

Опыт использования криоконсервированной ткани плаценты человека для профилактики осложнений беременности

О.В. Грищенко, И.В. Лахно, Л.В. Дудко, О.Б. Демченко, В.Л. Дудко
Харьковская медицинская академия последипломного образования

Experience in Using Human Placenta Cryopreserved Tissue for Preventing Pregnancy Complications

O.V. GRISCHENKO, I.V. LAKHNO, L.V. DUDKO, O.B. DEMCHENKO, V.L. DUDKO
Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Ukraine

В основе патологического течения процесса гестации, проявляющегося невынашиванием, синдромом задержки внутриутробного развития и преэклампсией, лежит недостаточная инвазия вневорсинчатого трофобласта в спиральные сосуды матки с формированием первичной формы дисфункции плаценты. Возникающие на этом фоне оксидативный стресс и эндотелиальная дисфункция, которым способствует наличие антифосфолипидных антител, приводят к системным нарушениям гомеостаза в виде тромбофилии, дислипидемии и атерозу маточно-плацентарных сосудов. Для профилактики гестационных осложнений была использована суспензия криоконсервированной ткани плаценты человека (КТПЧ), содержащая значительное количество иммунорегуляторных полипептидов, факторов роста и гормонов в водной фазе экстракта.

Цель работы – выделение приоритетных эффектов КТПЧ у беременных группы высокого риска по развитию преэклампсии.

За последние годы суспензия КТПЧ была введена ректально 156 беременным с первичной формой дисфункции плаценты. Сравнение проведено с 160 пациентками с дисфункцией плаценты, получавшими традиционную фармакотерапию. Контролем служили 150 практически здоровых беременных с физиологическим течением процесса гестации. На основе декомпозиции проблемы выбраны следующие критерии лабораторной оценки: иммунологические с изучением маркеров антифосфолипидного синдрома, гемостазиограмма, состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, а также функция гормонопродуцирующей систем фетоплацентарной системы. Проведена статистическая обработка результатов.

Полученные данные позволяют считать, что применение КТПЧ способствует лучшей реализации феномена «дисморфоза» спиральных сосудов благодаря донации факторов роста, а также ликвидации аутоиммунной агрессии антифосфолипидными антителами. Это обеспечивает эндотелиопротекторный и дезагрегантный эффект, предотвращает оксидативный стресс и гипоксическую атаку. По-видимому, нормальное функционирование системы «мать-плацента-плод», подтвержденное эндокринными показателями и связанное с информационной избыточностью в подсистеме «плацента-плод» на фоне применения КТПЧ, обеспечивало почти трехкратное снижение частоты возникновения преэклампсии и перинатальной патологии плода.

Назначение КТПЧ способствует нормальному функционированию фетоплацентарной системы и предотвращает реализацию системного воспалительного ответа у беременных из группы риска по развитию преэклампсии.

Pathological gestation process, manifesting in pregnancy failure, intrauterine growth retardation syndrome and preeclampsia, is based on an insufficient invasion of extravillous trophoblast into uterine spiral vessels with forming primary placenta dysfunction. The appeared on this background oxidative stress and endothelial dysfunction, contributed by the presence of antiphospholipid antibodies, result in the systemic homeostasis disorders in the form of thrombophilia, dislipidemy and uterine-placental vessel atherosclerosis. In order to prevent gestational complications we have used the suspension of human placenta cryopreserved tissue (HPCT), containing great number of immune regulative polypeptides, growth factors and hormones in aqueous extract phase.

The research was aimed to isolate the priority effects of HPCT in pregnant women of a high risk group by eclampsia development.

Recently the HPCT was rectally introduced to 156 pregnant women with primary form of placenta dysfunction. The comparison was done with 160 patients with placenta dysfunction, received traditional medicamentous therapy. The control served 150 practically health pregnant women with physiological gestation process. Basing on the problem decomposition we have selected the following criteria for laboratory assessment: immunological ones with studying the markers of antiphospholipid syndrome, hemostasiogram, state of LPO system and antioxidant protection, as well as the function of hormone-producing systems of fetoplacental system. The results were statistically processed.

The data obtained enable considering the HPCT application as contributing to better realisation of spiral vessel “dysmorphosis” phenomenon due to the growth factor donation, as well as the autoimmune aggression liquidation by antiphospholipid antibodies. This provides the endothelial-protective and desaggregative effects, prevents an oxidative stress and hypoxic attack.

