery of endocrine function is observed, but there is noted significant increase of the level of sexual hormones if compared with ovariectomized animals.

One may conclude that grafts of ovarian tissue at long observation terms preserve more properly their morphofunctional parameters at their transplantation simultaneously with ovariectomy, whilst the grafts of neonatal ovary do during transplantation of preliminary ovariectomized animals.

# Біологічна дія екстрактів тваринного походження при холодових травмах шкіри та слизової оболонки рота

А.В. ШИНДЕР, Н.Ю. ЄРМАКОВА

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

## Biological Effect of Extracts of Animal Origin under Cold Traumas of Skin and Oral Mucous

A.V. SHINDER, N.YU. YERMAKOVA

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

Досліджено вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней (ЕСС) і екстракту з підмору бджіл (ЕПБ) на динаміку загоєння холодових ран, інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та лейкоцитарний профіль крові щурів.

Холодові травми моделювали аплікатором з температурою  $-196^{\circ}\text{C}$ . ЕСС одержували, інкубуючи кріоконсервовані фрагменти органу в фізіологічному розчині. Термолабільні білки вилучали, а ЕПБ одержували екстракцією бджолиного підмору в апараті Соклета та очищали від ліпофільних компонентів. Екстракти вводили щурам в черевну порожнину по 1 мл один раз на добу. Концентрація пептидів в ЕСС становила 100 мкг/мл, а сухо екстракту в ЕПБ – 0,25 мг/мл.

Швидкість та якість загоєння ран визначали планіметричним, гістологічним та електронно-мікроскопічним методами, інтенсивність ПОЛ за рівнем ТБКАП в сироватці крові – спектрофотометричним методом за стандартною методикою. Для визначення стійкості до перекисного окислення в ячею хемілюмінметра, яка містить 1 мл фізіологічного розчину і 100 мкл сироватки крові, додавали 200 мкл 5%-го розчину перекису водню і реєстрували світлосуму в умовних одиницях. Для аналізу лейкоцитарного профілю крові тварин визначали лейкоцитарну формулу в процентному вираженні. Кров для досліджень брали з хвостової вени.

На 3-ю добу спостереження відмінностей в стані ран і їх площі в контрольних і дослідних групах не спостерігалось. У наступні терміни спостереження (до 21 доби) введення щурам ЕСС або ЕПБ статистично достовірно (в порівнянні з контролем) прискорювало загоєння ран.

Рівень ТБКАП та стійкість до перекисного окислення в сироватці крові щурів, яким вводили екстракти, наближались до норми в більш ранні терміни, ніж у контрольних тварин. Уведення екстрактів зменшує вираженість запальної реакції та нормалізує імунну відповідь організму на травму. Екстракти також стимулюють регенерацію слизової оболонки рота та епітеліального пласта з утворенням нормальних структур порівняно з контрольною групою.

Таким чином, ЕСС та ЕПБ можуть застосовуватись при розробці імунобіологічних препаратів для лікування ран.

There was studied the effect of cryopreserved porcine spleen fragments' extract (PSE) and the one derived from dead bee bodies (DBBE) on the dynamics of healing the cold wounds, intensity of lipid peroxidation (LPO) and leukocyte profile of rat's blood.

Cold traumas were modelled by means of applicator with the temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$ . PSE was derived by means of incubation of cryopreserved fragments of organ in physiological solution. Thermolabile proteins were isolated and DBBE was obtained with the extraction of dead bee bodies in Soxhlet device and purified from lipophilic components. The extracts were introduced to rats into peritoneal cavity by 1ml once per 24 hrs. The concentration of peptides in PSE made 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dry extract in DBBE.

The speed and quality of wounds' healing were found with planimetric, histological and electron microscopic methods. The LPO intensity on the rate of TBAAP in blood serum was examined spectrophotometrically according to the standard method. To reveal the resistance to peroxidation into the chemiluminometer well, containing 1 ml physiological solution and 100  $\mu\text{l}$  of blood serum, 200  $\mu\text{l}$  of 5% hydrogen peroxide solution was added and light sum was recorded in relative units. For analysis of leukocyte profile of animals' blood the leukocyte formula in percentage was determined. The blood for research was procured from tail vein.

To the 3<sup>rd</sup> day no differences in the state of wounds and their areas in control and research groups were observed. During the following observation terms (up to 21 days) the introduction of PSE and DBBE significantly accelerated the healing rate of the wounds (if compared with the control).

The level of TBAAP and resistance to peroxidation in blood serum of rats introduced with the extracts approached the norm earlier if compared with control animals. The introduction of extracts diminishes the manifestation of inflammatory reaction and normalizes an immune response of an organism to trauma. The extracts also stimulate the regeneration of oral mucus and epithelial layer with the formation of normal structures if compared with the control group.

Thus, PSE and DBBE may be used during the designing of immune biological formulations for wound healing.



## Влияние глиального клеточного микроокружения на нейрогенез изолированных клеток мозга новорожденных крыс

Т.Д. ЛЯШЕНКО<sup>1</sup>, А.Н. СУКАЧ<sup>2</sup>, В.С. ХОЛОДНЫЙ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный педагогический университет им. Г.С. Сковороды

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Glial Cell Microenvironment on Neurogenesis of Isolated Brain Cells of Newborn Rats

T.D. LYASHENKO<sup>1</sup>, A.N. SUKACH<sup>2</sup>, V.S.KHOLODNYI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>G.S. Skovoroda Kharkov National Pedagogic University, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Вопрос поддержания нейрогенеза в постнатальном мозге до сих пор изучен недостаточно. Существует предположение, что нейрональные предшественники могут пролиферировать только в определенном микроокружении, которое обеспечивается специфическими типами клеток, контактирующими между собой особым образом. Помимо этого известно, что астроциты продуцируют разнообразные межклеточные сигнальные вещества: как растворимые, так и мембранно-связанные, которые влияют на развитие центральной нервной системы. Поэтому мы исследовали возможность обеспечения клетками глии нейrogenного микроокружения в мозге новорожденных крыс. Эксперимент проводили на изолированных клетках, полученных из мозга новорожденных крыс. Суспензию клеток культивировали на протяжении 60 суток в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в среде DMEM/F12 в присутствии сыворотки взрослых крыс. Клетки иммуноцитохимически окрашивали на β-тубулин III и GFAP.

