

**Тезисы 38-й ежегодной конференции молодых ученых
 «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии,
 трансплантологии и биотехнологии», 21–22 мая 2014 г., г. Харьков**

<i>Порожан Е.А., Димитров А.Ю., Бабенко Н.Н., Дубрава Т.Г., Гольцев А.Н.</i> Экспрессия гена индоламин-2,3-диокси-геназы в криоконсервированных фетальных нервных клетках.....	160
<i>Рогульская Е.Ю., Петренко Ю.А.</i> Тромбоцитарный лизат повышает эффективность криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток.....	161
<i>Коробкова А.В., Компаниец А.М.</i> Криоконсервирование концентратов тромбоцитов в комбинированных консервантах при разных температурных режимах (–70...–80 и –196°С).....	162
<i>Дябина О.А., Останков М.В., Бондарович Н.А., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток аденокарциномы Эрлиха.....	163
<i>Муценко В.В., Рогульская Е.Ю., Тарусин Д.Н., Петренко Ю.А.</i> Влияние высокомолекулярных полимеров на жизнеспособность, метаболическую активность и способность к мультилинейной дифференцировке мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных в отсутствие ДМСО.....	164
<i>Севастьянов С.С., Осецкий А.И.</i> Повреждение криоконсервируемых биообъектов в процессе кластерной кристаллизации криопротекторных растворов.....	165
<i>Белецкая П.В., Демин Ю.А.</i> Динамика экспрессии генов про- и антиангиогенного факторов на фоне применения ядросодержащих клеток пуповинной крови в экспериментальной модели неоваскулярной ретинопатии.....	166
<i>Беспалова І.Г., Рогоза Л.А.</i> Молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах криоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят.....	167
<i>Ямпольская Е.Е., Мацевитая И.Ю., Гаевская Ю.А., Луценко Е.Д., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Проявление иммунокорректирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени в условиях развития реакции «трансплантат против хозяина».....	168
<i>Руднева Ю.В., Бабийчук В.Г., Чернявская Е.А., Кулик В.В.</i> Вариабельность сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторных сеансов ритмических экстремальных криовоздействий.....	169
<i>Лихитский О.О.</i> Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты.....	170
<i>Феськов В.А., Сотник Н.Н., Сомова Е.В., Тищенко А.А., Прокопюк В.Ю.</i> Витрификация овариальной ткани.....	171
<i>Бабинец О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф.</i> Сохранность антагонистической активности свободных и иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения.....	172
<i>Шканд Т.В., Татарец А.Л.</i> Исследование скорости деградации альгинатных имплантатов в миокарде крыс.....	173
<i>Стриха О.А.</i> Импульсная кондуктометрия как экспресс-тест для оценки состояния 2-клеточных эмбрионов мыши.....	174
<i>Буркова В.В., Пишко О.В.</i> Инфекционная активность промышленных штаммов вируса бешенства после хранения при температурах –20, –80°С.....	175
<i>Шевченко Е.В., Горленко А.А., Бызов Д.В.</i> Девиализированные ксеногенные артерии – опыт трансплантации.....	176
<i>Буцкий К.И., Пуговкин А.Ю.</i> Криорезистентность спермы белого толстолобика после стимуляции широкоиспользуемыми гормональными препаратами.....	177
<i>Пуговкин А.Ю., Буцкий К.И.</i> Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (<i>Acipenser ruthenus</i> L) и карпа (<i>Cyprinus carpio</i> L).....	178
<i>Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Онасенко Е.С.</i> Изучение биологических свойств деконсервированных клеток дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в составе альгинатных гранул.....	179
<i>Ахатова Ю.С., Сысоев А.А., Сысоева И.В., Гулевский А.К.</i> Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на метаболизм аденилатов в клетках лейкоконцентрата после криоконсервирования.....	180

<i>Говорова Ю.С.</i> Исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека до и после низкотемпературного воздействия.....	181
<i>Челомбитько О.В., Бондарович Н.А., Останков М.В., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н.</i> Модификация экспрессии генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха под действием криоконсервирования.....	182
<i>Тарусин Д.Н., Зайков В.С., Муценко В.В., Петренко Ю.А.</i> Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах.....	183
<i>Димитров А.Ю., Дубрава Т.Г., Гольцев А.Н.</i> Анализ ИДО-зависимого иммуномодулирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.....	184
<i>Борисов П.А., Димитров А.Ю., Останков М.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние различных концентраций криопротектора ДМСО на уровень экспрессии stemness-генов в стволовых клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.....	185
<i>Зайков В.С., Муценко В.В., Тарусин Д.Н., Петренко Ю.А.</i> Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы снижает токсическое действие криопротекторов при витрификации.....	186
<i>Дорофеева Т.В., Кудокоцева Е.В.</i> Сохранность иммобилизованных в гелях клеток <i>Escherichia coli</i> М-17 при низких температурах.....	187

coldinbiologyandmedicine **38**
current problems in cryobiology,
transplantology and biotechnology

**Abstracts of the 38th Annual Conference of Young Scientists ‘Cold in Biology and Medicine.
Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology’
May 21–22, 2014, Kharkov, Ukraine**

<i>Porozhan E.A., Dimitrov A. Yu., Babenko N.N., Dubrava T.G., Goltsev A.N.</i> Indoleamine-2,3-Dioxygenase Gene Expression in Cryopreserved Fetal Nerve Cells.....	160
<i>Rogulska E. Yu., Petrenko Yu. A.</i> Platelet Lysate Enhances Efficiency of Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells.....	161
<i>Korobkova A.V., Kompaniets A.M.</i> Cryopreservation of Platelet Concentrates in Combined Preservatives at Different Temperature Regimens (–70...–80 and –196°C).....	162
<i>Diabina O.A., Ostankov M.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N.</i> Cryopreservation Effect on Structural-Functional Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells.....	163
<i>Mutsenko V.V., Rogulska E. Yu., Tarusin D.N., Petrenko Yu.A.</i> Impact of High Molecular Weight Polymers on Viability, Metabolic Activity and Multilineage Differentiation Ability of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved in Me ₂ SO Absence.....	164
<i>Sevastianov S.S., Osetsky A.I.</i> Damage of Cryopreserved Bioobjects in the Process of Cluster Crystallization of Cryoprotective Solutions.....	165
<i>Beletskaya P.V., Demin Yu.A.</i> Dynamics of Gene Expression of Pro- and Antiangiogenic Factors at the Background of Application of Cord Blood Nucleated Cells in Experimental Model of Neovascular Retinopathy.....	166
<i>Bespalova I.G., Rohoza L.A.</i> Molecular-Mass Distribution of Peptides in the Extracts of Cryopreserved Fragments from Pig Spleen and Piglet Skin.....	167
<i>Yampolskaya E.E., Matsevitaya I. Yu., Gaevskaya Yu.A., Lutsenko E.D., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Manifestation of Immunocorrective Effect of Cryopreserved Fetal Liver Cells Under Development of Graft-Versus-Host Disease.....	168
<i>Rudnyeva Yu.V., Babiychuk V.G., Chernyavskaya E.A., Kulik V.V.</i> Heart Rate Variability in Dynamics of Aging in Rats on Background of Repeated Extreme Rhythmic Cryoexposures.....	169
<i>Likhitsky O.O.</i> Reparative Regeneration of Bone Tissue Under Cryopreserved Placenta Effect.....	170
<i>Feskov V.A., Sotnik N.N., Somova E.V., Tischenko A.A., Prokopuk V.Yu.</i> Ovarian Tissue Vitrification.....	171
<i>Babinets O.M., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F.</i> Preservation of Antagonistic Activity of Free Probiotics and Those Immobilized on Enterosorbents After Low Temperature Storage.....	172



<i>Shkand T.V., Tatarets A.L.</i> Analysis of Alginate Implants Degradation Rate in Rat Myocardium.....	173
<i>Strikha O.A.</i> Impulse Conductometry as the Express-Test to Estimate the State of 2-Cell Murine Embryos.....	174
<i>Burkova V.V., Pishko O.V.</i> Infectious Activity of Industrial Strains of Rabies Virus after Storage at -20, -80°C.....	175
<i>Shevchenko E.V., Gorlenko A.A., Byzov D.V.</i> Devitalized Xenogenic Arteries: Transplantation Experience.....	176
<i>Butskiy K.I., Puhovkin A.Yu.</i> Cryoresistance of Silver Carp Sperm after Stimulation by Widely Used Hormonal Preparations.....	177
<i>Puhovkin A.Y., Butskiy K.I.</i> Spermatozoa Membrane Permeability in Sterlet (<i>Acipenser ruthenus</i> L) and Carp (<i>Cyprinus carpio</i> L).....	178
<i>Ponomareva V.L., Vysekantsev I.P., Onasenko E.S.</i> Study of Biological Features of Frozen-Thawed <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Yeast Cells Incapsulated in Alginate Granules.....	179
<i>Akhatova Yu.S., Sysoyev A.A., Sysoyeva I.V., Gulevsky A.K.</i> Effect of Cord Blood Low Molecular Fraction on Adenylate Metabolism in Leukoconcentrate Cells after Cryopreservation.....	180
<i>Govorova Yu.S.</i> Study of Dimethyl Sulfoxide Effect on Thermal Denaturation of Human Hemoglobin Prior to and after Low Temperature Exposure.....	181
<i>Chelombitko O.V., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Dimitrov A.Yu., Goltsev A.N.</i> Modification of Expression of Pluripotency Genes in Ehrlich's Carcinoma Cells Following Cryopreservation.....	182
<i>Tarusin D.N., Zaikov V.S., Mutsenko V.V., Petrenko Ya.A.</i> Resistance of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microspheres to Short-Term Storage at Positive Temperatures.....	183
<i>Dimitrov A.Yu., Dubrava T.G., Goltsev A.N.</i> Analysis of IDO-dependent Immunomodulatory Effect of Mice Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells Prior to and After Cryopreservation.....	184
<i>Borisov P.A., Dimitrov A.Yu., Ostankov M.V., Goltsev A.N.</i> Effect of Different DMSO Concentrations on Expression Level of Stemness Genes in Mice Fetal Liver Stem Cells Prior to and after Cryopreservation.....	185
<i>Zaikov V.S., Mutsenko V.V., Tarusin D.N., Petrenko Yu.A.</i> Encapsulation of Cells into Alginate Microspheres Reduces Toxic Effect of Cryoprotectants During Vitrification.....	186
<i>Dorofeyeva T.V., Kudokotseva E.V.</i> Preservation of <i>Escherichia coli</i> M-17 Cells Immobilised in Gels Under Low Temperatures.....	187



**Экспрессия гена индоламин-2,3-диоксигеназы
в криоконсервированных фетальных нервных клетках**
Е.А. Порожан, А.Ю. Димитров, Н.Н. Бабенко, Т.Г. Дубрава, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Indoleamine-2,3-Dioxygenase Gene Expression in Cryopreserved Fetal Nerve Cells
E.A. Porozhan, A.Yu. Dimitrov, N.N. Babenko, T.G. Dubrava, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) – фермент, способствующий супрессии Т-клеточного звена иммунитета. Данные о возможности коррекции иммунного статуса организма при аутоиммунных заболеваниях путем ингибции Т-клеточной реактивности по ИДО-зависимому механизму позволяют рассматривать фетальные нервные клетки (ФНК) как один из перспективных препаратов клеточной терапии [А. Dimitrov, 2013]. Однако отсутствуют данные об изменении экспрессии гена *ido* в ФНК после криоконсервирования.

Цель исследования – изучить уровень экспрессии гена *ido* в адгезивной и неадгезивной фракциях нативных и криоконсервированных ФНК.

Материалы и методы. Эксперименты выполняли на ФНК мышей линии СВА 14 суток гестации. Клетки криоконсервировали с 10% ДМСО по следующей программе: охлаждение со скоростью 1 град/мин до -9°C , остановка в течение 10 мин, затем охлаждение со скоростью 1 град/мин до -25°C , затем 10 град/мин до -60°C и погружение в жидкий азот. Нативные и криоконсервированные ФНК культивировали *in vitro* в среде DMEM/F12 («Seriva», Германия) при добавлении 15% эмбриональной телячьей сыворотки в чашках Петри с покрытием «BioCoat» Ламинин/Фибронектин («BD Pharmingen», США) при 37°C в течение 48 ч. Для стимуляции экспрессии гена *ido* в культуру ФНК через 24 ч добавляли интерферон- γ (ИФН- γ) («Sigma-Aldrich», США). Экспрессию гена *ido* в общей, адгезивной и неадгезивной суспензиях ФНК оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Показано, что в адгезивной фракции нативных ФНК, обогащенной клетками глии, уровень экспрессии гена *ido* был в 3,8 раза выше по сравнению с неадгезивной. После стимуляции ИФН- γ содержание транскриптов гена *ido* в адгезивной фракции ФНК увеличилось в 12,5 раза, а в неадгезивной – в 7,2 раза. Уровень экспрессии гена *ido* непосредственно после размораживания общей суспензии ФНК вырос в 3,5 раза по сравнению с нативным контролем. Установлено повышение содержания транскриптов гена *ido* при культивировании криоконсервированных ФНК без стимуляции ИФН- γ , причем в адгезивной фракции – в 5,2 раза, в неадгезивной – в 2,3 раза. Стимуляция ИФН- γ криоконсервированных ФНК *in vitro*, как и в нативном материале, способствовала увеличению экспрессии гена *ido*.

Полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне экспрессии гена *ido* в адгезивной фракции фетального мозга, обогащенной клетками глии. Использование ИФН- γ , как мощного индуктора экспрессии *ido*, позволит усилить терапевтические свойства ФНК. Криоконсервирование оказывало стимулирующий эффект на уровень экспрессии гена *ido* в ФНК, что может быть предпосылкой успешной реализации иммунокорригирующего потенциала этого материала при аутоиммунных заболеваниях.

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme contributing to the suppression of T-cell immunity link. Different subpopulations of fetal brain cells have the ability to synthesize IDO. The data on possible correction of immune status of an organism in autoimmune diseases by inhibition of T-cell reactivity of IDO-dependent mechanism allow us to consider fetal nerve cells (FNCs) as one of the promising preparations of cell therapy [A. Dimitrov, 2013]. There is no evidence of change in *ido* gene expression in FNCs after cryopreservation.

The research objective was to study *ido* gene expression in adhesive and non-adhesive fractions of native and cryopreserved FNCs.

Materials and methods. The experiments were performed in FNCs of CBA mice of 14 gestation days. Cells were cryopreserved with 10% DMSO using the following program: cooling with the rate of 1 deg/min down to -9°C , stop during 10 min, then cooling with the rate of 1 deg/min down to -25°C , afterwards 10 deg/min down to -60°C and plunging into liquid nitrogen. Native and cryopreserved FNCs were cultured *in vitro* in DMEM/F12 (Seriva, Germany) supplemented with 15% FBS in Petri dish coated with a BioCoat Laminin/Fibronectin (BD Pharmingen, USA) at 37°C for 48 hrs. To stimulate *ido* gene expression the FNC culture after 24 hrs was supplemented with IFN- γ (Sigma-Aldrich, USA). Expression of *ido* gene in total, non-adhesive and adhesive suspensions of FNCs was assessed by polymerase chain reaction in real time.

Results. It was shown that the adhesive fraction of native FNC enriched with glial cells the *ido* gene expression level was 3.8 times higher than if compared to the non-adhesive one. After stimulation with IFN- γ the *ido* gene transcripts content in the adhesive FNC fraction increased 12.5 times and did 7.2 times in the non-adhesive one. The *ido* gene expression level immediately after freeze-thawing of total FNC suspension increased 3.5 times as compared to the native control. We observed an increase in the content of *ido* gene transcripts when culturing cryopreserved FNCs without stimulation of IFN- γ , moreover in the adhesive and non-adhesive fractions it was 5.2 times and 2.3 times, respectively. Stimulation of *in vitro* cryopreserved FNCs with IFN- γ , the same as in native material, contributed to the increased *ido* gene expression.

Thus, the findings indicate that a higher level of *ido* gene expression is inherent to an adhesive fraction of fetal brain enriched with glial cells. Using IFN- γ as a powerful inducer of *ido* expression will enhance the therapeutic properties of FNCs. Cryopreservation had a stimulating effect on the level of *ido* gene expression in FNCs that might be precondition for the successful implementation of this material immunocorrective potential in autoimmune diseases.



Тромбоцитарный лизат повышает эффективность криоконсервирования мезенхимальных стромальных клеток

Е.Ю. Роговская, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Platelet Lysate Enhances Efficiency of Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells

E.Yu. Rogulska, Yu. A. Petrenko

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

Применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в клинической практике связано с необходимостью стандартизации и оптимизации протоколов культивирования и долгосрочного хранения. Для повышения биологической безопасности клеточных препаратов согласно нормам и правилам GMP требуется минимизировать их контакт с ксеногенными и токсичными компонентами. Криозащитные среды для эффективного замораживания МСК обычно содержат 10% ДМСО и эмбриональную сыворотку (ЭС), которые следует удалять перед инфузией, что, в свою очередь, не только связано со значительными затратами времени, но и приводит к потере части клеток. В связи с этим целью работы было исследование целесообразности применения тромбоцитарного лизата (ТЛ) в качестве альтернативы ксеногенной ЭС в среде культивирования и криоконсервирования.

В работе использовали МСК жировой ткани человека 4–6 пассажей. Экспансию клеток проводили в среде α -MEM, дополненной 10% ЭС или 10% ТЛ. Для подготовки клеток к криоконсервированию за 24 ч до замораживания в среду культивирования вносили 100 мМ сахарозы. В качестве среды для криоконсервирования использовали α -MEM, содержащую 200 мМ сахарозы и/или 10% ЭС и 10% ТЛ. Криоконсервирование МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до -80°C , после чего образцы погружали в жидкий азот. Сохранность клеток определяли окрашиванием трипановым синим. Метаболическую активность оценивали по редокс-индикаторам МТТ и Alamar Blue. Для оценки эффективности колониеобразования подсчитывали число колоний, определяли их размер и клеточность. Направленную адипо- и остеогенную дифференцировку выявляли по накоплению липидов или экспрессии клетками щелочной фосфатазы.

Ранее нами было установлено, что предварительное культивирование МСК в присутствии сахарозы способствовало значительному повышению их устойчивости к криоповреждению. Около 45% предобработанных сахарозой и культивированных в среде с ЭС клеток после замораживания-отогрева в отсутствие ДМСО сохраняло жизнеспособность и метаболическую активность. Введение ТЛ в состав среды криоконсервирования улучшало показатели жизнеспособности на 10–15%. Использование ТЛ в качестве альтернативы ЭС в среде культивирования приводило к усилению пролиферации, эффективности колониеобразования и остеогенной дифференцировки МСК. Кроме того, экспансия МСК в среде, дополненной ТЛ, позволяла увеличить сохранность до 63%. Клетки после культивирования и криоконсервирования с ТЛ сохраняли способность к адгезии, пролиферации и дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что тромбоцитарный лизат повышает эффективность криоконсервирования МСК.

Clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs) requires the development of standardized and optimal protocols for cell culture and long term storage. To improve the biological safety of cell products in accordance to GMP standards their contact with xenogeneic and toxic components needs to be minimized. Cryoprotective solutions for effective freezing of MSCs usually contain 10% Me₂SO and fetal serum (FS). These components should be removed before infusion that is not only time consuming process but also leads to a significant cell loss. Therefore the aim of this study was to evaluate the feasibility of platelet lysate (PL) application as an alternative to xenogeneic FS in culture and cryopreservation media.

Human adipose tissue-derived MSCs of the 4–6th passages were used in this study. Cell expansion was carried out in α -MEM, supplemented with 10% FS or 10% PL. Sucrose in concentration of 100 mM was added to the culture medium 24 hrs prior to cryopreservation for cell pretreatment. The basic composition of the cryopreservation medium was α -MEM supplemented with 200 mM sucrose and/or 10% FS and 10% PL. MSCs were cooled with the rate of 1 deg/min down to -80°C , following by plunging into liquid nitrogen. Cell survival was determined by trypan blue staining. Metabolic activity of cells was assessed by redox indicators MTT and Alamar Blue. To evaluate colony forming efficiency the number of colonies and their size were determined. Induced adipogenic and osteogenic differentiation was determined by the accumulation of lipids or by the alkaline phosphatase expression.

We have shown previously that the pretreatment of MSCs with sucrose resulted in a significant increase of their resistance to the cryodamage. About 45% of pretreated with sucrose and cultured in medium with FS cells after freezing in the absence of Me₂SO preserved their survival and metabolic activity. Inclusion of PL into the cryopreservation medium improved cell survival by 10–15%. The application of PL as an alternative to FS in the culture medium increased proliferation, colony forming efficiency and osteogenic differentiation of MSCs. Moreover, the expansion of MSCs in a medium supplemented with PL allowed improving cell viability after cryopreservation up to 63%. MSCs after culture and cryopreservation with PL were able for attachment, proliferation and multilineage differentiation towards osteogenic and adipogenic lineages. The obtained results suggest that platelet lysate enhances the efficiency of MSCs cryopreservation.



Криоконсервирование концентратов тромбоцитов в комбинированных консервантах при разных температурных режимах ($-70...-80$ и -196°C)

А.В. Коробкова, А.М. Компаниец

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Platelet Concentrates in Combined Preservatives at Different Temperature Regimens ($-70...-80$ and -196°C)

A.V. Korobkova, A.M. Kompaniets

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

Цель работы — изучение сохранности концентрата тромбоцитов после криоконсервирования при умеренно низкой ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) и низкой (-196°C) температурах с применением комбинированных криоконсервантов.

Концентрат тромбоцитов (КТ) получали дифференцированным центрифугированием отдельных доз донорской крови методом из лейкотромбоцитарного слоя. Замораживание образцов осуществляли после 30-минутной экспозиции с криозащитными средами, содержащими 10%-ю суммарную концентрацию смеси диметилацетамид (ДМАц)/оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}), ДМАц/глицерин или ДМАц/1,2-пропандиол (1,2-ПД) в плазме, а также 10% диметилсульфоксида (ДМСО) в плазме. Суспензию тромбоцитов охлаждали в полимерных (фторопласт) контейнерах вместимостью 10 мл по следующим режимам: в механическом холодильнике при температуре $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (режим 1); в парах жидкого азота при температуре $-188...-193^{\circ}\text{C}$ с последующим хранением при -196°C (режим 2); в механическом холодильнике при $-70...-80^{\circ}\text{C}$, хранением при -196°C (режим 3); в парах жидкого азота при $-188...-193^{\circ}\text{C}$ до температуры -70°C с последующим хранением при $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (режим 4). Образцы отогревали на водяной бане при 37°C . Функциональную полноценность криоконсервированных тромбоцитов оценивали после удаления криопротекторов по следующим показателям: агрегация, индуцированная аденазин-дифосфорной кислотой динатриевой солью (200×10^{-6} и 50×10^{-6} М) и коллагеном ($6,7 \times 10^{-3}$ М), реакция на гипотонический шок, ретракция сгустка; подсчитывали количество тромбоцитов в КТ.

Установлен высокий уровень сохранности функциональных свойств КТ при использовании всех комбинированных криоконсервантов и режимов охлаждения 2 и 4, независимо от конечной температуры замораживания и хранения (-196 и $-70...-80^{\circ}\text{C}$). Наиболее высокие результаты получены для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} . После охлаждения и хранения образцов КТ в механическом холодильнике (режим 1) уровень сохранности таких параметров, как реакция на гипотонический шок, ретракция, коллаген-индуцированная агрегация был несколько ниже, однако значимо не отличался от результатов криоконсервирования тромбоцитов с ДМСО.

Результаты данной серии исследований указывают на то, что использование комбинации криопротекторов в криоконсервантах и более высоких скоростей охлаждения суспензии тромбоцитов до температуры -70°C позволит повысить результаты их криоконсервирования при умеренно низкой ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) температуре.

The research was targeted to study the integrity of platelet concentrate after cryopreservation under moderately low and low temperatures ($-7...-80$ and -196°C , respectively) with applying combined cryopreservatives.

Platelet concentrate (PC) was procured by differentiated centrifugation of single samples of donor blood from buffy coat. Samples were frozen after 30 min exposure with cryoprotective media, containing 10% total concentration of combinations of dimethyl acetamide (DMAc)/oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 5$ (OEG _{$n=5$}), DMAc/glycerol or DMAc/1,2-propane diol (1,2-PD) in plasm, as well as 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in plasm. Platelet suspension was cooled in 10 ml polymer (fluoroplast) containers according the following regimens: in mechanical refrigerator at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (regimen 1); in liquid nitrogen vapors at $-188...-193^{\circ}\text{C}$ with following storage at -196°C (regimen 2); in mechanical refrigerator at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ and stored at -196°C (regimen 3); in liquid nitrogen vapors at $-188...-193^{\circ}\text{C}$ to -70°C with further storage at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (regimen 4). Samples were thawed in water bath at 37°C . Functional integrity of cryopreserved platelets was assessed after cryoprotectant removal by following indices: ADP- and collagen-induced aggregations (200×10^{-6} and 50×10^{-6} M) and ($6,7 \times 10^{-3}$ M), respectively), response to hypotonic shock, clot retraction; counting platelet number in PC.

There was established a high number of the integrity of PC functional properties when using the whole combined cryopreservatives and cooling regimens 2 and 4 independently on final temperature of freezing and storage (-196 and $-70...-80^{\circ}\text{C}$). The highest results were obtained for cryopreservative DMAc/OEG _{$n=5$} . After PC samples cooling and storage in mechanical refrigerator (regimen 1) the level of such parameters as response to hypotonic shock, collagen-induced aggregation was slightly lower, but not significantly different from the results of platelet cryopreservation with DMSO.

The findings of this experimental series indicate the fact, that the use of combined cryopreservatives and higher rates of platelet suspension cooling down to -70°C enabled to improve the results of their cryopreservation under moderately low temperature ($-70...-80^{\circ}\text{C}$).



Влияние криоконсервирования на структурно-функциональные характеристики клеток аденокарциномы Эрлиха

О.А. Дябина, М.В. Останков, Н.А. Бондарович, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Structural-Functional Characteristics of Ehrlich Carcinoma Cells

O.A. Diabina, M.V. Ostankov, N.A. Bondarovich, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Для использования метода криодеструкции при лечении онкологических заболеваний необходимо изучение влияния холода на структурно-функциональные характеристики стволовых раковых клеток (СРК), активность которых определяет инициацию и метастазирование опухолей. В связи с этим целью данной работы было исследование влияния криоконсервирования на структурно-функциональные свойства СРК в динамике развития аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Клетки АКЭ получали на 7-й (АКЭ-7) и 14-й (АКЭ-14) день культивирования *in vivo* в перитонеальной полости (ПП) мышей линии BALB/c. Клетки АКЭ-7 и АКЭ-14 криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов. Аттестация функционального потенциала отогретых образцов была проведена методом культивирования *in vivo* с учетом интенсивности роста клеток АКЭ в ПП. Концентрацию клеток с маркерами СРК (CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high}) определяли на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США) с использованием моноклональных антител к CD44 и CD24 антигену. Проллиферативный статус СРК оценивали по времени удвоения (*doubling time*) клеток АКЭ в ПП.