Apparently, the normal functioning of “mother-placenta-fetus” system, confirmed by endocrine indices and associated to information surplus in “placenta-fetus” subsystem at the background of HPCT system provided an almost three-fold decrease in the frequency of preeclampsia appearance and fetus perinatal pathology.

The HPCT administration contributes to a normal functioning of fetoplacental system and prevents the realisation of systemic inflammatory response in pregnant women of preeclampsia development risk group.

Влияние биопрепаратов эмбриофетоплацентарного комплекса на функциональную активность щитовидной железы кроликов с экспериментальным гипотиреозом

Н.Г. Малова¹, Т.С. Божко¹, И.В. Комарова¹, Т.Н. Юрченко², Л.Ю. Сергиенко¹,
Н.М. Бречка¹, Л.А. Сиротенко¹, В.И. Чуйкова²

¹Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины, г. Харьков

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

Effect of Biopreparations of Embryofetoplacental Complex on Functional Activity of Rabbit's Thyroid Gland with Experimental Hypothyroidism

N.G. MALOVA¹, T.S. BOZHKO¹, I.V. KOMAROVA¹, T.N. YURCHENKO², L.YU. SERGIENKO¹,
N.M. BRECHKA¹, L.A. SIROTENKO¹, V.I. CHUIKOVA²

¹V.Ya. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

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

Известно, что основным методом лечения гипотиреоза является заместительная терапия. Однако указанный подход не решает основной задачи – восстановление и поддержание гормонального гомеостаза. Поэтому в настоящее время все большее внимание привлекает новое направление коррекции патологических состояний – клеточная терапия, результатом которой являются замещение и, главное, восстановление функции пораженных органов.

Цель работы – экспериментальное изучение возможностей использования биопрепаратов эмбриофетоплацентарного комплекса для восстановления функции щитовидной железы (ЩЖ).

Работу проводили на кроликах с модельным (мерказолиловым) гипотиреозом. Животным вводили криоконсервированные биопрепараты фетального тимуса (ФТ) и суспензии фетальных тканей (СФТ). Тиреоидный статус оценивали по показателям содержания ТТГ, свободных и общих T_3 и T_4 в сыворотке крови в течение четырех месяцев и по результатам гистоморфологических исследований срезов щитовидной железы.

Биопрепараты ФТ и СФТ оказывают выраженное стимулирующее действие на тиреоидную паренхиму кроликов с экспериментальным гипотиреозом. Наиболее существенные изменения наблюдались со стороны показателя общего T_4 , который является основным маркером состояния гормонообразования в ЩЖ. Колебания содержания ТТГ в сыворотке крови подопытных животных, по нашему мнению, имели вторичный характер и зависели от уровня тиреоидных гормонов в циркулирующей крови. По данным гистоморфологических исследований установлено, что стимуляция гормоногенеза в ЩЖ реализуется путем непосредственного действия биопрепаратов на тиреоидную паренхиму и не затрагивает центральные механизмы регуляции тиреоидной функции.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что применение клеточных препаратов может быть перспективной альтернативой заместительной терапии при некоторых формах гипотиреоза. По результатам гормональных и гистоморфологических исследований установлено, что восстанавливающий эффект реализуется непосредственно на уровне тиреоидной паренхимы.

The substitutive therapy is known to be the main method in hypothyroidism treatment. However, the unique approach does not solve the major task: recovery and maintenance of hormonal homeostasis. Therefore more attention is now paid to a new direction in correcting pathological states: cell therapy, resulting in a substitution and mostly recovery of the damaged organ functions.

The research was aimed to experimentally study the possibilities in using biopreparations of embryofetoplacental complex to recover thyroid gland (TG) function.

The research was carried-out in rabbits with modelled (mercazolil) hypothyroidism. Animals received the cryopreserved biopreparations of fetal thymus (FT) and fetal tissue suspension (FTS). Thyroid status was estimated by the indices of TTH content, free and total T_3 and T_4 in blood serum within 4 months and by the results of histomorphological studies of thyroid gland sections.