Проведенные исследования показали, что в процессе культивирования *in vitro* клетки мозга новорожденных крыс первоначально формируют монослой клеток глии, состоящий из астроцитов. Вероятно, в процессе образования монослоя астроцитов формируется соответствующее клеточное микроокружение, которое стимулирует нейрогенез, и мы наблюдаем образование нейробластов, которые мигрируют, созревают и образуют нейрональную сеть. В процессе культивирования также образуются колонии недифференцированных β-тубулин – положительных клеток, которые, вероятно, представляют собой пролиферирующие предшественники нейронов. В процессе культивирования их размер увеличивается, и они создают контакты с соседними колониями. При этом миграцию клеток этих колоний мы не наблюдали. Следует отметить, что в нашем эксперименте вначале происходило образование нейробластов и их созревание и лишь затем образовывались колонии нейрональных предшественников. При этом образование этих колоний происходило исключительно на монослое клеток глии, в отличие от нейробластов и дифференцированных нейронов, которые формировали нейрональную сеть как на глиальном монослое, так и на подложке, не содержащей клеток глии.

Таким образом, выявлена стимуляция клетками глии как нейрональной дифференциации, так и нейрогенеза. При этом микроокружение и факторы роста очевидно, выделяемые астроцитами, регулируют не только эти два процесса, но и миграцию нейробластов.

The question of neurogenesis maintenance in postnatal brain has not been studied well yet. There is the suggestion that neuronal precursors could proliferate only in special microenvironment, provided with specific types of cells, specifically contacting with each other. Besides, it has been known that astrocytes produce various intercellular signal substances, not only soluble, but also membrane-bound, affecting the development of central nervous system. Therefore we studied the possible providing of ability with glia cells of neurogenic microenvironment in newborn rats' brain. The experiment was carried out in isolated cells, derived from newborn rats' brain. Suspension of cells was cultured for 60 days in CO<sub>2</sub> incubator in DMEM/F12 medium at the presence of adult rat serum. Cells were immunohistochemically stained for β-tubulin III and GFAP.

The carried-out researches have shown that during *in vivo* culturing the brain cells of newborn rats firstly form monolayer of glia cells, containing astrocytes. Probably during formation process of astrocytes' monolayer a proper cell microenvironment, stimulating neurogenesis, is formed and we observed the formation of neuroblasts, which migrate, mature and form a neuronal net. During culturing the colonies of undifferentiated β-tubulin positive cells, probably being proliferating precursors of neurons, are also formed. During culturing their size grows and they are in contact with the adjacent colonies. Herewith we did not observe a cell migration of these colonies. It should be noted that in our experiment first of all the formation of neuroblasts and their maturation, took place, and only later the colonies of neuronal precursors were formed. Herewith the formation of these colonies took place only on monolayer of glia cells, contrary to neuroblasts and differentiated neurons, which formed neuronal net not only on glial monolayer, but also on embedding of glia-free cells.

Thus, the stimulation of glia cells of both neuronal differentiation and also neurogenesis was revealed. Herewith the microenvironment and growth factors, derived apparently by astrocytes, regulate not only these both processes, but also neuroblasts migration.

# Адсорбция метиленового синего и клеток *Saccharomyces boulardii* энтеросорбентами на различной основе

О.М. БАБИНЕЦ, В.Ф. МАРЦЕНЮК, Л.Е. ШАТИЛОВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Adsorption of Methylene Blue and *Saccharomyces boulardii* Cells with Differently Based Enterosorbents

O.M. BABINETS, V.F. MARTSENYUK, L.E. SHATILOVA, I.P. VYSEKANTSEV  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В настоящее время приобрели актуальность лекарственные формы препаратов в виде иммобилизованных клеток, ферментов и других биологически активных соединений.

Технологический процесс получения иммобилизованных препаратов включает этапы замораживания, лиофилизации или тепловой сушки. Экспериментальное обоснование технологий криоконсервирования и лиофилизации иммобилизованных клеток сегодня отсутствует. Ведется поиск носителей для препаратов иммобилизованных клеток медицинского назначения.

Цель исследования – изучение адсорбционной способности (АС) энтеросорбентов на разной основе.

Исследовали следующие препараты: активированный уголь (АО “Стома”, Украина), лиферан (ООО “Экосфера”, Россия), сорбекс (АО “Экосорб”, Украина), атоксил (ООО «Орисил-Фарм», Украина), мультисорб (ОАО “Ариадна”, Украина), СУМС-1 (ОАО “Новосибхимфарм”, Россия).

АС энтеросорбентов определяли с помощью двух маркеров. Способность к сорбции метиленового синего (МС) изучали по фармакопейным методикам в модификации В.И. Решетникова с соавт.(2000 г.). Способность сорбции клеток дрожжей *Saccharomyces boulardii* исследовали по разработанной нами модификации методик, используемых для оценки белоксвязывающей активности сорбентов (В.И. Решетников, 2003; Е.Л. Ерецкий, 2001).

Установлено, что все энтеросорбенты, за исключением атоксила, обладают способностью к сорбции МС. Максимальных показателей АС в условиях эксперимента энтеросорбенты достигали в течение 20–50 мин. Атоксил (препарат на основе двуокиси кремния) в течение 80 мин (время наблюдения) не сорбировал МС, что согласуется с литературными данными о преимущественно белоксвязывающей активности двуокиси кремния.