Установлено, что криоконсервирование по-разному изменяет функциональный статус СРК с фенотипом CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high} в гетерогенной популяции АКЭ в зависимости от этапа развития опухолевого процесса. Указанные отличия были выражены в наработке отдельных субпопуляций АКЭ, темпе их удвоения и кратности увеличения абсолютного количества в ПП.

На основании полученных результатов можно заключить, что каждая из популяций СРК отвечает на факторы криоконсервирования. Существенным фактором, определяющим характер ответа каждой из них, является модификация структурно-функционального статуса СРК по мере развития опухолевого процесса *in vivo*. Под действием факторов в процессе криоконсервирования происходит селекция стволовых предшественников в зависимости от стадии развития АКЭ, о чем свидетельствует более высокий пролиферативный потенциал криоконсервированных АКЭ-14 по сравнению с криоконсервированными АКЭ-7. Полученные данные подтверждают необходимость корректного выбора сроков криоиррадиации злокачественных новообразований.

The use of cryodestruction for treating oncological diseases necessitates the studying of cold effect on structural and functional characteristics of cancer stem cells (CSCs), the activity of which determines the tumor initiation and metastasizing. In this connection, the research aim was to investigate the effect of cryopreservation on structural and functional properties of CSCs in developmental dynamics of Ehrlich carcinoma (EC).

Ehrlich carcinoma cells were procured to the 7th (EC-7) and 14th (EC-14) days of *in vivo* culturing from peritoneal cavity (PC) of BALB/c mice. The EC-7 and EC-14 cells were cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectants. Functional potential of thawed samples was attested *in vivo* with taking into account the EC cells proliferation rate in PC. Concentration of CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} cells was assessed with flow cytometer (BD FACS Calibur, USA) using monoclonal antibodies to CD44 and CD24 antigen. Proliferative status of CSCs was estimated by doubling time of EC cells in PC.

Cryopreservation have been established to change in different way the functional status of CSCs with CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} phenotype in EC depending on the stage of tumor development. These differences were manifested in the rise of some EC subpopulations, the rate of their doubling and ratio of rise of absolute number of the cells in PC.

According to our findings we can conclude that each population of CSCs revealed a response to cryopreservation. An essential factor determining the character of response of each of them was the modification of CSC structure and functional status during development of *in vivo* tumor process. Cryopreservation resulted in the selection of stem progenitors depending on the stage of EC development, that was confirmed by higher proliferation potential of cryopreserved EC-14 cells if compared to cryopreserved EC-7. The findings emphasize the need in a correct selection of cryodestruction terms of malignant neofoms.

Влияние высокомолекулярных полимеров на жизнеспособность, метаболическую активность и способность к мультилинейной дифференцировке мезенхимальных стромальных клеток, криоконсервированных в отсутствие ДМСО

В.В. Муценко, Е.Ю. Рогульская, Д.Н. Тарусин, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Impact of High Molecular Weight Polymers on Viability, Metabolic Activity and Multilineage Differentiation Ability of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved in Me₂SO Absence

V.V. Mutsenko, E.Yu. Rogulska, D.N. Tarusin, Yu.A. Petrenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) по разработанному нами методу, включающему комплексное использование сахарозы, позволяет достичь показателей жизнеспособности клеток на уровне 45% в отсутствие проникающих криопротекторов. В настоящей работе исследовали возможность повышения эффективности данного метода за счет введения высокомолекулярных полимеров.

В работе использовали МСК кожи человека 6–8 пассажей. Предобработка заключалась в культивировании клеток в присутствии 0,2 М сахарозы в течение 24 ч до замораживания. В криозащитную среду вносили сахарозу в концентрации 0,3 М и один из следующих полимеров: фиколл (м. м. 400 000), декстран (м. м. 40 000), ГЭК (м. м. 200 000) и ПЭГ (м. м. 8000). Замораживание МСК осуществляли со скоростью 1 град/мин до –80°C, после чего образцы погружали в жидкий азот. После отогрева производился посев клеток без этапа отмывки. Сохранность клеток определяли путем окрашивания трипановым синим. Жизнеспособность и метаболическую активность клеток оценивали по уровню восстановления Alamar Blue. После культивирования в соответствующих индуктивных средах оценивали дифференцировочный потенциал МСК по окрашиванию на щелочную фосфатазу и нейтральные липиды.

Установлено, что введение в сахарозосодержащую среду криоконсервирования фиколла, декстрана или ГЭК в концентрациях от 1 до 6% не значительно предотвращало гибель клеток, предобработанных сахарозой. В то же время присутствие ПЭГ-8000 в криозащитной среде приводило к концентрационно-зависимому увеличению сохранности. Максимальные показатели жизнеспособности и метаболической активности клеток (65 и 60%, соответственно), были получены при использовании 6%-го раствора ПЭГ-8000. В условиях монослойного культивирования клетки, криоконсервированные под защитой сахарозы и ПЭГ-8000, были способны к адгезии, пролиферации и дифференцировке в остео- и адипогенном направлениях.

Таким образом, скрининг высокомолекулярных полимеров показал, что ПЭГ-8000 позволяет повысить эффективность криоконсервирования МСК в отсутствие ДМСО.

Cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSCs) according to the technique we previously developed, involved a complex application of sucrose and allowed to achieve cell viability rates at the level of about 45% in the absence of penetrating cryoprotectants. The aim of present work was to assess the possible enhancement of the efficiency of the technique by introducing high molecular weight polymers.

Skin derived human MSCs of 6–8 passages have been used in the study. The pretreatment step included cell culturing in the presence of 0.2 M sucrose during 24 hrs prior to freezing. Sucrose in the concentration of 0.3 M and one of the following polymers such as ficoll (MW 400,000), dextran (MW 40,000), HES (MW 200,000) and PEG (MW 8000) were introduced into cryoprotective medium. The freezing of MSCs was performed with the cooling rate of 1 deg/min down to –80°C with following plunging of the samples into liquid nitrogen. After thawing cells were seeded without any washing step. Cell survival was determined by trypan blue staining. Cell viability and metabolic activity were estimated by the level of Alamar Blue reduction. Differentiation potential of MSCs was evaluated after culturing in the corresponding inductive media by staining for alkaline phosphatase and neutral lipids.

It was found that the introduction of ficoll, dextran or HES in the concentration range of 1–6% into sucrose-containing cryopreservation medium insignificantly prevented the death of sucrose-pretreated cells. At the same time the presence of PEG-8000 in cryoprotective medium led to concentration-dependent increase in cell survival. Maximum rates of cell viability and metabolic activity (65 and 60%, respectively) were obtained in case of using 6% solution of PEG-8000. During monolayer culture the cells cryopreserved under protection of sucrose and PEG-8000 were able to adhere, proliferate and differentiate into osteo- and adipogenic directions.

Thus, screening of high molecular weight polymers has shown that PEG-8000 allows to enhance the effectiveness of MSCs cryopreservation in the absence of Me₂SO.



Повреждение криоконсервируемых биообъектов в процессе кластерной кристаллизации криопротекторных растворов

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Damage of Cryopreserved Bioobjects in the Process of Cluster Crystallization of Cryoprotective Solutions

S.S. Sevastianov, A.I. Osetsky

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

При изучении механизмов повреждения криоконсервируемых биообъектов современная практическая криобиология основное внимание уделяет температурному интервалу $-10...-60^{\circ}\text{C}$, в котором реализуется обычный фазовый переход «вода-лед». Однако анализ показывает, что при использовании наиболее востребованных криопротекторных веществ (ДМСО, глицерин, ЭГ, ПЭО) существенные повреждения биообъектов могут возникать и при более низких температурах (в интервале $-60^{\circ}\text{C}...T_g$), а также при $T < T_g$, где T_g – температура стеклования аморфных фракций. Причины возникновения повреждений в области температур $T < T_g$, обусловленных термоупругими напряжениями первого и второго родов, хорошо изучены в физическом материаловедении. Проведенные в этом направлении исследования дают эффективные варианты ингибирования повреждений за счет возникающих термоупругих деформаций. В то же время механизмы повреждения биообъектов в интервале температур $-60^{\circ}\text{C}...T_g$, в котором развивается кластерная кристаллизация оставшихся в замораживаемых молекулярных растворах и клеточных суспензиях жидких каналов и включений, практически не изучены. В связи с этим в настоящей работе рассмотрены механизмы повреждения криоконсервируемых биообъектов за счет кластерной кристаллизации криопротекторных растворов.

В работе показано, что наиболее интенсивно это явление протекает в процессе отогрева предварительно замороженных растворов с концентрацией криопротекторных веществ C_B 50...65%. Именно такие концентрации характерны для образующихся в поликристаллических образцах при $T > T_g$ жидкофазных включений с обычно используемыми в криобиологии исходными значениями C_B в пределах 10...15%.

На основе полученных с помощью дифференциальной объемной сканирующей тензодилатометрии данных проведена классификация применяемых криопротекторных веществ по особенностям их кластерной кристаллизации. Установлено, что сопровождающие это явление объемные эффекты существенно отличаются по величине и знаку для различных криопротекторов. Именно этот факт может определять криозащитную эффективность используемых криопротекторных веществ. Оценены скачки давления в замкнутых жидкофазных включениях, возникающих при кластерной кристаллизации, удовлетворяющей условию $\Delta V_d/V_0 > 0$, где $\Delta V_{cl} = V_1 - V_0$ – суммарное максимальное изменение объема системы в диапазоне температур кластерной кристаллизации. Впервые проведена оценка локальных скачков давления в сверхвязких жидкофазных каналах вблизи образования кластерных частиц и их влияния на сохранность находящихся в этих каналах клеток и молекул.

The studies of mechanisms of damages in cryopreserved bioobjects conducted by modern applied cryobiology are focused on the temperature range of $-10...-60^{\circ}\text{C}$, where the usual ‘water-ice’ phase transition is realized. However, the simple analysis shows that when using the most popular cryoprotective substances such as: DMSO, glycerol, EG, PEO, the substantial injuries in bioobjects could occur even at lower temperatures, namely within the range of $-60^{\circ}\text{C}...T_g$ and at $T < T_g$, where T_g is vitrification temperature of amorphous fractions. The reasons for occurrence of the damages within the temperature range $T < T_g$, stipulated by thermoelastic stress of types I and II, have been thoroughly studied in the physical material science. The studies conducted in this direction provide the efficient options to inhibit damages provoked by thermoelastic tensions. At the same time there is virtually no studies on the mechanisms of damages in biological samples occurring within the temperature range of $-60^{\circ}\text{C}...T_g$, where liquid channels and inclusions, remaining in the frozen molecular solutions and cell suspensions, are involved to the cluster crystallization processes. In this regard, this investigation was performed to elucidate the damage mechanisms of cryopreserved bioobjects due to cluster crystallization of cryoprotective solutions.

The study showed that the highest intensity of this phenomenon was found during thawing of pre-frozen solutions with a concentration of cryoprotective substances C_B of 50...65%. Exactly such concentrations were characteristic for the inclusions formed in polycrystalline samples at $T > T_g$ in the liquid phase if the initial concentrations C_B were typical for cryobiology, *i. e.* 10...15%.

Based on the data obtained with differential volumetric scanning tenzodilatometry the used cryoprotective agents were classified by the features of their cluster crystallization. It was found that the volumetric effects, accompanying this phenomenon were substantially different in magnitude and direction for different cryoprotectants. This fact can be used to determine the efficiency of the used cryoprotective substances. We assessed also the pressure surges in the closed liquid-phase inclusions, occurring during cluster crystallization, that satisfied the condition $\Delta V_d/V_0 > 0$, where $\Delta V_{cl} = V_1 - V_0$ was the maximum change in the total volume of the system within temperature range of cluster crystallization. For the first time we evaluated the local pressure surges in the ultra-viscous liquid-phase channels near the place of cluster particles formation as well as their impact on the integrity of cells and molecules being in these channels.

Динамика экспрессии генов про- и антиангиогенного факторов на фоне применения ядросодержащих клеток пуповинной крови в экспериментальной модели неоваскулярной ретинопатии

П.В. Белецкая¹, Ю.А. Демин²

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

²Харьковская медицинская академия последипломного образования

Dynamics of Gene Expression of Pro- and Antiangiogenic Factors at the Background of Application of Cord Blood Nucleated Cells in Experimental Model of Neovascular Retinopathy

P.V. Beletskaya¹, Yu.A. Demin²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkov, Ukraine

Использование препаратов криоконсервированной кордовой крови оказывает положительное влияние на клинические синдромы патологических процессов, связанных с неангиогенезом [A. Dahlmann-Noor, 2010]. На сегодняшний день выявлено большое количество эндогенных факторов, регулирующих процесс неоваскуляризации, основным активатором которого является VEGF (*Vascular endothelium growth factor*), а ингибитором – PEDF (*Pigment epithelium derived growth factor*) [G. Gao, 2001].