FT and FTS biopreparations cause a manifested stimulating effect on thyroid parenchyma of rabbits with experimental hypothyroidism. The most significant changes were observed in total T_4 indices, being the main marker of hormone-formation state in TG. We believe that the changes in TTH content in blood serum of experimental animals were of secondary character and depended on thyroid hormone level in circulating blood. By the data of histomorphological studies, the stimulation of hormonogenesis in TG was established as realising via direct biopreparation effect on thyroid parenchyma and had no effect on central regulative mechanisms of thyroid function.

The obtained experimental data testify to the application of cellular preparations as a perspective alternative of substitutive therapy in some forms of hypothyroidism. According to the results of hormonal and histomorphological studies, a recovering effect was established as realising directly at the level of thyroid parenchyma.

Влияние различных криоконсервирующих сред на выживаемость мужских репродуктивных клеток

Ю.С. ПАРАШУК

Харьковский национальный медицинский университет

Effect of Different Cryopreservation Media On Survival of Male Reproductive Cells

YU.S. PARASCHUK

Kharkov National Medical University, Ukraine

Успешное решение проблемы искусственной инсеминации спермой донора неразрывно связано с криоконсервированием спермиев человека. Однако исследования показали, что у части спермиев после низкотемпературного консервирования происходят такие нарушения: повреждение цитоплазматической мембраны, которое сопровождается утечкой ферментов, принимающих участие в процессе оплодотворения, снижение энергетических обменных процессов, вследствие чего уменьшается подвижная фракция спермиев и пр. В связи с этим остается актуальной проблема исследования механизмов криоповреждения и криозащиты мужских репродуктивных клеток, подбор криозащитных сред и протоколов замораживания.

Цель работы – определение зависимости между структурой, физико-химическими свойствами криопротекторов и их криозащитным действием на спермии человека.

В результате исследования установлено, что изменение гидрофильно-гидрофобного баланса в сторону увеличения в криобиологической системе гидрофильности при использовании оксиэтильного ацетамида, оксиэтилированного глицерина с низкой степенью полимеризации способствовало выживаемости спермиев. Кроме того, в состав криозащитной среды был введен холин-хлорид, который, являясь одной из фракций лецитина и метилирующим агентом, усиливает протонно-акцепторную способность гидроксильных групп глицерина и тем самым повышает криозащитный эффект.

Таким образом, на основе проведенных исследований был разработан способ криоконсервирования спермиев человека с многокомпонентной средой, в состав которой входили: 5% глицерина, 2% холин-хлорида, 4% глюкозы, 1,2% лимонно-кислого натрия, 26% яичного желтка, остальная часть – дистиллированная вода.

Successful solving of the task of artificial insemination with donor's sperm is tightly related to the cryopreservation of human spermatozoa. However the studies have shown that in some spermatozoa after low-temperature preservation the impairments as follows take place: damage of cytoplasm membrane, accompanying with leaking of enzymes, participating in fertilization process; reduction of energetic metabolic processes due to those the motile fraction of sperm is decreased etc. Herewith the tasks of studying the mechanisms of cryodamage and cryoprotection of male reproductive cells, selection of cryoprotective media and freezing protocols have remained actual ones.

The research aim was to determine the dependence between the structure, physical and chemical properties of cryoprotectants and their cryoprotective effect on human sperm.

As a result of the investigation it has been shown that the change of hydrophilic-hydrophobic balance towards the increase in cryobiological system of hydrophilicity when using oxyethylated acetamide, oxyethylated glycerol with low polymerization degree contributed the sperm survival. Besides, into composition of cryoprotective medium choline-chloride was added, which is one of the fractions of lecithin and methylating agent strengthens the proton-acceptor ability of hydroxyl glycerol groups and thereby increases the cryoprotective effect.

Thus with basing of the performed studies there was elaborated the cryopreservation method for human sperm with using multi-component medium, comprised 5% glycerol, 2% choline chloride, 4% glucose, 1.2% citric acid sodium, 26% egg yolk and the rest is distilled water.

Особливості імунної відповіді при системному та внутрішньомозковому введенні ембріональних алогенних клітин селезінки

А.І. Ключникова, М.І. Лісяний, В.М. Семенова

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м. Київ

Immune Response Peculiarities Under Systemic and Intracerebral Introduction of Spleen Embryonic Allogenic Cells

A.I. KLYUCHNIKOVA, M.I. LISYANYI, V.M. SEMENOVA

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

На сьогоднішній день актуальні питання про диференціювання нейроклітин та їх трансплантацію в мозок, оскільки нейротрансплантація вважається перспективною для лікування головного та спинного мозку.