Изучение динамики сорбции клеток *S. boulardii* показало, что дрожжевые клетки сорбируются на энтеросорбентах в течение 40 мин. Были отмечены различия в интенсивности и динамике АС для различных сорбентов. Установлено влияние температуры на АС сорбентов по отношению к дрожжевым клеткам. Более высокие результаты АС наблюдали при понижении температуры до 0°C. Выявлены различия в оценке АС сорбентов с разными маркерами. Степень АС энтеросорбентов по отношению к МС и дрожжевым клеткам различна.

Nowadays the medicinal forms of formulations as immobilized cells, enzymes and other biologically active compounds have gained the actuality.

Technological process of obtaining the immobilized formulations includes the stages of freezing, lyophilization or heat drying. Experimental substantiation of cryopreservation techniques and lyophilization of immobilized cells are absent now. The carriers for preparations of immobilized cells of medical purpose are under search.

The research aim was to study the adsorption ability (AA) of variously based enterosorbents.

There were studied following formulations: activated carbon (JSC “Stoma”, Ukraine), liferan (LLC “Ekosfera”, Russia), sorbex (JSC “Ekosorb”, Ukraine), atoxil (LLC “Orisil-Farm”, Ukraine), multisorb (JSC “Ariadna”, Ukraine), SUMS-1 (JSC “Novosibkhimfarm”, Russia).

AA for the sorbents was found by means of two markers. The ability to sorption of methylene blue was studied according to pharmacopoeia methods in the modification (Reshetnikov et al., 2000). The ability of sorption of *Saccharomyces boulardii* yeast cells was investigated on our own modification of the methods used for protein-binding activity of sorbents (Reshetnikov V.I., 2003; Eretsky E. L., 2001).

It has been established that all the enterosorbents excluding atoxil possess the ability to sorption of methylene blue. Maximum indices of AA under experimental conditions were reached by the enterosorbents for 20-50 min. Atoxil (formulation based on silicone dioxide) for 80 min (observation term) did not sorb methylene blue that confirmed the literature data about predominate protein-binding activity of silicone dioxide.

Study of dynamics of the sorption of *Saccharomyces boulardii* cells has demonstrated that yeast cells are sorbed on enterosorbents for 40 min. There were found the differences in intensity and dynamics of AA for different sorbents. Temperature effect on AA of sorbents in respect to the yeast cells has been found. Higher results of AA were observed at temperature decreasing down to 0°C. The differences in estimation of AA of sorbents with different markers were revealed. The AA rate of enterosorbents relative to methylene blue and yeast cells differed.

# Криоэкстракция как метод получения биологически активных липидных субстанций, обладающих иммуномодулирующим потенциалом

М.А. КРАВЧЕНКО

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

## Cryoextraction as Method for Obtaining of Biologically Active Lipid Substances Having Immune Modulating Potential

M.A. KRAVCHENKO

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

Одним из перспективных направлений в разработке эффективных методов иммунокоррекции является возможность регуляции активности иммунокомпетентных клеток посредством воздействия на экспрессируемые ими ядерные лиганд-зависимые рецепторы, к которым относятся три подтипа пероксисом пролифератор-активируемых рецепторов (ППАР) – ППАР- $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  и  $\gamma$ .

Доказано, что активация пероксисом пролифератор-активируемых рецепторов клеток, вовлекаемых в формирование иммунного ответа, приводит к изменению баланса про- и противовоспалительных эффектов в сторону последних, что обуславливает терапевтический эффект агонистов данных рецепторов. Установлено, что к эндогенным лигандам ППАР относится ряд субстанций липидной природы, таких как жирные кислоты, эйкозаноиды и пр. Выделение такого рода биомолекул из биологического сырья, в частности из тканей плаценты, является перспективным методом получения природных иммуномодуляторов. Решение данной технологической задачи возможно при использовании методов криоэкстракции, а именно криогенного молекулярного фракционирования (КМФ). Такой подход позволяет исключить в процессе переработки воздействие на биоматериал ряда повреждающих факторов, сопутствующих традиционным методам экстракции липидных компонентов. Выделяемая методом КМФ из тканей плаценты липидная фракция представляет собой комплекс биологически активных липидных субстанций, потенциально содержащий эндогенные лиганды ППАР.

Таким образом, очевидна необходимость использования технологически обоснованного метода КМФ для криоэкстракции из плаценты комплекса биомолекул липидной природы и всесторонней аттестации их иммуномодулирующей активности.

One of perspective trends in developing of effective immune correction methods is the possible regulation of activity of immune competent cells via influence on expressed by them nucleated ligand-dependent receptors, whereto three sub-types of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) such as PPARs-  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ .

It has been proved that activation of peroxisome proliferator-activated receptors of the cells, involved into the formation of immune response results in the change of the balance of pro- and anti-inflammatory effects towards the latter, stipulating thereby therapeutic effect of agonists of these receptors. It has been established that some substances of lipid origin, such as fatty acids, eicosanoids etc. are referred to PPARs endogenous ligands. Isolation of such biomolecules from biological raw materials, in particular, from placental tissues is the perspective method of obtaining natural immune modulators. The solving of this technological task is possible when using the cryoextraction methods, namely cryogenic molecular fractioning (CMF). Such an approach allows during processing to exclude the effect on biomaterial of some damaging factors, accompanying traditional methods of extraction lipid components. Isolated with CMF from the placenta tissues the lipid fraction represents the complex of biologically active substances potentially containing the PPARs endogenous ligands.

Thus, the necessity of using the technologically substantiated method of CMF for cryoextraction from placenta of the biomolecular complex of lipid origin and versatile attestation of their immune modulating activity is evident.