Работа проведена на четырех группах экспериментальных крыс, по 7 особей в каждой. В качестве модели неоваскулярной ретинопатии использовали бринзоламид-индуцированную [Ю.А. Демин, П.В. Белецкая, 2013]. Ретинопатию вызывали у животных 1, 2 (контроль – 13-е сутки) и 3 (контроль – 45-е сутки) групп, 4 – интактная группа. На 13-е сутки эксперимента крысам 1 (основной) группы однократно интравитреально вводили препарат ядросодержащих клеток пуповинной крови (ЯДК ПК) в дозе 0,0125 мл (100 000 клеток). Уровень экспрессии генов VEGF и PEDF в образцах сетчатки глаз крыс определяли полимерно-цепной реакцией в реальном времени (RT-PCR).

В интактной группе животных определялись одинаково низкие уровни экспрессии генов как VEGF, так и PEDF (0,062 и 0,065 соответственно). Во 2 группе было выявлено резкое увеличение экспрессии гена ангиогенного фактора и незначительное повышение антиангиогенного (2,878 и 0,099 соответственно), в 3 группе – нарастание экспрессии PEDF (1,165) с преобладанием VEGF. В основной группе животных установлено резкое повышение и доминирование PEDF по сравнению с VEGF (1,875 и 0,199 соответственно).

Таким образом, сетчатая оболочка глаза крыс в норме продуцирует определенный уровень VEGF и PEDF. Соотношение этих факторов такое, что они уравновешивают друг друга, поддерживают нормальное развитие и функционирование сетчатки. На фоне неоваскуляризации ишемизированной сетчатки увеличивается экспрессия гена VEGF, в ответ на который в дальнейшем, по нашему мнению, увеличивается PEDF. Однако количества последнего недостаточно для блокирования пролиферативных процессов. После однократной интравитреальной инъекции препарата ЯДК ПК отмечены увеличение экспрессии гена PEDF и относительное снижение VEGF. Это свидетельствует о подавлении активности процесса неангиогенеза в сетчатой оболочке экспериментальных животных.

The use of cryopreserved cord blood preparations has a positive effect on clinical symptoms of pathological processes associated with neovascularization [A. Dahlmann-Noor, 2010]. To date a large number of endogenous factors was found, which regulate neovascularization, the main activator of which is VEGF (*vascular endothelium growth factor*), and the inhibitor is PEDF (*pigment epithelium derived growth factor*) [G. Gao, 2001].

This research was performed in four groups of experimental rats, by seven animals in each group. Brinzolamide-induced model of neovascular retinopathy was applied [Yu.A. Demin, P.V. Beletskaya, 2013]. Retinopathy was induced in the animals of group 1, 2 (control, day 13) and 3 (control, day 45), group 4 was intact. On day 13 of the experiment the rats of group 1 (main) received a single intravitreal injection of cord blood nucleated cells (CB NCs) preparation in a dose of 0.0125 ml (100 000 cells). Real-time PCR (RT-PCR) was implemented to assess VEGF and PEDF genes expression in the samples of rat eye retina.

The intact group of animals had similar low levels of gene expression of both VEGF and PEDF (0.062 and 0.065, respectively). In group 2 we found a sharp increase in angiogenic factor gene expression and a slight increase of antiangiogenic gene expression (2.878 and 0.099, respectively), in group 3 we revealed rise in PEDF expression (1.165), and the prevalence of VEGF was kept. The main group of animals showed a sharp increase and dominance of PEDF if compared with VEGF (1.875 and 0.199, respectively).

Thus, the rat eye retina normally produces a certain level of VEGF and PEDF. The ratio of these factors is such that they balance each other, and maintain a normal development and function of retina. On the background of retinal neovascularization and ischemia the VEGF gene expression increases, and we believe the following PEDF elevation as a response to the latter. However, the amount of the PEDF is insufficient to block the proliferative processes. After a single intravitreal injection of CB NCs preparation we have found an increase in PEDF gene expression and a relative VEGF decrease, that testified in favor of suppression of neovascularization activity in retina of experimental animals.



Молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят

I.G. Беспалова, Л.А. Рогоза

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Molecular-Mass Distribution of Peptides in the Extracts of Cryopreserved Fragments from Pig Spleen and Piglet Skin

I.G. Bespalova, L.A. Rohoza

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

На даний час показана висока біологічна активність екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят при експериментальних патологічних станах, яка пов'язується з наявністю в них регуляторних пептидів. Однак для визначення можливого механізму дії таких пептидів необхідно встановити їхню будову. Одним із таких методів може бути метод часопролітної матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI-ToF).

Мета роботи – отримати дані з молекулярно-масового розподілу пептидів, які входять до складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри новонароджених поросят, і провести аналіз їхніх мас-спектрів.

Екстракти одержували з кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500 фрагментів селезінки свиней (ЕСС) та шкіри поросят (ЕШП), інкубуючи їх у фізіологічному розчині 60 хв за кімнатної температури. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на водяній бані 15 хв і очищували, пропускаючи через фільтрувальний папір. Для вивчення пептидного складу досліджуваних екстрактів використовували метод MALDI-ToF. Співставлення отриманих даних проводили шляхом порівняння найінтенсивніших зареєстрованих піків на мас-спектрах, що можуть відповідати окремим пептидним молекулам, із показниками, які містяться в базі даних «Protein Knowledgebase» (UniProtKB).

У ЕСС та ЕШП реєструються спільні для цих екстрактів два піки з m/z (відношення маси іона до заряду) 918 та 3390, які можуть бути співставлені з putative uncharacterized protein (FLJ11457) та TGF-beta receptor type I відповідно. Крім того, були співставлені пептиди Myocyte enhancer factor 2D (зареєстрована m/z 4966), який відіграє роль у контролі клітинного росту, виживання та апоптозу, Cathepsin B (зареєстрована m/z 3720) відноситься до білків-протеаз, та ін. Також у ЕСС реєструються пептиди з m/z 1100; 4539; 4751; 9763; 10885; 11989, а в ЕШП – 2621; 1101 та 1143. Пептиди з такими молекулярними масами відсутні у використаній нами базі даних. У ЕШП зареєстровано піки з m/z 6780 та 7353, які можна порівняти з молекулярними масами пептидів, коди яких є в базі даних – K7GR95 і F1SK27, але їх структура та функції не встановлені.

Наведені дані з наявності відповідних пептидів у екстрактах та їхньої біологічної активності можуть знайти використання при з'ясуванні механізму біологічної дії.

It is currently shown that the extracts from cryopreserved fragments of pig and piglet organ possess a high biological activity in experimental pathological conditions which is believed to be related with the presence of regulatory peptides. However, it is necessary to determine the structure of these peptides to reveal a possible mechanism of their action. One of these methods could be time-of-flight matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-ToF).

The research aim was to obtain the data about the molecular mass distribution of peptides in the extracts of cryopreserved fragments of pig spleen and newborn piglet skin, and to analyze their mass spectra.

The extracts were obtained from pig spleen fragments (PSE) and piglet skin fragments (PISE) cryopreserved in the presence of PEO-1500, and incubated post thaw for 1 hr in the physiological solution at room temperature. Supernatant was warmed in water bath for 15 min and purified by passing through a filter paper to remove thermolabile proteins. To study a peptide composition of the investigated extracts, the method of MALDI-ToF was used. The obtained data were analysed by comparing the most intense mass spectra peaks, which may correspond to single peptide molecules, and the data of Protein Knowledgebase (UniProtKB).

In PSE and PISE we recorded two peaks common to both extracts with 918 and 3.390 m/z (ion/charge ratio) which could correspond to putative uncharacterized protein (FLJ11457) and TGF-beta receptor type I respectively. In addition, there were matched the peptides Myocyte enhancer factor 2D (registered m/z is 4.966) playing a role in the control of cell growth, survival and apoptosis, Cathepsin B (recorded m/z is 3.720) referred to the protease proteins *etc.* In addition, we found the PSE the peptides with m/z 1100; 4539; 4751; 9763; 10885; 11989, and in the PISEs – 2621; 1101 and 1143. Peptides with such molecular masses were absent in the used database. In the NPSE we recorded the peaks with m/z 6.780 and 7.353, that are similar to the molecular weight of peptides, the codes of which were present in the database, K7GR95 and F1SK27; but their structure and functions have not been established yet.

The presented data about presence of relevant peptides in the extracts and their biological activity may find use when ascertaining the mechanism of their biological effect.



Проявление иммунокорригирующего эффекта криоконсервированных клеток фетальной печени в условиях развития реакции «трансплантат против хозяина»

Е.Е. Ямпольская, И.Ю. Мацевитая, Ю.А. Гаевская, Е.Д. Луценко, М.В. Останков, А.Н. Гольцев
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Manifestation of Immunocorrective Effect of Cryopreserved Fetal Liver Cells Under Development of Graft-Versus-Host Disease

E.E. Yampolskaya, I.Yu. Matsevitaya, Yu.A. Gaevskaya, E.D. Lutsenko, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) – одно из самых частых и опасных осложнений трансплантации аллогенного костного мозга. Коррекция состояния иммунокомпетентной сферы при аутоиммунной агрессии предусматривает необходимость подавления эффекторного и/или активации регуляторного звена иммунокомпетентных клеток с супрессорной активностью, как основного гаранта обеспечения естественной толерантности. Актуальным может быть использование клеток фетальной печени (КФП), потенциально обладающих иммунокорригирующей активностью. Неоднократно отмечалось, что КФП разных сроков гестации имеют существенные различия как качественно-количественных характеристик, так и особенностей ответа на действие факторов криоконсервирования. В связи с этим целью исследования была оценка характера проявления терапевтического эффекта криоконсервированных КФП разных сроков гестации у животных с локальной РТПХ (лРТПХ).

Индукцию лРТПХ проводили на мышцах линии C57Bl/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы 2×10^7 клеток лимфоузлов (ЛУ) мышей линии СВА/Н. Через сутки после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные или криоконсервированные КФП 14 или 18 суток гестации. Криоконсервирование КФП осуществляли под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 1 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот. На 5-е сутки после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание T_{reg} (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺-клеток) в ЛУ на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США); экспрессию гена *tgf-β* – методом ПЦР-анализа; детекцию продуктов амплификации – методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» («Agilent Technologies», США).

В условиях развития лРТПХ КФП снижают клиническое проявление патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Проявление терапевтической активности КФП в большей степени коррелировало с увеличением содержания FOXP3⁺-клеток в ЛУ и экспрессии гена *tgf-β*, но не с содержанием CD4⁺CD25⁺-клеток. По мере увеличения срока гестации с 14 до 18 суток терапевтический потенциал КФП снижался. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность, соизмеримую с нативными КФП-14. Такой феномен базируется на экспериментально подтвержденной концепции о возможности «ревитализации» под действием факторов криоконсервирования функционального потенциала КФП поздних сроков гестации до уровня более ранних.

Graft-versus-host disease (GVHD) is one of the most frequent and dangerous complications of allogeneic bone marrow transplantation. Correcting the state of immunocompetent sphere at autoimmune aggression involves the need to suppress the effector and/or activation of the regulatory link of immunocompetent cells possessing suppressive activity as the main guaranting agent of natural tolerance. The use of fetal liver cells (FLCs), potentially having immunocorrecting activity may be of current interest. It was noted many times that the FLCs of different gestation terms had significant differences in both qualitative and quantitative characteristics as well as in features of response to the cryopreservation factors. In this regard, the research aim was to assess the character of the therapeutic effect manifestation of cryopreserved FLCs of different gestation terms in animals with local GVHD (IGVHD).

Induction of IGVHD was made in C57Bl/6 mice by subcutaneous injection of 2×10^7 lymph node (LN) cells of CBA/H mice into the arolum. In 1 day after initiation of IGVHD the mice were injected intravenously with native or cryopreserved FLCs of 14 or 18 days of gestation. Cryopreservation of FLCs was performed under 10% DMSO protection, the cooling rate was 1 deg/min down to -25°C thereafter the samples were plunged into liquid nitrogen. To the 5th day after the initiation of pathology the following parameters were evaluated: the index of GVHD, content of T_{reg} (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺ cells) in the LN using flow cytometer FACS Calibur (BD, USA); *tgf-β* gene expression was determined by PCR method; detection of amplification products was carried out by capillary electrophoresis in chip analyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies USA).

Introduction of FLCs on the background of IGVHD course resulted in reduction of clinical pathology manifestation and intensity of immunoinflammatory reaction development. Therapeutic activity of FLCs in a greater extent correlated with the increase of FOXP3⁺-cells content in lymph nodes and *tgf-β* gene expression, rather than the content of CD4⁺CD25⁺-cells. With the increasing of gestation term from 14 to 18 days the therapeutic potential of FLCs decreased. However, after cryopreservation FLC-18 revealed such an immunocorrecting activity which was similar to the one of the native FLC-14. This phenomenon is based on the experimentally proved concept of the possible 'revitalization' of functional potential of late gestation term FLCs to a level of the ones of earlier terms as the effect of cryopreservation factors.



Вариабельность сердечного ритма в динамике старения крыс на фоне повторных сеансов ритмических экстремальных криовоздействий

Ю.В. Руднева, В.Г. Бабийчук, Е.А. Чернявская, В.В. Кулик

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Heart Rate Variability in Dynamics of Aging in Rats on Background of Repeated Extreme Rhythmic Cryoexposures

Yu.V. Rudnyeva, V.G. Babiychuk, E.A. Chernyavskaya, V.V. Kulik

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

Старение не является патологическим процессом, однако увеличение максимальной продолжительности жизни в развитых странах и несоответствие хронологического возраста биологическому привели к новой глобальной проблеме человечества – борьбе с заболеваниями, сопутствующими старению [W.B. Ershler *et al.*, 2006]. В то же время малые дозы стрессорных нагрузок не вызывают функциональных расстройств организма, играя при этом роль сигналов, активирующих адаптационные резервы организма [В.Н. Анисимов, 2008]. Одним из таких «мягких» стрессов являются ритмические экстремальные холодовые воздействия (РЭХВ, -120°C). В связи с вышеизложенным цель данной работы – изучение особенностей влияния РЭХВ на некоторые показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма в динамике старения крыс.