При нейротрансплантації має місце специфічна ситуація, яка обумовлена тим, що головний мозок вважався імунологічно не активним органом, а ембріональні стовбурові клітини не мають АГ гістосумісності і на них не може розвиватися імунна відповідь. Практика показує, ефект нейротрансплантації досягається не завжди, що потребує подальшого всебічного вивчення цієї проблеми, в тому числі і ролі імунних реакцій в приживленні та відторгненні нейротрансплантатів.

Мета роботи – дослідження розвитку клітинно-гуморальної імунної відповіді при внутрішньомозковому та внутрішньом'язовому введенні ембріональних клітин селезінки 14 доби гестації.

При введенні алогенної суспензії ембріональних клітин селезінки цитотоксична активність лімфовузлів в цитотоксичних тестах при внутрішньом'язовому введенні була достовірно вищою, ніж при введенні клітин в мозок. При дослідженні показників цитотоксичної активності мононуклеарів селезінки та лімфовузлів по відношенню до прилипаючих клітин селезінки донора наростала з 6 до 12 доби як при внутрішньомозковому, так і при внутрішньом'язовому введенні. При морфологічних дослідженнях тканин мозку реципієнтів на 12 добу після введення суспензії клітин ембріональної селезінки мишей реактивних змін з боку навколишньої мозкової тканини не виявлено. Визначаються морфологічні ознаки набряку.

Отримані дані вказують на те, що імунна відповідь на алогенні ембріональні клітини починала розвиватись з 6 доби після введення алоантигену і тривала до 18 доби, а пік цитотоксичної активності лімфоцитів зафіксовано на 12 добу після введення.

Таким чином, отримані дані свідчать, що як при внутрішньомозковому, так і при внутрішньом'язовому введенні алогенних ембріональних клітин мишей 14 доби гестації розвивається імунна відповідь на алоантигени цих клітин, що дозволяє стверджувати, по-перше, на клітинах селезінки 14-добових ембріонів експресуються алоантигени, які здатні запускати імунні реакції, по друге, система імунна відповідь розвивається і при введенні клітин ембріональної селезінки в мозок, тобто немає імунної ізоляції ЦНС, що потрібно враховувати при клітинній нейротрансплантації.

Nowadays there has been still actual the question about the neural cells' differentiation and their transplantation into brain, because of considering neurotransplantation to be perspective in treating brain and spinal cord diseases.

Under neurotransplantation the specific situation occurred, stipulated by considering brain as immunologically inactive organ and the absence of histocompatible antigens in embryonic stem cells and impossibility of immune response development to them. As the experience shows, the effect of neurotransplantation is not always achievable, that requires further versatile study of this problem, including the role of immune responses in neurotransplant's engraftment and rejection.

The research was aimed to study the cell and humoral immune responses under intracerebral and intramuscular introductions of spleen embryonic cells of 14th gestation day.

When introducing the allogenic suspension of spleen embryonic cells, a cytotoxic activity in lymph nodes in cytotoxic tests at an intramuscular introduction was statistically and significantly higher, than under cell introduction into brain. When studying the indices of cytotoxic activity of spleen mononuclears and lymph nodes in respect to adherent cells of donor's spleen, it was growing from the 6th to 12th days both under intracerebral and intramuscular administrations. Under morphological studies of recipients' brain tissues to the 12th day after introducing cell suspension of murine embryonic spleen, no reactive changes from the surrounding brain tissue were revealed. There were determined the morphological signs of oedema.

The data obtained indicate to the beginning of immune response development to allogenic embryonic cells from the 6th day after alloantigen introduction and its duration up to the 18th day, with registering the lymphocyte cytotoxic activity peak to the 12th day after introduction.

Thus, the data obtained testify to the fact, that both under intracerebral and intramuscular introductions of allogenic embryonic murine cells of 14th gestation day the immune response to alloantigens of these cells is in a progress, that enables statement firstly about the expression of alloantigens, capable to trigger immune responses, on spleen cells of 14th day embryos, secondly the system immune response is in a progress under embryonic spleen cell introduction into brain as well, i.e. there is no CNS immune isolation, that should be taken into account under cell neurotransplantation.