# Пептидний склад сироватки крові щурів в залежності від фізіологічного стану шкіри

І.Г. БЕСПАЛОВА, Л.А. РОГОЗА

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

## Peptide Composition of Rat's Blood Depending on Physiological State of Skin

I.G. BESPALOVA, L.A. ROGOZA

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

Регуляторні пептиди приймають активну участь у регуляції як фізіологічної, так і репаративної регенерації.

Мета роботи – вивчити вплив травм різного виду та уведення екстрактів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) і селезінки свиней (ЕСС) на пептидний склад сироватки крові щурів.

Перед нанесенням травм шкіру епільовали в ділянці стегна. Три паралельні різані рани завглибшки 2 мм, завдовжки 10 мм наносили з інтервалом 5 мм. Термічні травми наносили мідним аплікатором діаметром 10 мм з температурою 100 і  $-196^{\circ}\text{C}$  при експозиції 35 і 60 с відповідно. Опромінення ультрафіолетом проводили еритемною лампою на відстані 10 см протягом 10 хв. ЕШНП та ЕСС із концентрацією пептидів 100 мкг/мл вводили в черевну порожнину по 1 мл раз на добу. Кров для дослідження брали з хвостової вени. Для визначення молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в сироватці крові використовували високо-ефективну гель-проникаючу хроматографію.

З хроматограм сироватки крові нативних щурів після уведення екстрактів та нанесення відповідних травм видно, що молекулярно-масовий розподіл пептидів залежить від умов експерименту. Найбільша кількість піків спостерігається на хроматограмах сироватки після холодової травми та ультрафіолетового опіку, а найменша – при опіковій травмі. Такий характер молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи може свідчити про різні механізми та ступінь пошкодження тканинних структур, а отже і про різні механізми специфічної відповіді всього організму на травму, які проявляються в продукції необхідних в кожному випадку пептидів для регуляції процесів запалення та регенерації.

Дослідження процесу загоєння холодкових ран виявило, що при уведенні ЕШНП або ЕСС статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшуються швидкість та якість загоєння ран, а в більш ранні строки нормалізується пептидний склад сироватки крові в порівнянні з контролем. Така дія екстрактів може бути пов'язана з наявністю в них регуляторних пептидів, які впливають на динаміку процесу запалення та нормалізують процеси регенерації.

Одержані дані свідчать, що склад речовин пептидної природи в сироватці крові щурів залежить від фізіологічного стану шкіри. Уведення екстракту шкіри та селезінки змінює цей склад, прискорює процес загоєння холодкових ран. При цьому в більш ранні строки нормалізується молекулярно-масовий спектр речовин пептидної природи в сироватці крові дослідних тварин.

Regulatory peptides actively participate in regulation of both physiological and reparative regenerations.

The research aim was to study the effect of traumas of different types and introduction of the extracts of newborn piglets skin (NPSE) and porcine spleen (PSE) on peptide composition of rat's blood serum.

Prior to making traumas the skin was epilated in thigh site. Three parallel sword-cuts of 2mm in depth, 10 mm in length were made within the interval of 5 mm. Thermal traumas were induced with copper applicator of 10 mm diameter with the temperature of 100 and  $-196^{\circ}\text{C}$  at 35 and 60 sec exposures, correspondingly. Irradiation with UV was done with sunlamp on the distance of 10 cm for 10 min. NPSE and PSE with the concentration of peptides of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  were introduced into peritoneal cavity by 1 ml once per 24 hrs. The blood for examinations was taken from a tail vein. To examine molecular-mass distribution of substances of peptide origin in blood serum there was used highly efficient gel-penetrating chromatography.

The chromatograms of blood serum of native rats after introduction of extracts and after making the correspondent traumas show that molecular-mass distribution of peptides depends on experimental conditions. The biggest number of peaks is found on chromatograms of serum after cold trauma and UV burn, and the smallest at burn trauma. This character of molecular-mass distribution of substances of peptide origin may testify to different mechanisms and degree of damage of tissue structures, as well as to those of specific response of the whole organism to trauma, manifested in the production of essential in each case peptides for regulation of healing and regeneration processes.

Study of cold wounds healing was found out that when introducing either NPSE or PSE the rate and quality of wounds' healing increase statistically and significantly ( $p < 0.05$ ), but earlier peptide composition of blood serum if compared with the control is normalized. Such an action of extracts may be related to the presence in them of regulatory peptides affecting the dynamics of healing and normalizing the regeneration process.

The obtained data testify that composition of substances of peptide origin on rat's blood serum depends in skin physiological state. The introduction of the skin and extracts alters this composition, accelerates healing of cold wounds. Herewith in earlier terms the molecular-mass spectrum of substances of peptide origin in blood serum of experimental animals is normalized.

# Вплив передпосівної обробки насіння пшениці кріопротекторами на вміст розчинних вуглеводів у рослинах та їх морозостійкість

Г.Ю. ДЬЯКОНЕНКО, Ю.С. ЛИСАК, А.М. КОМПАНИЕЦЬ  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

## Effect of Pre-Sowing Treatment of Wheat Seeds with Cryoprotectants on Content of Soluble Carbohydrates in Plants and Their Frost-Hardiness

G.YU. DYAKONENKO, YU.S. LYSAK, A.M. KOMPANIETS  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Загибель рослин взимку завдає великих економічних збитків. Тому актуальною є розробка екологічно безпечних препаратів для передпосівної обробки насіння озимих культур з метою підвищення їх морозостійкості.

Мета роботи – дослідження впливу передпосівної обробки насіння озимої пшениці розчинами кріопротекторів ПЕО-400 і ПЕО-1500, комплексних агрохімічних препаратів ЮПТЕР і ДОРСАЙ на біометричні параметри його проростання при різних температурах, морозостійкість проростків, а також на вміст розчинних вуглеводів у рослинах.