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах в процессе их старения (возраст 6, 12 и 18 месяцев). Каждая возрастная группа животных была разделена на подгруппы: первая – интактные; вторая – животные, которым проводили РЭХВ. Животных подвергали охлаждению (при -120°C) 9 раз по 2 мин каждые 6 месяцев. Спектральный анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) проводили с помощью программы «Поли-Спектр-Ритм» («Нейрософт», Россия) после 3-, 6- и 9-го сеанса РЭХВ, а также через неделю и месяц после 9 процедур РЭХВ.

Установлено, что у 6-месячных крыс после 3-, 6-, 9-й процедуры охлаждения и в отдаленные сроки наблюдения повышался уровень общей спектральной мощности нейрогуморальной регуляции (ТР) по отношению к контрольным показателям. Наибольшие ее значения имели место через месяц после последнего сеанса РЭХВ. Увеличивалась активность симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы (ВНС), а также гуморального звена регуляции. Аналогичная динамика изменений основных показателей спектрального анализа ВСР нами отмечена у 12- и 18-месячных животных после повторных процедур охлаждения. Проведенный анализ экспериментальных данных по изучению влияния РЭХВ на активность регуляторных систем продемонстрировал существенный рост ТР за счет повышения активности вегетативных центров. В ее структуре незначительно преобладал тонус парасимпатического отдела ВНС.

Таким образом, можно предположить, что РЭХВ, являясь звеном «мягкого» непродолжительного стресса, способны повышать адаптационные резервы организма независимо от количества процедур охлаждения и возраста экспериментальных животных.

Aging is not a pathological process, however, an increase of life span maximum in developed countries as well as chronological and biological age mismatch led to a new global problem of humanity – the fight against diseases associated with aging [W.B. Ershler *et al.*, 2006]. At the same time, low doses of stress loads do not cause functional disorders of the body, while they play the role of activating signal of an organism's adaptive reserves [V.N. Anisimov, 2008]. Ones of these 'soft' stresses are rhythmic extreme cold exposures (RECEs, -120°C). In view of the foregoing, the purpose of this study was to investigate the influence features of RECEs on some of the indices of spectral analysis of heart rate variability in dynamics of aging in rats.

Investigations were carried out in Albino male rats during their aging (aged 6, 12 and 18 months). Each age group of animals was divided into subgroups: the first one comprised intact animals, the second did those received RECEs. The animals were cooled (at -120°C) 9 times for 2 minutes every 6 months. Spectral analysis of HRV was performed using the Poly-Spectrum-Rhythm (Neurosoft, Russia) software after 3rd, 6th and 9th RECEs session, as well as one week and one month after 9 of RECEs procedures.

We have found the rise of spectrum total power (TP) of neurohumoral regulation in 6 months old rats after the 3rd, 6th, 9th cooling procedures and long-term follow, in comparison to the control. Its highest values occurred one month after the last session of RECEs. The increased activity of vegetative nervous system (VNS) sympathetic and parasympathetic divisions and humoral regulation were observed. We have noted similar dynamics of changes in key indices of spectral analysis of HRV in 12- and 18-month-old animals after repeated cooling procedures. The analysis of experimental data of the RECEs effect on the activity of regulatory systems demonstrated a significant growth of TP due to increased activity of vegetative centers. The tone of VNS parasympathetic division slightly prevailed in its structure.

Thus, we can assume RECEs, which are link of 'soft' short stress, are being able to increase adaptation reserves of an organism, regardless of the cooling procedures number and age of experimental animals.



Репаративная регенерация костной ткани под влиянием криоконсервированной плаценты

О.О. Лихитский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Reparative Regeneration of Bone Tissue Under Cryopreserved Placenta Effect

O.O. Likhitsky

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

Изучение механизма репаративной регенерации костной ткани является ключевой проблемой травматологии и ортопедии, поскольку, несмотря на обширность проводимых исследований, результаты лечения не удовлетворяют запросам практической медицины.

Цель работы состояла в исследовании стимулирующего действия биологического материала – криоконсервированной плаценты при сочетанной патологии: травматическом повреждении нижней челюсти и остеопорозе. Остеопороз вызывали введением 2,5% раствора гидрокортизона ацетата в течение 60 суток. Перелом нижней челюсти производили в подчелюстной области. Контролем служили экспериментальные животные (группа 1) без применения плацентарной ткани. Через 18–24 ч подкожно вводили криоконсервированные фрагменты плаценты, полученные в ИПКиК НАН Украины (группа 2). На 7, 14, 21, 30 и 45-е сутки животных обеих групп (всего 70) выводили из эксперимента и выделяли участок костной ткани в месте перелома. Материал подвергали классической гистологической обработке, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

В контрольной группе 1 грануляционная ткань являлась наиболее активным компонентом регенерата во все сроки его формирования, отграничивая поля лейкоцитарной инфильтрации и секвестры, но остеогенный компонент не получил преобладающего развития и, следовательно, до конечного срока наблюдения восстановления целостности нижней челюсти не происходило, поскольку в морфогенезе регенерата отсутствовала закономерная смена структуры, что замедляло процесс перестройки.

При переломе с введением криоконсервированной плаценты определялись значительно меньшая, чем в контроле, интенсивность некротических изменений, быстрое отграничение участков некроза и секвестров и более интенсивное развитие грануляционной ткани. Обнаружено, что введение криоконсервированной ткани оказывало положительное воздействие на формирование провизорных тканей в послеоперационном сроке 14–21 суток. Это создавало условия для сращения фрагментов к 30-м суткам за счет мелкопетливой сети новообразованных костных балочек и увеличения площади новообразованной кости.

Studying the mechanism of reparative regeneration of bone tissue is a key issue in traumatology and orthopedics, because despite a huge number of implemented studies the results of therapy do not comply the demands of practical medicine.

The purpose of this work was to study the stimulating action of biological material, cryopreserved placenta, during treatment of combined pathology: traumatic injury of the mandible and osteoporosis. The osteoporosis was induced by introducing 2.5% hydrocortisone acetate solution during 60 days. Fracture of the mandible was done in the submandibular region. Experimental animals without placental tissue introduction served as the control (group 1). The other animals (group 2) were after 18–24 hours injected subcutaneously with the cryopreserved placental fragments procured at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine. To day 7, 14, 21, 30 and 45 the animals in both groups (total 70) were sacrificed and a site of bone tissue in the place of fracture was isolated. The samples were subjected to the standard histological procedure, the sections were stained with hematoxylin-eosin.

In the control group 1 the granulation tissue was the most active component of the regenerate within the whole terms of its formation, it delimited the fields of leukocyte infiltration and sequesters, nevertheless the osteogenic component had no significant development and, consequently, till the end of the observation period no recovery of the mandible integrity occurred, since in the morphogenesis of regenerate there was no regular change in the structure, and restructurization was slow.

In case of the fracture and treatment with cryopreserved placenta a significantly lower intensity of necrotic changes was observed if compared to the control, a rapid delimitation of necrosis sites and sequesters was found as well as more intensive development of granulation tissue. Thus, the administration of cryopreserved tissue was established to affect positively the formation of provisional tissues in 14–21 days of post-surgery period. This enabled the synostosis of bone fragments to 30th day on account of small-loop network of newly formed bone trabeculae and increased area of newly formed bone.



Витрификация овариальной ткани

В.А. Феськов¹, Н.Н. Сотник¹, Е.В. Сомова¹, А.А. Тищенко¹, В.Ю. Прокопюк²

¹Центр репродукции человека «Клиника проф. Феськова», г. Харьков

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

Ovarian Tissue Vitrification

V.A. Feskov¹, N.N. Sotnik¹, O.V. Somova¹, A.A. Tischenko¹, V.Yu. Prokopuk²

¹Human Reproduction Center 'Clinic of Professor Feskov', Kharkov, Ukraine

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

Причиной потери детородной функции в репродуктивном возрасте являются хирургические вмешательства и гонадотоксическая терапия. Сохранение репродуктивного потенциала молодых женщин – актуальная задача репродуктивной медицины.

Цель исследования – разработать методику витрификации овариальной ткани с последующим контролем ее эффективности на лабораторных животных.

Было витрифицировано 14 фрагментов коркового слоя яичника женщин в возрасте от 21 до 30 лет с нормальным овариальным резервом и диагнозами онкогинекологической патологии. Для витрификации использовались проникающие и непроникающие криопротекторы, белковый заменитель, буферный раствор («Sigma Aldrich», США). Было проведено гистологическое исследование с окраской гематоксилин-эозином до витрификации и после отогрева; культивирование овариальной ткани после размораживания с исследованием уровня эстрадиола в культуральной среде через 24 и 72 ч. Четырех самок кроля с исходным уровнем эстрадиола (40 ± 5) пг/мл, после двухсторонней овариэктомии уровень эстрадиола составил менее 1,5 пг/мл, что стало признаком артифициальной менопаузы. Далее животным была проведена гетеротопическая (в широкую связку матки, брюшину передней брюшной стенки, в карманы подкожно-жировой клетчатки) ксенотрансплантация размо-роженных фрагментов коркового слоя овариальной ткани женщин. Животным проводился мониторинг уровня эстрадиола и прогестерона.

При гистологическом исследовании суммарное количество преантральных фолликулов составило 155, из них 146 фолликулов (93,5%) – нормальной морфологии; 9 (6,5%) – с признаками повреждения (разрыв фолликула, сморщивание ооцита). Характеристики стромы были идентичны образцам до витрификации. Уровень эстрадиола в культуральной среде через 24 и 72 ч составил ($32,4 \pm 5,4$) и ($240,7 \pm 30,5$) пг/мл соответственно. Стабильные показатели эстрадиола у животных установились через 3,5 месяца. Животным была проведена стимуляция роста фолликулов гонадотропинами (25 ЕД в течение 6 дней, 50 ЕД в течение 4 дней, суммарная доза составила 350 ЕД Пурегона). При лапаротомии на брюшине передней брюшной стенки констатируется факт роста фолликулов размерами от 3 до 11 мм. В других местах рост фолликулов не обнаружен.

Таким образом, ксенотрансплантация девитрифицированной овариальной ткани лабораторным животным показала сохранность полноценности фолликулярного аппарата коркового слоя яичника после витрификации.

Surgeries and gonadotoxic therapy during cancer and non-cancer treatment result in loss of fertility in reproductive age. Preservation of fertility potential in young women is an urgent task for reproductive medicine today.

The research objective was to develop the procedure for ovarian tissue vitrification with the subsequent control of its efficiency by xenotransplantation to laboratory animals.

There were vitrified 14 fragments of ovarian cortical layers of women aged of 21 to 30 years with normal ovarian reserve who underwent the surgeries due to oncogynecological pathologies. Penetrating and non-penetrating cryoprotectants, protein substitute, buffer solution (Sigma Aldrich, USA) were used for vitrification. Histological examination using haematoxylin eosin staining was performed before vitrification and after warming; ovarian tissue was cultured after warming and estradiol content was measured in culture medium after 24 and 72 hrs. In 4 female rabbits with baseline estradiol of 40 ± 5 pg/ml; following surgical ovariectomy the estradiol level was less than 1.5 pg/ml, and this was considered as a sign of simulated menopause. Post surgery the animals were heterotopically xenotransplanted with frozen-thawed cortical fragments of women ovarian tissue (to broad ligament of uterus, peritoneum of anterior abdominal wall, and into subcutaneous fat pockets). Hormonal monitoring in animals included assessment of estradiol and progesterone levels.

Total number of preantral follicles assessed histologically was 155: 146 follicles (93.5%) with normal morphology; 9 (6.5%) with signs of damage (rupture of the follicle, oocyte shrinkage). Characteristics of stroma were similar as in ovarian cortical samples before vitrification. Estradiol level in the culture medium after 24 and 72 hrs was (32.4 ± 5.4) and (240.7 ± 30.5) pg/ml, respectively. Stable estradiol indices were found in animals after 3.5 months. Animals underwent a 10-day treatment with Puregon gonadotropin (6 days with 25 IU, 4 days with 50 IU, totally 350 IU). Laparotomy on the peritoneum of anterior abdominal wall revealed the growth of follicles, which were of 3 to 11 mm. No follicle growth was found in other sites of ovarian tissue grafting.

Thus, the xenotransplantation of devitrified ovarian tissue to laboratory animals allowed to preserve the function of follicles survived during ovarian cortical layer vitrification.



Сохранность антагонистической активности свободных и иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков после низкотемпературного хранения

О.М. Бабинец, И.П. Высеканцев, В.Ф. Марценюк

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Preservation of Antagonistic Activity of Free Probiotics and Those Immobilized on Enterosorbents After Low Temperature Storage

O.M. Babinets, I.P. Vysekantsev, V.F. Martsenyuk

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Микрофлора желудочно-кишечного тракта (микробиота) представляет собой сложную экологическую систему, поддерживающую гомеостаз организма человека. Микробиота выполняет ряд важных функций: дигестивную, детоксикационную, антианемическую, иммунную, колонизационную резистентность, синтез витаминов различных групп. Защитные функции микробиоты во многом зависят от ее антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Антагонистическая активность большинства микроорганизмов-пробиотиков зависит от способности синтезировать молочную кислоту и различные бактериоцины. В синтезе бактериоцинов задействованы разные механизмы, поэтому антагонистическая активность является одним из кардинальных пробиотических свойств. В настоящее время интенсивно разрабатывают препараты иммобилизованных синбиотиков, для долгосрочного хранения которых применяют низкие температуры.