Изучение антигенных свойств криоконсервированных ЭНК человека в СКК с аллогенными лимфоцитами доноров

Н.И. ЛИСЯНЫЙ, И.А. ГНЕДКОВА

Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Study of Antigen Properties of Cryopreserved Human ENC's in MCC with Allogenic Donor Lymphocytes

N.I. LISYANYI, I.A. GNEDKOVA

A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Актуальным является выявление антигенных структур на эмбриональных нервных клетках (ЭНК), которые используют для трансплантации при травматических и дегенеративных заболеваниях головного мозга. Известно, что нейральные стволовые клетки (НСК) в норме не экспрессируют антигены системы HLA, однако уже при культивировании с ростовыми факторами на мембранах НСК экспрессируются антигены системы HLA. Явление бластообразования лимфоцитов в смешанной культуре клеток (СКК) позволяет оценить экспрессию антигенов HLA на тестируемых ЭНК. В качестве отвечающих клеток были использованы лимфоциты периферической крови доноров. Пролиферативный ответ в СКК аллогенных лимфоцитов колебался в значительном диапазоне от 40 до 75%. При внесении ЭНК в качестве антигенпрезентирующих пролиферативный ответ лимфоцитов был достоверно ниже, чем в СКК лимфоцитов, и составлял $25,0 \pm 7,1\%$, что отражает наличие антигенов HLA на мембранах ЭНК при контакте с периферическими лимфоцитами. Иммунорегуляторное действие ЭНК на периферические лимфоциты изучали в СКК с ФГА-стимулированными лимфоцитами доноров в соотношении 1:1. Была отмечена тенденция усиления пролиферативного ответа на митоген, особенно если в контрольных пробах ответ лимфоцитов на ФГА был невысоким. Так, при значении пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных ФГА 30% при добавлении ЭНК в соотношении 1:1, последний увеличивался до 71%. В однонаправленной культуре лимфоцитов после обработки ЭНК митомицином С и стимуляции отвечающих лимфоцитов ФГА был отмечен незначительный ко-стимулирующий эффект. Гликоконъюгаты мембран ЭНК во многом определяют их иммунорегуляторные свойства. В связи с этим были изучены иммунорегуляторные свойства ЭНК, разделенных на лектинах сои (SBA) или лектине арахиса (PNA), сорбированных на пластике. Добавление к стимулированным периферическим лимфоцитам ЭНК, не прилипших к пластику, незначительно влияло на пролиферативный ответ стимулированных ФГА лимфоцитов ($70,4 \pm 3,1\%$) по сравнению с контролем без сорбции на пластике ($75,5 \pm 5,1\%$). Суспензия ЭНК, не прилипшая к лектину SBA, достоверно снижала пролиферативный ответ лимфоцитов доноров до $21,0 \pm 8,1\%$ по сравнению с контролем $75,5 \pm 5,1\%$. При добавлении ЭНК не прилипших к лектину арахиса (PNA) был также отмечен менее выраженный супрессорный эффект.

The revealing of antigen structures on embryonic neural cells (ENCs), used for transplantation in traumatic and degenerative brain diseases, is actual. Neural stem cells (NSCs) are known as normally not expressing antigens of HLA system, but even during culturing with growth factors the antigens of HLA system are expressed on NSCs membranes. Phenomenon of lymphocyte blast-formation in a mixed cell culture (MCC) enables to estimate the expression of HLA antigens on the tested ENC's. Lymphocytes of donor peripheral blood were used as responding cells. Proliferative response in MCC of allogenic lymphocytes changed within a significant range from 40 to 75%. When introducing ENC's as antigen-presenting, a proliferative response of lymphocytes was statistically and significantly lower, than in lymphocyte MCC and was $25.0 \pm 7.1\%$, that reflected the presence of HLA antigen presence on ENC's membranes when contacting with peripheral lymphocytes. The ENC's immune regulatory effect on peripheral lymphocytes were studied in MCC with PGA-stimulated donor's lymphocytes in 1:1 ratio. The tendency of strengthening of proliferative response to mitogen, especially if the lymphocyte response to PGA was not high in the control samples. So, at 30% value of proliferative response of PGA-stimulated lymphocytes, when adding ENC's in 1:1 ratio the latter increased up to 71%. In one-way lymphocyte culture after ENC's treatment with mitomycin C and PGA stimulation of responding lymphocytes, a slight co-stimulating effect was noted. The ENC's membrane glycoconjugates mostly determine their immune regulatory properties. Due to this fact we have studied the immune regulatory properties of ENC's, divided either on soybean lectins (SBA) or peanut one (PNA), sorbed on plastic. The adding into stimulated peripheral lymphocytes of ENC's, not-adhered to plastic, slightly affected a proliferative response of stimulated PGA of lymphocytes ($70.4 \pm 3.1\%$), compared to the control with no sorption on plastic ($75.5 \pm 5.1\%$). ENC's suspension, not-adhered to SBA lectin, statistically and significantly reduced a proliferative response of donor's lymphocytes down to $21.0 \pm 8.1\%$ compared to the control ($75.5 \pm 5.1\%$). When adding ENC's, not-adhered to PNA lectin there was also observed a less manifested suppressive effect.