В лабораторних умовах насіння озимої пшениці сорту Харківська-105 обробляли розчинами наступних сполук в кількості 5% від маси насіння: ПЕО-400 (0,5; 1 і 2%), ПЕО-1500 (0,5; 1 і 2%); ЮПТЕР (0,5; 1; 2 і 3%) і ДОРСАЙ (0,5; 1; 2 і 3%). Визначали лабораторну схожість за умов фонові температури (20°C) і низької позитивної температури (5–10°C), вміст розчинних вуглеводів у надземній частині рослин, а також досліджували морозостійкість рослин за методом проростків.

При пророщуванні обробленого насіння в теплому приміщенні при 20°C не виявлено достовірних відмінностей від контролю. Визначена стимулююча дія передпосівної обробки насіння пшениці розчинами кріопротекторів при його пророщуванні при 5–10°C. За енергією проростання найкращими виявилися препарати ДОРСАЙ (0,5 і 1%) і ЮПТЕР (1%), за схожістю на 8-у добу – ДОРСАЙ (1%). За показниками схожості на 18-у добу, а також за масою пагона достовірних відмінностей від контролю для обробленого насіння встановлено не було. За середньою масою кореня найкращими були ПЕО-400 0,5% (50,1 мг); ПЕО-1500 0,5% (48,2 мг) і ДОРСАЙ 1% (48,2 мг) при 44,1 мг в контролі.

Виявлено, що в рослинах, вирощених з обробленого насіння, акумулюється більше розчинних вуглеводів у порівнянні з контрольними.

Виявлено підвищення морозостійкості проростків пшениці після обробки насіння розчином препарату ДОРСАЙ (1%). Спостерігалось підвищення відносного виживання рослин (56,6%) у порівнянні з контролем (41,8%). За середньою масою кореня найкращим був цей варіант (23,3 мг), а також ПЕО-400 0,5% (20,2 мг), ЮПТЕР 1% (17,2 мг) у порівнянні з контролем (9,8 мг). За середньою масою пагона кращим теж був ДОРСАЙ 1% (24,5 мг) при 20 мг в контролі. У концентраціях 2 і 3% препарати виявилися не ефективними.

Передпосівна обробка насіння озимої пшениці розчинами ПЕО-400, ПЕО-1500, ДОРСАЙ і ЮПТЕР сприяє підвищенню здатності насіння проростати при зниженій температурі (5–10°C).

Виявлена стимулююча дія обробки насіння озимої пшениці розчинами препаратів ДОРСАЙ (1%), ЮПТЕР (1%) і ПЕО-1500 (0,5%) на акумуляцію розчинних вуглеводів у рослинах, вирощених у холодному приміщенні.

Death of plants in winter causes economic losses. Therefore the development of safe formulations for pre-sowing treatment of seeds of winter crops with the aim of increasing their frost hardiness is actual.

The research aim was to investigate the effect of pre-sowing treatment of winter wheat seeds with cryoprotective solutions PEO-400 and PEO-1500, complex agrochemical formulations Jupiter and Dorsay on biometrical parameters of their sprouting under different temperatures, frost-hardiness of the seedlings as well as on the content of soluble carbohydrates in the plants.

At laboratory conditions Kharkivska-105 winter wheat seeds were treated with the solutions of following compounds in the amount of 5% of seed mass: PEO-400 (0.5, 1 and 2%), PEO-1500 (0.5, 1 and 2%), Jupiter (0.5, 1, 2 and 3%) and Dorsay (0.5, 1, 2 and 3%). The laboratory germinating capacity was used under background temperature (20°C) and low positive temperature (5–10°C) the content of soluble carbohydrates in overground part of plants as well as the frost hardiness of the plants was investigated with the method of seedlings.

During germination of the treated seeds at 20°C no statistically significant differences from the control were revealed. Stimulating effect of pre-sowing treatment of seeds with cryoprotective solutions during its sprouting at 5–10°C was determined. On germinating energy the best occurred to be Dorsay (0.5 and 1%) and Jupiter (1%) preparations. On the germinating capacity on the 8<sup>th</sup> day the best was Dorsay (1%). On the indices of germinating capacity on the 18<sup>th</sup> day as well as on the mass of offshoot no statistically significant differences as compared with the control were found. On the average root mass 0.5% PEO-400 (50.1 mg), 0.5% PEO-1500 (48.2 mg) and 1% Dorsay (48.2 mg) versus 44.1 mg in the control were the best.

It was revealed that in the plants grown from the treated seeds more soluble carbohydrates were accumulated as compared with the control.

There was found an increase in frost-hardiness of wheat seedlings after treatment of seeds with the solution of Dorsay preparation (1%). The increase of relative survival of plants (56.6%) as compared with the control (41.8%) was observed. On the average root mass the best was that variant (23.2 mg), as well as 0.5% PEO-400 (20.2 mg) and 1% Jupiter (17.2 mg) as compared with the control (9.8 mg). On the average mass of offshoot the best was also 1% Dorsay (24.5 mg) at 20 mg in the control. In 2 and 3% concentrations the preparations occurred to be ineffective.

Pre-sowing treatment of winter wheat seeds with the solutions of PEO-400, PEO-1500, Dorsay and Jupiter contributes to an increase in the ability of seeds to spring at lowered temperature (5–10°C).

Stimulating effect of pre-sowing treatment of winter wheat seeds with the solutions of preparations Dorsay (1%), Jupiter (1%) and PEO-1500 (0.5%) on accumulation of soluble carbohydrates in plants, grown at a cool room, was revealed.