Целью исследования являлось изучение антагонистической активности комплексов «носитель-клетки» после хранения при температурах 4, -20, -80 и -196°C. Объектами исследования были дрожжи *Saccharomyces boulardii*, бактерии *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 и *Lactobacillus bulgaricus* 1ZO3501, иммобилизованные на энтеросорбентах «Сорбекс» и «СУМС-1». Антагонистическую активность изучали методом двухслойного агара с определением минимальной ингибирующей концентрации антагониста (МИКА). Тест-культурами были бактерии семейства Enterobacteriaceae, стафилококки, стрептококки, листерии, клостридии, кандиды. Контролем служили суспензии свободных пробиотиков, суспендированных в растворе 5% сахарозы.

Было установлено, что после хранения при указанных температурах в течение года (срок наблюдения) гибель свободных клеток и комплексов при 4 и -20°C происходила на протяжении всего срока хранения, а после хранения при температурах -80, -196°C – на этапах охлаждения-отогрева. Спектр и интенсивность антагонистической активности свободных и иммобилизованных пробиотиков сохранялись при всех использованных температурных режимах.

Microflora of gastrointestinal tract (microbiota) is a complex ecological system, maintaining human organism homeostasis. Microbiota accomplishes some important functions such as digestive, detoxication, anti-anemic, immune, colonization resistance, synthesis of vitamins of different groups. Protective functions of microbiota largely depend on its antagonistic activity against pathogenic and opportunistic pathogenic microorganisms. Antagonistic activity of the majority of probiotic microorganisms depends on the ability to synthesize lactic acid and different bacteriocins. The synthesis of bacteriocins involves different mechanisms, therefore an antagonistic activity is one of the basic probiotic properties. Currently there are intensively developed the preparations of immobilized synbiotics, for long-term storage of which one applies low temperatures.

This research aim was to investigate the antagonistic activity of carrier-cells complexes after storage at 4, -20, -80 and -196°C. The research objects were the yeast *Saccharomyces boulardii*, bacteria *Bifidobacterium bifidum* LVA-3 and *Lactobacillus bulgaricus* 1ZO3501, immobilized on enterosorbents Sorbex and SUMS-1. Antagonistic activity was studied using a double-layer agar method with determination of minimum inhibiting concentration of antagonist (MICA). Bacteria of *Enterobacteriaceae* family, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Candida* were the test cultures. The suspensions of free probiotics in 5% sucrose solution served as the control.

It was established that after storage at the mentioned temperatures for 1 year (observation period) the death of free cells and complexes at 4 and -20°C occurred during the whole storage period, but after storage at -80, -196°C it was at cooling-thawing stages. The spectrum and intensity of antagonistic activity of free and immobilized probiotics were kept at all used temperature regimens.



Исследование скорости деградации альгинатных имплантатов в миокарде крыс

Т.В. Шканд¹, А.Л. Татарец²

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

²ГНУ «НТК Институт монокристаллов НАН Украины», г. Харьков

Analysis of Alginate Implants Degradation Rate in Rat Myocardium

T.V. Shkand¹, A.L. Tatarets²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

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

В структуре ишемической болезни сердца летальность от острого инфаркта миокарда занимает первое место. Новым подходом в терапии инфаркта миокарда является введение имплантатов в виде биodeградируемых полимеров, способных предотвращать развитие аневризмы сердца в постинфарктный период [J. Leor, 2007]. Биodeградируемые имплантаты, насыщенные лекарственными веществами, позволяют совместить механические функции имплантата с терапевтическим эффектом препаратов, диффузно проникающих из полимеров в зону поражения.

Цель работы – изучение динамики деградации альгинатных имплантатов в миокарде крыс.

Материалы и методы. Настоящая работа посвящена исследованию деструкции имплантатов в сердечной мышце. Объектом наших исследований являлись имплантаты на основе гелей солей альгиновой кислоты. Ранее нами изучалась динамика экстракции из гелевых имплантатов биологически активных полипептидов, меченных ковалентно связанным флуорофором [патент UA № 86783].

Работу выполняли на 27 крысах-самцах массой 200–270 г. Гель альгината натрия ковалентно связывали с флуоресцентным красителем K8-3002 («SETA Biomedicals LLC», США). Экспериментальным животным под масочным наркозом проводили торакотомию с последующим инъекционным введением в миокард со стороны перикарда флуоресцирующего геля. Динамику деградации имплантатов оценивали методом контактной люминесцентной микроскопии с помощью микроскопа «Люмам К-1», снабженного средствами видеорегистрации. Исследования проводили через 20 мин после введения геля, а также через 1, 3, 7, 14 и 21 сутки после операции. Результаты исследования обработаны с помощью программы «Bio Vision 4.0».

Результаты исследования. Применяемая методика дала возможность наблюдать яркую флуоресценцию исследуемого геля на темном фоне сердечной мышцы. Фрагментация гелевого имплантата на несколько крупных вакуолей происходила к 3-м суткам, в последующие сроки наблюдения размеры вакуолей значительно уменьшались. К 21-м суткам в миокарде отмечалось точечное свечение остатков геля, напоминающее «звездное небо».

Выводы. Установлено, что с течением времени в сердечной мышце происходит постепенная фрагментация гелевого имплантата, полная деградация наступала к 21-м суткам после его введения в миокард. Введение и последующая деструкция гелевого имплантата не вызывали значительных изменений в архитектонике сердца крыс.

Ischemic heart disease is characterized by a high lethality because of acute myocardium infarction. A new approach in therapy of myocardium infarction is the administration of implants in form of biodegradable polymers capable to prevent the development of cardiac aneurism during post-infarction period [Leor J., 2007]. Biodegradable implants enriched with the drugs allow to combine the mechanical functions of implant with a therapeutic effect of the preparations diffusively penetrating from polymers into the damaged area.

The research objective was to study the degradation dynamics of alginate implants in rat myocardium.

Materials and methods. This study was concerned with evaluation of destruction rate of the implants in cardiac muscle. The research objects were the alginic acid salt gel based implants. Previously we studied the dynamics of extraction of biologically active polypeptides labeled with covalently bound fluorophore from gel implants [patent UA N86783].

The study was carried out in 27 male rats of 200–270 g weight. Sodium alginate gel was covalently bound with fluorescent dye K8-3002 (SETA Biomedicals LLC, USA). Thoracotomy with the following injection of fluorescent gel into myocardium from the pericardium side was done to the experimental animals under mask anaesthesia. Dynamics of implants degradation was assessed by contact luminescent microscopy using microscope Lumam K-1 equipped by video recording device. The studies were carried out in 20 min after gel administration as well as in 1, 3, 7, 14 and 21 days post surgery. The research results were processed with Bio Vision 4.0 software.

Results of research. The used technique allowed observing a bright fluorescence of the studied gel on a dark background of cardiac muscle. Fragmentation of gel implant into several large sections occurred to day 3, in the next observation terms the size of fragments significantly decreased. To day 21 we noted in myocardium a 'star sky' like dotted luminescence of the gel residues.

Conclusion. We have found that gel implant in cardiac muscle underwent a gradual fragmentation, and an entire degradation proceeds to day 21 after its introduction into myocardium. The introduction and following destruction of gel implant caused no significant changes in architectonics of rat heart.



Импульсная кондуктометрия как экспресс-тест для оценки состояния 2-клеточных эмбрионов мыши

О.А. Стриха

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Impulse Conductometry as the Express-Test to Estimate the State of 2-Cell Murine Embryos

O.A. Strikha

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

В настоящее время метод витрификации для криоконсервирования гамет и ранних эмбрионов млекопитающих является самым распространенным в вспомогательных репродуктивных технологиях [A. Cobo, 2012; S. Dovey, 2012; R. Gosden, 2013]. Наиболее информативный способ определения жизнеспособности деконсервированных эмбрионов – оценка их способности развиваться в условиях *in vivo* или *in vitro* – чрезвычайно трудоемкий и дорогой. В связи с этим актуальна разработка тестов для экспресс-диагностики состояния клеток на основе измерения отдельных клеточных параметров.

Цель работы – исследование влияния продолжительности экспозиции 2-клеточных эмбрионов мышей и криоконсервирования этих клеток методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на их электрическую проводимость.

Объектом исследования служили 2-клеточные эмбрионы мышей F1 (C57Bl×CBA) возрастом 6–8 недель. Для стимуляции суперовуляции самок мышей подвергали гормональной обработке путем введения гонадотропина сыворотки жеребых кобыл («Folligon», Нидерланды) и человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) («Chorulon», Нидерланды). Самок после введения чХГ подсаживали к самцам для осеменения. Через 46–48 ч после введения чХГ самок выводили из эксперимента. Эмбрионы на стадии двух бластомеров получали по стандартной методике [М. Манк, 1990]. В работе использовали протокол криоконсервирования методом витрификации, описанный ранее [В.В. Исаченко, 1994; А.С. Кривохарченко, 1995; Е.И. Смольянинова, 2007]. Эмбрионы были разделены на пять групп: контрольную и четыре экспериментальные. В первой серии экспериментов исследовали влияние кратковременной экспозиции 2-клеточных эмбрионов мыши в криозащитной среде на их электрическую проводимость. Во второй серии – влияние цикла низкотемпературного консервирования 2-клеточных эмбрионов мыши на их электрическую проводимость.

Показано, что после экспозиции эмбрионов в среде для криоконсервирования значения их электрической проводимости увеличиваются по сравнению с контрольными значениями ($(2,24 \pm 0,64) \div (3,86 \pm 0,68) \times 10^{-3}$ и $(1,54 \pm 0,11) \div (6,12 \pm 0,34) \times 10^{-3}$ См/м соответственно). Увеличение времени экспозиции с 1,5 до 3 мин снижает устойчивость плазматических мембран эмбрионов к действию импульсного электрического поля. Этап замораживания-оттаивания не оказывает существенного влияния на численные значения электрической проводимости эмбрионов мыши. Проведенные исследования показали, что электрическая проводимость может быть чувствительным диагностическим клеточным параметром, отражающим нарушения морфофункциональной целостности клеток на различных этапах низкотемпературного воздействия.

Nowadays, the application of vitrification to cryopreserve mammalian gametes and early embryos is one of the most widespread method in the assisted reproductive technologies [A. Cobo, 2012; S. Dovey, 2012; R. Gosden, 2013]. The most informative way to determine the viability of frozen-thawed embryos is the assessment of their capability to develop *in vivo* or *in vitro*. However, these criteria are very time-consuming and expensive. The problem of developing the tests for express diagnostics of cell state in terms of individual cell parameters measuring is still important.

The aim of this study was to investigate the effect of duration of two-cell murine embryos exposure and cryopreservation of these cells using vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on their electric conductivity.

Experiments were performed in 2-cell embryos of 6–8 week-old F1 (C57Bl×CBA) mice. Superovulation was stimulated by hormonal treatment: injection of pregnant mare serum gonadotropin (Folligon, Netherlands) and human chorionic gonadotropin (HCG) (Chorulon, Netherlands). After HCG administration the females were transferred to males for insemination. Females were sacrificed by means of cervical dislocation 46–48 hrs post HCG administration. Two cell embryos were isolated using the standard method [M. Mank, 1990].

In the present study we used the cryopreservation protocol based on vitrification method described previously [V.V. Isachenko, 1994; A.S. Krivokharchenko, 1995; E.I. Smolyaninova, 2007]. Embryos were divided into five groups: the control and four experimental groups. First series of experiments were targeted to elucidate the effect of duration of exposure in solution of cryoprotectants and vitrification medium on electric conductivity in the murine embryo. In the second series we investigated the effect of complete cycle of low temperature preservation of two-cell murine embryos on their electric conductivity.

It has been shown that embryo exposure in cryopreservation medium led to an increase in their electric conductivity values in comparison with the control ones ($(2.24 \pm 0.64) \div (3.86 \pm 0.68) \times 10^{-3}$ and $(1.54 \pm 0.11) \div (6.12 \pm 0.34) \times 10^{-3}$ S/m, respectively). Extension of exposure time from 1.5 min to 3 min led to a decrease in embryo plasma membrane resistance to impulse electric field action. Freeze-thawing step did not additionally affect the values of the electric conductivity of 2-cell murine embryos. Electric conductivity could be a sensitive diagnostic parameter for the cell, reflecting the impairments in morphological integrity of the cells at different stages of low temperature exposure.



Инфекционная активность промышленных штаммов вируса бешенства после хранения при температурах -20 , -80°C

В.В. Буркова^{1,2}, О.В. Пишко¹

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

²ПАТ «Фармстандарт-Біолік», г. Харьков

Infectious Activity of Industrial Strains of Rabies Virus after Storage at -20 , -80°C

V.V. Burkova^{1,2}, O.V. Pishko¹

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

²PJSC Farmstandard-Biolik, Kharkov, Ukraine

Технологии долгосрочного хранения вирусов имеют большое значение как для научных разработок, так и для биотехнологических производств иммунобиологических вирусных препаратов. В соответствии с требованиями ВОЗ хранение эталонных и промышленных штаммов вирусов должно обеспечивать сохранность биологических и антигенных свойств генома, иммуногенной потенции вирусов. Используемые методы хранения должны исключать пассажи вирусов. В мировой практике в коллекциях вирусов наиболее эффективными являются криоконсервирование и хранение лиофилизированных образцов вирусов при низких температурах. Однако в условиях производств зачастую отсутствует криогенное оборудование, а лиофилизированные образцы необходимо дополнительно пассировать после регидратации. Наиболее часто для хранения стартовых культур вирусов используют стандартное холодильное оборудование.