Basing on the results obtained, we may assume that the HLA antigens are expressed on ENC's. Lectin treatment of ENC's results in a change in their antigenicity, as well as enables to isolate ENC's with immune-suppressive properties.

Исследование иммунорегуляторных свойств криоконсервированных нейроклеек эмбриона человека

О.В. МАРКОВА¹, А.Ю. ПЕТРЕНКО², Т.Г. ОЛЕЙНИКОВА¹

¹Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

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

Study of Immune Regulatory Properties of Human Embryonic Cryopreserved Nerve Cells

O.V. MARKOVA¹, A.YU. PETRENKO², T.G. OLEJNIKOVA¹

¹A.P. Romodanov Institute of Neurosurgery, Kyiv, Ukraine

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

Клинические испытания методов клеточной терапии свидетельствуют о многостороннем действии этого нового вида лечения на организм больных. Предполагают, что механизмы таких влияний могут быть обусловлены продукцией эмбриональными клетками водорастворимых соединений.

Цель работы – исследование некоторых показателей функционального состояния лимфоцитов при культивировании с нейроклеек эмбриона человека.

Криоконсервированные нейроклеек эмбриона человека (2×10^6) после размораживания смешивали с 0,3%-м агаром и помещали в пластиковые чашки Петри. После застывания агарового слоя в чашки Петри вносили суспензию лимфоцитов донора в 2 мл полной среды ДМЕМ (2×10^6 лимфоцитов в 1 мл среды) и инкубировали 18 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Затем определяли удельный вес жизнеспособных лимфоцитов (окраска 0,2%-м раствором трипанового синего), количество Hoechst-положительных лимфоцитов, содержание CD25-положительных лимфоцитов (метод проточной цитофлюориметрии), активность лимфоцитов в тесте спонтанной и антителозависимой цитотоксичности с ксеногенными эритроцитами. Контролем служили лимфоциты того же донора, которые инкубировали на слое 0,3%-го агара, не содержащего нейроклеек эмбриона человека.

Установлено, что культивирование лимфоцитов на слое агара, содержащем нейроклеек эмбриона человека, сопровождается увеличением удельного веса жизнеспособных лимфоцитов, снижением в 2 раза количества Hoechst-положительных лимфоцитов, уменьшением удельного веса CD25-положительных лимфоцитов.

Нейроклеек эмбриона человека в условиях культивирования улучшают показатели жизнеспособности лимфоцитов доноров, нормализуют количество CD25-положительных лимфоцитов. По-видимому, имеет место продукция эмбриональными клетками водорастворимых соединений, оптимизирующих функциональное состояние лимфоцитов.

Clinical trials of cell therapy methods testify to a versatile effect of this new treatment on patients' organism. The mechanisms of such effects are assumed as possibly stipulated by producing water soluble factors by embryonic cells.

The research was aimed to study some indices of lymphocyte functional state under culturing with human embryo nerve cells.

Human embryo cryopreserved nerve cells (2×10^6) were mixed with 0.3% agar and placed into plastic Petri dishes. After agar layer hardening, the donor lymphocyte suspension was introduced into Petri dishes in 2 ml DMEM medium (2×10^6 lymphocytes in 1 ml medium) and incubated for 18 hrs at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Afterwards we have determined specific weight of viable lymphocytes (0.2% trypan blue staining), Hoechst-positive lymphocyte number, CD25-positive lymphocyte content (flow cytometry method), lymphocyte activity in test of spontaneous and antibody-dependent cytotoxicity with xenogenic erythrocytes. Lymphocytes of the same donor, incubated on 0.3% agar layer, free of human embryo nerve cells, served as the control.