# Особенности изменения цитокино-иммунного статуса крыс разного возраста после введения криоконсервированных фетальных нервных клеток в остром периоде ишемического инсульта

Д.В. ЛЕБЕДИНЕЦ, И.В. РАССОХА, Е.А. ПОРОЖАН, О.Ю. КОЖИНА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Peculiarities of Cytokine-Immune Status Changing of Various Aged Rats after Introduction of Cryopreserved Fetal Nerve Cells at Acute Ischaemic Stroke

D.V. LEBEDINETS, I.V. RASSOKHA, E.A. POROZHAN, O.YU. KOZHINA  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Доказано, что микроглия как иммунокомпетентный компартмент ЦНС участвует во всех реакциях ткани мозга на ишемию. Важную роль в развитии данной патологии играют иммунные медиаторы межклеточных взаимодействий, в частности ИЛ-1 $\alpha$ . Его синтез, осуществляемый иммунокомпетентными (Т-клетки, макрофаги, микроглия) и “неиммунокомпетентными” (нейроны, астроциты) клетками ЦНС, является одним из важных звеньев реакции иммунной системы (ИС) на патологический процесс. Кора обоих полушарий головного мозга влияет на ИС, которая, в свою очередь, также изменяет активность и функцию нервных клеток, вызывая их повреждение и гибель. С возрастом изменяются метаболизм и гемодинамика мозга, что отражается и на ИС больных инсультом.

Цель работы – оценка цитокино-иммунного статуса крыс разного возраста в остром периоде ишемического инсульта и после введения криоконсервированных фетальных нервных клеток (ФНК).

Эксперименты проведены на 6- и 18-месячных крысах в соответствии с правилами “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985 г). Суспензию ФНК из мозга эмбрионов крыс 11 суток гестации криоконсервировали на программном замораживателе УОП-1 (СКТБ с ОП ИПКиК НАНУ). Ишемический инсульт (ИИ) моделировали окклюзией средней мозговой артерии (СМАо). Вводили ФНК внутривентрикулярно в дозе  $5 \times 10^6$  клеток на 100 г массы животного через 6 ч после развития ИИ. Субпопуляционный состав исследовали методом проточной цитофлуориметрии с использованием МАТ к CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , IL-10 (BD, США). Животных декапитировали на 1-, 3- и 7-е сутки после инициации ИИ и лечения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Установлено, что криоконсервированные ФНК обеспечивали коррекцию субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток (ИКК) у крыс с ИИ независимо от возраста, увеличивая процент CD3 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$  и снижая процент CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ -клеток. Результаты показали, что ФНК положительно воздействуют на цитокиновый профиль, в большей степени влияя на синтез противовоспалительного ИЛ-10 и подавление активации провоспалительного цитокина IFN- $\gamma$  у молодых особей.

Таким образом, сравнительный анализ состояния ИС у молодых и старых крыс продемонстрировал способность криоконсервированных ФНК воздействовать на состояние цитокино-иммунного статуса животных с патологией, изменяя в разной степени их цитокиновый профиль и содержание ИКК.

It has been established that microglia as immunocompetent compartment of CNS takes part in all the reactions of brain tissue at ischemia. The immune mediators of intracellular interactions have an important role in development of this pathology, particularly IL-1 $\alpha$ . Its synthesis, performed by immunocompetent cells of CNS (T-cells, macrophages, microglia) and non-immunocompetent ones is one of the important links of immune system (IS) responses to pathological process. Cortex of both cerebral hemispheres affects IS, which, in its turn changes activity and function of nerve cells, manifesting their damage and death. Metabolism and hemodynamics of brain change with age, affecting IS of stroke patients.

The research aim is estimation of cytokine-immune status of variously aged rats at acute ischaemic stroke and after introduction of cryopreserved fetal nerve cells (FNCs).

The experiments were carried out in 6 and 18 months' rats according to the statements of “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985). Suspension of FNCs from rat embryo brain of 11 days' gestation was cryopreserved with programmable freezer UOP-1 (SDTB with EU of IPC&C). Ischaemic stroke (IS) was simulated with occlusion of medial cerebral artery (MCAo). FNCs were introduced intraperitoneally at  $5 \times 10^6$  cells per 100 g of animal mass 6 hours later IS development. Subpopulation composition was studied by flow cytometry with application of monoclonal antibodies to CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , IL-10 (BD, USA). Animals were decapitated to the 1 $^{st}$ , 3 $^{rd}$  and 7 $^{th}$  days after initiation and treatment of IS. Statistical processing of results was carried out by the Mann-Whitney's method.

It has been established that cryopreserved FNCs provide correction of subpopulation composition of immunocompetent cells (ICCs) in rats with IS not depending on age, increasing the percentage of CD3 $^{+}$ , CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$  cells and decreasing for CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  cells. The results have shown that FNCs positively affect the cytokine profile, with bigger influence synthesis of anti-inflammatory IL-10 and reduction of anti-inflammatory IFN- $\gamma$  cytokine activation in young animals.

Thus, comparative analysis of IS state in young and aged rats demonstrated the viability of cryopreserved FNCs to affect the state of animal cytokine-immune status with pathology, changing their cytokine profile and ICC content in various degrees.

# Влияние радиального разброса скоростей охлаждения в замораживаемом образце на колониобразующую способность *Saccharomyces cerevisiae*

А.Ю. Сиренко, В.В. Марушенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Radial Dispersion of Cooling Rates in Frozen Sample on Colony-Forming Ability of *Saccharomyces cerevisiae*

A.YU. SIRENKO, V.V. MARUSCHENKO

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

При замораживании клеточной суспензии в контейнере, который имеет конечный размер, поле скоростей охлаждения является неоднородным. Цель данной работы – определение влияния радиального разброса скоростей охлаждения в суспензии микроорганизмов *S. cerevisiae* в физиологическом растворе при их замораживании в контейнерах цилиндрической формы разного диаметра (табл. 1) со скоростями 1, 5 и 10°C/мин (по датчику на внешней поверхности контейнера) на колониобразующую способность *S. cerevisiae* (табл. 2).