Целью исследования было изучение инфекционной активности промышленных штаммов вируса бешенства после хранения в холодильных камерах при -20 и -80°C .

Объектами исследования были промышленные штаммы вируса бешенства CVS-11 (Challenge standart virus) и «Москва 3253», которые используют при производстве антирабической вакцины и специфического гетерологичного иммуноглобулина для профилактики и лечения бешенства. Сохранность вирусов оценивали по инфекционной активности (по логарифму фокус-формирующей инфицирующей дозы lg FFU $50/\text{cm}^2$). Инфекционную активность определяли на перевиваемых клеточных культурах Neuro-2a (клетки нейробластомы мыши) и ВНК-21 (клетки новорожденного сирийского хомячка).

Установлено, что при температуре -80°C оба штамма вируса после хранения в течение 1,5–14 месяцев не изменяли свою инфекционную активность по отношению к контролю (кратковременное замораживание до -80°C). В образцах, которые хранили при -20°C , инфекционная активность вирусов снижалась как на этапе охлаждения, так и при последующем хранении.

The technologies for long term storage of viruses are of great importance both for scientific research and biotechnological production of immunobiological viral preparations. In accordance with the WHO requirements the storage of reference and industrial strains of viruses should ensure the integrity of biological and antigenic properties of genome, immunogenic potency of viruses. The used storage methods should exclude the passages of viruses. In world practice of the virus collections the cryopreservation and storage of freeze-dried virus samples at low temperatures are the most efficient. However, during commercial production using of cryogenic equipment is often complicated, and the frozen-dried samples have to be additionally passaged after rehydration. The standard refrigeration equipment is most frequently used to store the starter cultures of viruses.

The research aim was to study an infectious activity of industrial strains of rabies virus after storage in refrigerator chambers at -20 and -80°C .

The research objects were the industrial strains of rabies virus CVS-11 (challenge virus standard) and Moscow 3253, used to produce the rabies vaccine and a specific heterologous immunoglobulin for rabies prevention and therapy. The preservation of viruses was attested by infectious activity (the logarithm of focus forming infecting dose lg FFU $50/\text{cm}^2$). Infectious activity was determined in recultured cell cultures of Neuro-2a (mouse neuroblastoma cells) and BHK-21 (newborn golden hamster cells).

Both virus strains after storage for 1.5–14 months at -80°C were established as not changing their infectious activity towards the control (short freezing down to -80°C). In the samples stored at -20°C the infectious activity of viruses decreased both during cooling and following storage.



Девитализированные ксеногенные артерии – опыт трансплантации

Е.В. Шевченко, А.А. Горленко, Д.В. Бызов

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Devitalized Xenogenic Arteries: Transplantation Experience

E.V. Shevchenko, A.A. Gorlenko, D.V. Byzov

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Одним из основных направлений тканевой инженерии остается разработка сосудистых протезов малого диаметра (≤ 6 мм). Вследствие наличия сопутствующих хронических заболеваний, травматичности получения и ограниченного количества подходящих для трансплантации аутологичных сосудов графты на основе ксеногенных артерий являются перспективной альтернативой существующим протезам.

Цель данного исследования – изучение изменений системы свертываемости крови и проходимости кровеносного русла после выполнения трансплантации ксенопротеза экспериментальным животным.

В работе использовались внутренние грудные артерии половозрелых свиной, подвергавшиеся криообработке и облучению потоком электронов в дозе 25 кГр. Эксперимент был выполнен на 2 овцах породы Меринос массой 29 и 32 кг. Под внутривенным наркозом после обработки операционного поля в области шеи справа выполнялся разрез в проекции правой яремной вены. После разъединения соединительнотканых перемычек яремная вена была сдвинута в медиальном направлении, грудино-ключично-сосцевидная мышца – в латеральном. Сонная артерия отделялась от находящегося рядом блуждающего нерва, скелетизировалась на протяжении 7–8 см. Интраоперационно выполнялось УЗИ для контроля проходимости сосудистого протеза. Подкожно был введен гепарин из расчета 100 ед/кг для предупреждения тромбообразования. Сонная артерия была клипирована двумя атравматичными сосудистыми клипсами. Иссечен участок сонной артерии длиной 1 см. Край пересеченной артерии освобождались от излишков адвентиции. Выбран подходящий по диаметру сосудистый протез. Длина протеза составляла 5 см. Между сонной артерией и сосудистым протезом накладывался анастомоз конец в конец узловыми швами по методике Карреля с применением атравматического нерассасывающегося шовного материала («Prolene 7-0», «Ethicon», США), начиная с дистального участка.

За день до операции, через 1, 2 недели и 1,5 месяца были взяты пробы крови для получения коагулограммы. В послеоперационном периоде выполняли УЗИ-контроль. В образцах, взятых через неделю после трансплантации, отмечалось увеличение протромбинового времени и АЧТВ. Остальные образцы соответствовали норме. Это может быть связано с единократным приемом гепарина в послеоперационном периоде. Отсутствие тромбозов, стенозов и реакции отторжения сосудистых трансплантатов на всех этапах наблюдения было подтверждено данными УЗИ. Скорость кровотока в трансплантированном участке, а также выше и ниже его соответствовала норме.

Таким образом, была подтверждена состоятельность сосудистых протезов у экспериментальных животных сроком до 2 месяцев после операции.

One of the main directions in tissue engineering is the creation of small-diameter vascular prostheses (≤ 6 mm). Due to the presence of concomitant chronic diseases, trauma and a limited number of suitable autologous vascular prostheses, the creation of xenogenic vascular grafts is a promising alternative to existing methods.

The purpose of this study was to investigate the changes in blood clotting and blood stream patency after xenogenic transplantation to experimental animals.

The study was performed with the internal mammary arteries of adult pigs that were exposed to cryotreatment and electron irradiation in 25 kGy dose. The experiment was performed in two Merinos sheep weighted 29 and 32 kg. Animals were intravenously anesthetized, surgical field was treated, and the incision was performed in the projection of the right jugular vein. After separation of connective tissue, jugular vein was skelitized and gently shifted medially, sternocleidomastoid muscle was laterally done. Carotid artery was neatly separated from the right vagus nerve, then skelitized along the length of 7–8 cm. Intraoperative ultrasound investigation was performed to control a graft patency. Heparin was introduced subcutaneously in 100 IU/kg dosage for the prevention of thrombus formation. Carotid artery was clipped with two atraumatic vascular clips. Portion of the carotid artery of approximately 1 cm was excised. Edges of the carotid artery were released of excess adventitia. The vascular prosthesis of appropriate diameter was selected. The length of the prosthesis was 4.5 cm. Between the carotid artery and the vascular prosthesis end-to-end anastomosis was applied with interrupted sutures by Carrel technique using atraumatic non-degradable suture (Prolene 7-0, Ethicon, USA), starting from the distal segment.

The day before surgery, and 1, 2 weeks and 1.5 months after, blood sampling was taken for coagulation test. Ultrasound investigation was performed during post-surgery period. There was an increase in prothrombin time and activated partial thromboplastin time in the samples taken 1 week after transplantation. The remaining samples were normal. This may be due to one-time intake of heparin in the post-surgical period. Ultrasound study confirmed the absence of thrombosis, stenosis and vascular graft rejection at all the stages of observation. The speed of blood flow in the transplanted site, as well as above and below it was at the adequate rate.

Thus the validity of the vascular prosthesis in experimental animals for up to two months after surgery was confirmed.



Криорезистентность спермы белого толстолобика после стимуляции широкоиспользуемыми гормональными препаратами

К.И. Буцкий, А.Ю. Пуговкин

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryoresistance of Silver Carp Sperm after Stimulation by Widely Used Hormonal Preparations

K.I. Butskiy, A.Yu. Puhovkin

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

Важной задачей криобиологии является усовершенствование имеющихся способов криоконсервирования спермы рыб. Для воздействия низких температур важно качество нативной спермы. Создание условий, благоприятных для размножения рыб – сложная проблема, поэтому большое значение имеет выбор оптимального типа гормональной стимуляции завершающего этапа гаметогенеза.

Цель данной работы – сравнить влияние различной гормональной стимуляции на концентрацию АТФ в сперме и ее криорезистентность.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на самцах белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*). Для инъекций использовали препараты, которые применяются для стимуляции созревания сперматозоидов на рыбных хозяйствах: 2,5 мг/кг суспензии гипофиза сазана; 1 мкг/кг «Сурфагона» («МосАгроГен», Россия) – синтетического аналога гонадотропин-рилизинг-гормона млекопитающих; 1 мкг/кг «Сурфагона» с 5 мг/кг «Метоклопрамида» – блокатора дофаминовых рецепторов; 0,5 гранулы/кг коммерческого препарата «Овопель» (Венгрия). Определение АТФ проводили ферментативным методом с преобразованием НАДН в НАДФН в системе соединенных ферментативных реакций. Криоконсервирование осуществлялось по стандартной методике для спермы карповых [Е.Ф. Копейка, 1986].

Результаты. В результате проведенных экспериментов получены следующие уровни подвижности до и после криоконсервирования: (80 ± 17) и $(33 \pm 10)\%$ при стимуляции гипофизом, (53 ± 27) и $(32 \pm 15)\%$ для стимуляции смесью «Сурфагона» с «Метоклопрамидом», после инъекции препарата «Овопель» (85 ± 13) и $(30 \pm 15)\%$. Самцы с инъекциями «Сурфагона» не созрели. Время подвижности сперматозоидов не имело значимых различий и составляло ~45 с. Показано, что сперма с наибольшим уровнем подвижных клеток получена после стимуляции гормональным препаратом «Овопель». Хотя после стимуляции самцов смесью «Сурфагона» с «Метоклопрамидом» полученные сперматозоиды имели меньший уровень подвижности, качество криоконсервированной спермы белого толстолобика не имело значимых различий. Это свидетельствует о большей криорезистентности спермы после стимуляции смесью «Сурфагона» с «Метоклопрамидом». Поскольку энергетические характеристики связаны с криорезистентностью [Е.Ф. Копейка, 1997], для объяснения различий проведено исследование концентрации АТФ в нативной сперме толстолобика: после стимуляции смесью «Сурфагона» с «Метоклопрамидом» наблюдается почти вдвое больший уровень АТФ.

An important issue of cryobiology is to improve the available methods for fish sperm cryopreservation. Fresh sperm quality is very important for low temperature exposure. Establishing favorable conditions for fish breeding may be difficult task, so of great importance is to select the optimal hormonal stimulation type of the final gametogenesis stage.

The aim of this work was to compare the effect of different hormonal stimulation on the ATP concentration in sperm and its cryoresistance.

Materials and methods. Experiments were performed in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) males. For injections we used the following preparations applied to stimulate the spermatozoa maturation in fish farms: 2.5 mg/kg of carp pituitary suspension; 1 µg/kg Surfagon (MosAgroGen, Russia) – a synthetic analogue of gonadotropin-releasing hormone for mammals; 1 µg/kg Surfagon and 5 µg/kg Metoclopramide – dopamine receptor blocker; 0.5 granules/kg of commercial drug Ovopel (Hungary). ATP was determined by enzymatic method assessing the transformation of NADH into NADPH in the system of coupled enzymatic reactions. Cryopreservation was made by the standard method for carp sperm [E.F. Kopeika, 1986].

Results. The experiments showed the following levels of motility before and after cryopreservation, correspondingly: (80 ± 17) and $(33 \pm 10)\%$ in case of stimulation with pituitary gland; (53 ± 27) and $(32 \pm 15)\%$ for stimulation with a mixture of Surfagon and Metoclopramide; and after Ovopel injection the indices were (85 ± 13) and $(30 \pm 15)\%$; the males who received Surfagon had no sperm generated. Motility time had no significant differences and was ~45 s. It was shown that sperm with the highest level of motile cells was obtained after stimulation with hormonal drug Ovopel. Although after stimulating males with a mixture of Surfagon and Metoclopramide the procured spermatozoa had lower level of motility, the quality of cryopreserved silver carp sperm in all samples had no significant differences. This indicated a higher cryoresistance of sperm after stimulation with a mixture of Surfagon and Metoclopramide.

As the energy characteristics are associated with the cryoresistance [E.F. Kopeika, 1997], in order to explain the differences we investigated the ATP concentration in fresh sperm of silver carp: almost twice higher ATP level was noted after stimulation with Surfagon and Metoclopramide mixture.



Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (*Acipenser ruthenus* L) и карпа (*Cyprinus carpio* L)

А.Ю. Пуговкин, К.И. Буцкий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Spermatozoa Membrane Permeability in Sterlet (*Acipenser ruthenus* L) and Carp (*Cyprinus carpio* L)

A.Y. Puhovkin, K.I. Butskiy

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

Задачей исследования было сравнение проницаемости мембран сперматозоидов стерляди и карпа для молекул воды.

Материалы и методы. Самцов стерляди содержали в бассейне с температурой воды 15°C. Сперму получали через 24 ч после гормональной стимуляции препаратом «Нерестин-5а» («А-БИО», Россия). Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды (L_p) определяли фотометрическим способом [А.Ю. Пуговкин и соавт., 2014].