Lymphocyte culturing on agar layer, containing human embryo nerve cells is accompanied by an increase in specific weight of viable lymphocytes, two-fold decrease in Hoechst-positive lymphocytes, specific weight reduction of CD25-positive lymphocytes.

Human embryo nerve cells under culturing conditions improve the viability indices of donor lymphocytes, normalize the number of CD25-positive ones. It appears that embryonic cells produce the water soluble factors, optimizing functional state of lymphocytes.

Обогащение суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании

О.В. МАРКОВА

Институт нейрохирургии имени акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Enrichment of Hepatocyte Suspension of Human Embryo with CD34-Positive Cells During Culturing

O.V. MARKOVA

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

Разработаны методы культивирования и экспансии *ex vivo* стволовых клеток с помощью коммерческих ростовых факторов. Важное значение имеет получение ростовых факторов из доступных биологических источников.

Цель работы – исследование возможности обогащения суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании в присутствии лизата нейроцитов эмбриона человека.

Лизат нейроцитов эмбриона человека (7–8 недель гестации) получали многократным замораживанием и размораживанием клеточной суспензии. Стандартизировали лизат по содержанию белка (160 мг/мл). Лизат добавляли в полную среду ДМЕМ (10% от общего объема среды). Гепатоциты эмбриона человека 7–8 недель гестации культивировали в бессывороточной среде ДМЕМ 5 суток для избавления суспензии от зрелых клеток и увеличения удельного веса CD34-положительных клеток. Затем вносили полную среду ДМЕМ, содержащую 10% лизата нейроцитов человека, и инкубировали суспензию в течение 7 суток. Определяли общее количество клеток, удельный вес жизнеспособных клеток (окраска 0,2% раствором трипанового синего), содержание CD34-положительных клеток (метод проточной цитофлуориметрии).

Установлено, что культивирование гепатоцитов эмбриона человека в бессывороточной среде ДМЕМ (5 суток) с последующим переводом культуры на полную среду ДМЕМ, содержащую 10% лизата нейроцитов эмбриона человека (7 суток), сопровождается увеличением клеточности суспензии, удельного веса жизнеспособных клеток, а также CD34-положительных клеток.

Предложен метод обогащения суспензии гепатоцитов эмбриона человека CD34-положительными клетками при культивировании в присутствии лизата нейроцитов эмбриона человека. Вероятно, лизат эмбриональных нейроцитов содержит ростовые факторы для стволовых гемопоэтических клеток.

The methods of culturing and *ex vivo* expansion of stem cells with commercial growth factors have been developed. The deriving of growth factors from accessible biological sources is of a significant importance.

The research aim was to study the enrichment capacity of hepatocyte suspension of human embryo with CD34-positive cells during culturing in the presence of human embryo neural cell lysate.

The lysate of human embryo neural cells (7–8 weeks of gestation) was derived by multiple freezing and thawing of cell suspension. The lysate was standardized on the protein content (160 mg/ml). The lysate was added into complete DMEM medium (10% of total medium volume). The hepatocytes of human embryo of 7–8 weeks gestation were cultured in DMEM serum-free medium for 5 days for the elimination of mature cells from the suspension and increasing of specific weight of CD34-positive cells. Then the complete DMEM medium, containing 10% lysate of human neuro-cells, was added and the suspension was incubated for 7 days. The total number of cells, specific weight of viable cells (0.2% solution of trypan blue staining), content of CD34-positive cells (the flow cytofluorimetry method) were determined.

It has been established, that the culturing of human embryo hepatocytes in DMEM serum-free medium (5 days) with following transfer of culture into complete DMEM medium, containing 10% lysate of human embryo neuro-cells (7 days) is accompanied by increasing of suspension cellularity, specific weight of viable cells, and CD34-positive cells.

The enrichment method for the suspension of human embryo hepatocytes with CD34-positive cells at culturing in the presence of lysate of human embryo neuro-cells has been suggested. Probably, the lysate of embryo neuro-cells contains the growth factors for hemopoietic stem cells.