Исследования показали, что клетки, расположенные в разных точках образца, на этапе кристаллизации суспензии охлаждаются с существенно различающимися режимными параметрами; неоднородность температурного поля и разброс скоростей охлаждения в образце растут с увеличением размера образца и скорости охлаждения контактирующего с ним хладоагента; сохранность криоконсервируемой суспензии микроорганизмов в физиологическом растворе немонотонно зависит от размера контейнера, в котором она замораживается.

When freezing the cell suspension in container with a final size, the field of cooling rates is inhomogeneous. The research aim was to determine the effect of radial dispersion of cooling rates in suspension of *S. cerevisiae* microorganisms in physiological solution at their freezing in cylinders of different diameter (Table 1) with 1, 5 and 10°C/min (by sensor on container exterior surface) on colony-forming ability of *S. cerevisiae* (Table 2).

As the result of carried out researches one may conclude that the cells, located at different points of a sample, are cooled with significantly differing regimen parameters at crystallization stage; inhomogeneity of temperature field and dispersion of cooling rates in sample increase with a rise of sample's size and cooling rate being in contact the coolant; survival of cryopreserved suspension of microorganisms in physiological solution inhomogeneously depends on size of container, wherein it is frozen.

**Таблица 1.** Зависимость регистрируемой скорости охлаждения от положения термодатчика в образце и скорости охлаждения криокамеры

**Table 1.** Dependence of recorded cooling rate on location of thermocouple in sample and cooling rate of cryochamber

Скорость охлаждения криокамеры, °С/мин Cooling rate of cryochamber, °C/min	Диаметр контейнера, мм iameter of container, mm	Отношение расстояния термодатчика от оси контейнера к радиусу контейнера Ratio of thermocouple distance from container's axis to its radius		
		1	0,5	0
		1	30	1,25±0,25
5	20	1,25±0,25	3,3±0,9	4,1±0,8
	10	1,3±0,3	—	2,7±0,6
	30	5,3±0,3	24,4±3,1	35,3±3,2
10	20	5,4±0,4	20,9±2,2	30,1±6,2
	10	5,6±0,6	—	24,0±6,0
	30	11,0±1,1	30,1±1,8	45,4±5,8
10	20	10,5±0,5	25,1±5,6	36,0±6,2
	10	10,5±0,5	—	25,5±5,2

**Таблица 2.** Экспериментально определенные значения колониобразующей способности *S. cerevisiae* после замораживания-оттаивания

**Table 2.** Experimentally determined values of colony-forming ability of *S. cerevisiae* after freeze-thawing

Скорость охлаждения, °С/мин Cooling rate, °C/min	Диаметр цилиндрического контейнера, мм iameter of cylinder container, mm		
	30	20	10
1	46,6±10,2	40,0±6,7	39,0±9,3
5	76,7±14,9	50,0±12,5	60±8,5
10	65,0±18,3	40,0±7,1	37,1±10,2

## Морфофункциональная характеристика миокарда крыс при охлаждении на фоне применения природных антиоксидантов

В.А. ПОМОЗОВА, Д.Б. ПЕКОВ, И.В. БИБИК

*Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, Россия*

*ГУП Амурской области «Амур-качество», г. Благовещенск, Россия*

*МУЗ Детская городская клиническая больница, г. Благовещенск, Россия*

## Morphofunctional Characteristics of Rat's Myocardium During Cooling on Background of Application of Natural Antioxidants

V.A. POMOZOVA, D.B. PEKOV, I.V. BIBIK

*Kemerovo Technological Institute of Food Industry, Russia*

*Amur Region State Unitary Enterprise "Amur-Quality", Blagoveschensk, Russia*

*Far East State Agrarian University, Blagoveschensk, Russia*

Перспективным направлением в регуляции метаболических процессов в условиях высоких широт является научно обоснованное, патогенически направленное, антихолодовое профилактическое питание с использованием антиоксидантов растительного происхождения, которое можно рассматривать как один из важнейших факторов, способствующих повышению неспецифической резистентности организма, что в условиях функциональных отклонений является определяющим.

Среди перспективных компонентов для получения пищевой продукции повышенной биологической ценности важная роль может быть отведена квасу на основе сока дикоросов и дигидрокверцетина.

При исследовании миокарда крыс, подвергавшихся общему охлаждению на фоне введения кваса на основе природных антиоксидантов, отмечена тенденция к нормализации морфологической картины, затрагивающая тканевую и внутриклеточный уровни организации. Несмотря на то, что сохраняется эозинофилия мышечных сегментов, более выраженная в субэндокардиальных отделах миокарда левого и правого желудочков, количество кардиомиоцитов, цитоплазма которых усиленно воспринимала эозин, уменьшается. Ярко окрашенные миоциты иногда располагались поодиночке, но чаще образовывали группы, состоящие из 2–3 клеток. В некоторых участках (преимущественно в средней зоне миокарда) оксифильные сегменты полностью отсутствовали. Положительным изменениям со стороны паренхимы органа соответствуют определенные перестройки стромальных компонентов миокарда, которые заключались в нормализации кровенаполнения микроциркуляторного русла, уменьшении отека интерстициальной соединительной ткани. Интрамуральные артерии и артериолы по-прежнему находятся в состоянии спазма.

У животных, получавших перед охлаждением квас, увеличивается число капилляров, наименьший диаметр которых составляет 2,4 мкм и выше. Появление большего числа кардиомиоцитов, имеющих нормальную структуру, скорее всего, связано со способностью антиоксидантов стабилизировать структуру и функциональную активность биомембран, а также интегрированных в мембранах белков. За счет антиоксидантной активности и мембраностабилизирующего эффекта, вероятно, уменьшается количество кардиомиоцитов, находящихся в различной степени пересокращения.

Perspective trend in regulation of metabolic processes under conditions of high latitudes is scientifically substantiated, pathogenetically directed, anti-cold preventive nutrition, based on the use of anti-oxidants of plant origin. It may be considered as one of the most important factors, contributing to the rise of unspecific resistance of an organism at functional deviations.

The main components of food products, in particular the whole sour, with an increased biological value are the sap of wild-growing herbs and dihydroquercetin.

When studying the myocardium of rats subjected to general cooling on the background of use of the whole sour based on natural antioxidants there was found a tendency to normalization of morphological picture, concerning the tissue and intracellular levels. In spite of the fact that eosinophilia of muscular segments is kept, the most manifested in sub-endocardial parts of myocardium of left and right ventricles, the number of cardiomyocytes, cytoplasm of those actively accepted eosin, reduces. Brightly stained myocytes sometimes were located singly, but often they formed the groups of 2–3 cells. In some sites (predominantly in a middle zone of myocardium) oxyphil segments were completely absent. Certain re-arrangements of stromal components of myocardium correspond to positive changes from the side of organ parenchyma myocardium, consisted in normalization of blood filling of microvasculature, lessening of the edema of interstitial connective tissue. Intramural artery and arterioles are still in a spasm state.

In the animals received the whole sour prior to treatment the number of capillaries increases, the least diameter of those makes 2.4  $\mu\text{m}$  and more. The appearance of bigger number of cardiomyocytes with normal structure, is likely related to the ability of antioxidants to stabilize the structure and functional activity of biological membranes, as well as the proteins, integrated in membranes. Due to anti-oxidative activity and membrane-stabilizing effect the number of cardiomyocytes, being in a different extent of over-contractions.



## Исследование органов дыхания при холодом воздействии на фоне введения растительных антиоксидантов

В.А. ПОМОЗОВА, Н.В. БАБИЙ, Т.В. БАБИЙ

*Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, Россия*

*ГУП Амурской области «Амур-качество», г. Благовещенск, Россия*

*МУЗ Детская городская клиническая больница, г. Благовещенск, Россия*

## Study of Respiratory Organs During Cold Effect on Background of Introduction of Plant Antioxidants

V.A. POMOZOVA, N.V. BABIY, T.V. BABIY

*Kemerovo Technological Institute of Food Industry, Russia*

*Amur Region State Unitary Enterprise "Amur-Quality", Blagoveschensk, Russia*

*Children's City Clinical Hospital, Blagoveschensk, Russia*

В связи с особенностями патологии бронхолегочного аппарата в условиях северных регионов целесообразно использование препаратов, обладающих антиоксидантным действием, или веществ, которые усиливают их эффект. Анализ литературных данных позволяет предположить, что интенсивность реакций перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантных систем организма являются наиболее важными в формировании воспалительных процессов в легких. Особый интерес представляет использование кваса на основе дигидрохверцетина, препятствующего накоплению продуктов перекисного окисления липидов в легких при действии низких температур.

Применение кваса на фоне охлаждения приводит к снижению интенсивности воспалительной реакции в легочной ткани. При этом нормализуется клеточный состав слизистой оболочки воздухоносного отдела легких. Сохраняется эластический каркас стенки альвеол, вследствие чего большинство из них сохраняют обычный диаметр. Строение тучных клеток в трахее и бронхах одинаково, что установлено при анализе морфометрических показателей. Они локализуются в подслизистой оболочке и в перибронхиальной соединительной ткани. Только единичные лаброциты мигрируют через эпителий.

Действие кваса на фоне охлаждения приводит к умеренному увеличению числа коллагеновых и эластических волокон в соединительной ткани бронхиального дерева и респираторного отдела, где они имеют очаговую локализацию. В слизистой оболочке, перибронхиальной соединительной ткани и межальвеолярных перегородках выявляются обширные скопления лимфоцитов и эозинофилов. Число альвеолярных макрофагов снижается. Сравнительным анализом эффективности препаратов антиоксидантного действия на соединительную ткань органов дыхания в условиях охлаждения подтверждена эффективность комплексного применения кваса. Положительным моментом его действия является замедление интенсивности реакции перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует уменьшение количества диеновых конъюгатов и гидроперекисей в ткани легкого и жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Вероятно, это способствует снижению уровня деструктивных процессов в паренхиме органов дыхательной системы.

Due to peculiarities of bronchopulmonary apparatus pathology under Northern region conditions the application of preparations with antioxidant action or substances, strengthening their effect is reasonable. The analysis of literature data enables to suppose the fact that the reaction intensity of lipid peroxidation and state of antioxidant systems of organism are the most important in formation of inflammation processes in lungs. The use of the whole sour based on dihydroquercetin, preventing accumulation of products of lipid peroxidation in lungs under effect of low temperatures is of special interest.

Use of the whole sour under cooling results in reduction of inflammatory reaction intensity in pulmonary tissue. Herewith the cell composition of mucous membrane of air part of lungs is normalized. Elastic skeleton of alveolar wall is preserved, herewith the major part of them preserve standard diameter. The structure of mast cells in trachea and bronchi is usually equal that has been established during analysis of morphometric indices. They are located in submucous membrane and peribronchial conjunctive tissue. Only single lamprocytes migrate over epithelium.

Action of the whole sour under cooling results in moderate increasing of collagenic and elastic fiber number in conjunctive tissue of bronchial apparatus and respiratory part, where they have focal localization. In mucous membrane, peribronchial conjunctive tissue and interalveolar septa the extensive accumulations of lymphocytes and eosinophils are manifested. Number of alveolar macrophages is decreased. Comparative analysis of efficiency of antioxidant action preparations' efficiency on conjunctive tissue of respiratory organs under cooling the efficiency of combined application of the whole sour is confirmed. The positive moment of its action is inhibition of reaction intensity of lipid peroxidation, that testifies to reduction of diene conjugate and hydroperoxide number in pulmonary tissue and liquid of bronchoalveolar lavage. Probably, it contributes to decreasing the rate destructive processes in parenchyma of respiratory system organs.