Результаты. Ранее сообщалось, что на протяжении периода движения сперматозоидов стерляди их клеточный объем не изменяется [О. Bondarenko *et al.*, 2013]. На основании этого авторами предполагалось, что мембраны сперматозоидов практически не имеют аквапоринов и вода медленно проникает через мембрану путем диффузии. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют в пользу того, что в гипотонических условиях происходит увеличение объема сперматозоидов стерляди за счет проникающих внутрь молекул воды, что позволяет определить проницаемость мембран сперматозоидов фотометрическим способом. Получена зависимость L_p от температуры среды инкубации в интервале 10...30°C. При 20°C L_p составляет около 0,3 мкм/(атм×мин), тогда как для сперматозоидов карпа $L_p = 0,17$ мкм/(атм×мин) [А.Ю. Пуговкин и соавт., 2014].

По всей видимости, относительное изменение объема сперматозоидов стерляди меньше, чем сперматозоидов карпа в идентичных условиях, однако время установления равновесного значения объема выше, что говорит о более высокой проницаемости для молекул воды. Учитывая, что выживаемость сперматозоидов карпа после криоконсервирования обычно не превышает 40–60%, в то время как эффективность криоконсервирования спермы стерляди достигает 100%, можно предположить, что проницаемость мембран – одна из причин, определяющих криоустойчивость сперматозоидов рыб.

Показано, что кратковременная экспозиция сперматозоидов карпа в гипотонической среде перед добавлением криозащитной среды увеличивает эффективность криоконсервирования за счет повышения проницаемости мембран сперматозоидов [В.В. Dzyuba *et al.*, 2013]. В работах Е.Н. Пономаревой и соавт. (2009) для повышения проницаемости мембран применялся метод электростимуляции, что также приводило к увеличению выживаемости сперматозоидов.

Выводы. Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды выше по сравнению с данным показателем карповых рыб, что, вероятно, является одной из причин их более высокой выживаемости после криоконсервирования.

The aim of the study was to compare the membrane permeability of sterlet and carp spermatozoa for water molecules.

Materials and methods. Sterlet males were kept in the tank with 15°C water. Sperm was obtained in 24 hours after hormonal stimulation with Nerestin-5a (A-BIO, Russia). Membrane permeability of sterlet spermatozoa for water molecules (L_p) was determined photometrically [A. Yu. Puhovkin *et al.*, 2014].

Results. It was previously reported, that during the period of sterlet spermatozoa movement their cell volume remained unchanged [O. Bondarenko *et al.*, 2013]. On this basis the authors suggested that spermatozoa membranes had virtually no aquaporins and water slowly penetrated through the membrane *via* diffusion. The results of our study show that cell volume of sterlet spermatozoa increases due to penetrating of water molecules into the cell in hypotonic conditions, which allows determining the spermatozoa membrane permeability photometrically. The dependence of L_p vs. the temperature of incubation medium within the range of 10... 30°C was obtained. At 20°C the L_p was about 0.3 $\mu\text{m}/(\text{atm}\times\text{min})$, whereas for carp spermatozoa $L_p = 0.17$ $\mu\text{m}/(\text{atm}\times\text{min})$ [A. Yu. Puhovkin *et al.*, 2014].

A relative change in sterlet spermatozoa volume was apparently less than for carp ones under identical conditions, however, the volume equilibration time was higher, that pointed to a higher permeability for water molecules. Considering that carp spermatozoa survival after cryopreservation usually does not exceed 40–60%, while the efficiency of sterlet sperm cryopreservation reaches 100%, it can be assumed that the membrane permeability is one of the factors that influences the fish sperm cryoresistance.

It was shown that a short-term exposure of carp spermatozoa in hypotonic medium before adding cryoprotective medium increased the efficiency of cryopreservation by augmenting membrane permeability of spermatozoa [В.В. Dzyuba *et al.*, 2013]. Е.Н. Ponomareva *et al.* (2009) reported the application of electrical stimulation to increase the permeability of membranes.

Conclusions. Membrane permeability of sterlet spermatozoa for water molecules is higher than respective membrane permeability of carp spermatozoa, that is probably one of the reasons of their higher survival after cryopreservation



Изучение биологических свойств деконсервированных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в составе альгинатных гранул

В.Л. Пономарева, И.П. Высеканцев, Е.С. Онасенко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Biological Features of Frozen-Thawed *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells Incapsulated in Alginate Granules

V.L. Ponomareva, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenکو

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

Целью исследования было изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность и функциональную активность иммобилизованных в альгинатных гранулах клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Разработан эффективный метод криоконсервирования, позволяющий достичь высокую степень сохранности клеток дрожжей без использования криопротекторов. При иммобилизации в гранулы альгината натрия и экспериментально выбранном режиме охлаждения (со скоростью 1 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот) наблюдается почти 100%-я жизнеспособность клеток. Проведена оценка ферментативной и пролиферативной активности свободных и иммобилизованных клеток.

Для изучения ферментативной активности дрожжей после замораживания определяли подъемную силу, зимазную, мальтазную активность и общую бродильную способность клеток во время роста. Установлено, что указанные условия криоконсервирования не влияют на генетически детерминированный спектр сахаролитических свойств дрожжей. Газообразование регистрировалось во всех исследуемых образцах, однако в образцах со свободными клетками после замораживания отмечали более выраженное снижение функциональной активности и обратимое ингибирование процессов метаболизма. Это свидетельствует о большем количестве нелетальных повреждений в свободных клетках на этапах охлаждения-оттаивания. После криоконсервирования иммобилизованные в альгинатные гранулы клетки быстрее восстанавливали пролиферативную и метаболическую активность по сравнению со свободными клетками в суспензии.

В ходе исследования дыхательной активности клеток методом ЭПР было установлено, что в процессе криоконсервирования в свободных жизнеспособных клетках развиваются нелетальные повреждения в энергопреобразующих органеллах. Степень ингибирования восстановления спинового зонда и соответственно активность дыхательной цепи митохондрий в образцах иммобилизованных клеток после криоконсервирования значительно не отличались от аналогичных показателей нативных клеток.

Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что стрессовая реакция клетки, инициируемая процессом иммобилизации, сопровождается повышением генерации активных форм кислорода. Мы полагаем, что энергия, освобождаемая при многочисленных реакциях рекомбинации радикалов в результате их превращений в устойчивые молекулы, используется клеткой для активации репаративных процессов и быстрого восстановления метаболической активности деконсервированных клеток. Метаболическая и митохондриальная активность иммобилизованных клеток может быть одной из причин высокой степени сохранности их в процессе криоконсервирования.

The research was targeted to study the influence of cryopreservation conditions on the viability and functional activity of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in alginate granules. There was developed an efficient method of cryopreservation, enabling to achieve a high preservation degree in yeast cells without use of traditional cryoprotectant. Following immobilization into sodium alginate granules, and performing cooling by experimentally selected regimen (with 10 deg/min rate down to -40°C , and further immersion into liquid nitrogen) we observed almost 100% cell viability. The enzymatic and proliferative activities of free and immobilized cells were assessed.

In order to study the yeast enzymatic activity after freezing we determined an elevating power, zymase and maltase activities, and total fermentation ability of cells during growth. The obtained results of cryopreservation showed no effect on genetically determined range of yeast saccharolytic properties. The gas production was found in all the samples under study. However, in samples with free cells we noted more pronounced reduction in functional activity and reversible inhibition of metabolic processes after freezing. This testified to a greater number of non-lethal injuries in free cells at freeze-thawing stages. After cryopreservation the cells immobilized into alginate granules recovered their proliferative and metabolic activities more rapidly than free cells in suspension.

When studying a respiratory activity of cells by EPR method we established the development of non-lethal damages in energy producing organelles in free viable cells during cryopreservation. The inhibition degree of spin probe reduction, as well as the activity of mitochondrial respiratory chain in the samples of immobilized cells after cryopreservation did not differ significantly from similar indices for native cells. Using flow cytometry we established the stress response of cell initiated by immobilization process to be accompanied by an increased AOS generation. We believe that the energy, released in numerous radical recombination reactions as a result of their transformation into stable molecules is used by cell to activate reparative processes and a rapid recovery of metabolic activity of frozen-thawed cells. Metabolic and mitochondrial activity of immobilized cells may be one of the reasons of their high survival after cryopreservation.



Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на метаболизм аденилатов в клетках лейкоконцентрата после криоконсервирования

Ю.С. Ахатова¹, А.А. Сысоев², И.В. Сысоева², А.К. Гулевский¹

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

²Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

Effect of Cord Blood Low Molecular Fraction on Adenylate Metabolism in Leukoconcentrate Cells after Cryopreservation

Yu.S. Akhatova¹, A.A. Sysoyev², I.V. Sysoyeva², A.K. Gulevsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Biology of Southern Seas

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Ukraine

Ранее нами было показано, что низкомолекулярная фракция кордовой крови (ФКК) до 5 кДа в составе реабилитирующей среды оказывает выраженное стимулирующее действие на функциональную активность лейкоцитов крови человека после криоконсервирования, а также способствует накоплению глюкозы клетками деконсервированного лейкоконцентрата [А.К. Гулевский и др., 2011–2013]. Мы предположили, что механизм действия ФКК направлен на энергетический обмен клеток и в связи с этим было исследовано влияние ФКК на аденилатную систему нативных и деконсервированных клеток лейкоконцентрата.

Объект исследования – лейкоконцентрат донорской крови человека (ЛКЧ), полученный седиментационным методом [Гришина В.В., 2004]. Для криоконсервирования ЛКЧ использовали режим медленного охлаждения под защитой 5% диметилацетамида (ДМАц) [В.А. Аграненко и др., 1986]. Содержание аденилатов (АТФ, АДФ и АМФ) в клетках оценивали с помощью хемилюминесцентного анализа. Фракцию из кордовой крови крупного рогатого скота выделяли методом ультрафильтрации. Ультрафильтрат лиофилизировали и хранили при -80°C . В среду инкубации ФКК вносили в количестве 0,15 мг/мл.

Установлено, что после криоконсервирования ЛКЧ энергетический статус клеток существенно ухудшался. Так, аденилатный пул клеток ЛКЧ уменьшался на 42,7% по сравнению с контролем. Содержание АТФ в нативном ЛКЧ составляло $(23,42 \pm 2,9)$ нмоль/мг белка, после криоконсервирования данный показатель значительно снижался в 2,6 раза и составлял $(8,9 \pm 0,93)$ нмоль/мг белка. При этом после инкубации в среде с ФКК происходило значимое увеличение концентрации АТФ в 1,34 раза по сравнению с контролем. Содержание АДФ в клетках деконсервированного ЛКЧ не изменялось, однако инкубация с ФКК способствовала повышению его количества в 2 раза по сравнению с контролем. Такой эффект, безусловно, следует считать положительным, так как увеличение количества АДФ в клетке является сигналом для синтеза АТФ. Криоконсервирование ЛКЧ не приводило к значимому изменению содержания АМФ. Однако после реабилитации ЛКЧ в среде с ФКК наблюдалось повышение концентрации АМФ в 2 раза по сравнению с контролем. По-видимому, такой эффект ФКК связан с синтезом АМФ *de novo*, что подтверждается стимулирующим действием ФКК на общий аденилатный пул деконсервированных клеток.

Таким образом, ФКК способствует повышению аденилатного пула клеток ЛКЧ до и после криоконсервирования, что выражается в увеличении содержания АТФ, АДФ и АМФ.

We have previously shown that the low molecular cord blood fraction (CBF) (below 5 kDa) as a part of rehabilitating medium has a strong stimulating effect on functional activity of human blood leukocytes after cryopreservation, as well as contributes to glucose accumulation by cells of frozen-thawed leukoconcentrate [A.K. Gulevsky *et al.*, 2011–2013]. Therefore, we hypothesized the mechanism of CBF action as targeted to an energy metabolism of cells and we investigated CBF effect on adenylate system of native and frozen-thawed cells of leukoconcentrate.

The research object was donor human blood leukoconcentrate (HBL) procured by sedimentation [Grishin V.V., 2004]. HBL was cryopreserved by slow cooling regimen with 5% dimethyl acetamide (DMAc) [V.A. Agranenko *et al.*, 1986]. Adenylate contents (ATP, ADP and AMP) in cells were evaluated by chemiluminescent analysis. The fraction was isolated from cattle cord blood using ultra-filtration method. The ultrafiltrate was lyophilized and stored at -80°C . CBF was added into incubation medium in the amount of 0.15 mg/ml.

It was established that after HBL cryopreservation the energy status of cells was significantly worse. Thus, the adenylate pool of HBL cells decreased by 42.7% compared with the control. ATP content in native HBL was (23.42 ± 2.9) nmol/mg protein, after cryopreservation this index significantly decreased by 2.6 times and made up (8.9 ± 0.93) nmol/mg protein. After incubation in medium with CBF a significant 1.34 times increase in ATP concentration occurred as compared to the control. The ADP content in cells of frozen-thawed HBL remained unchanged, but the incubation with CBF contributed to 2-fold increase in its content as compared to the control. This effect should be certainly considered as a positive, since an increase in ADP amount in a cell is a signal for ATP synthesis. HBL cryopreservation did not result in a significant change in AMP content. However, after HBL recovery in the medium with CBF there was observed a significant 2-fold augmentation of AMP concentration if compared to the control. Apparently, such effect of CBF is associated with AMP synthesis *de novo*, as confirmed by a stimulating effect of CBF on total adenylate pool of frozen-thawed cells.

Thus, CBF was established as contributing to the augmentation of adenylate pool of HBL cells prior to and after cryopreservation, manifested in an increase of ATP, ADP and AMP contents.



Исследование влияния диметилсульфоксида на тепловую денатурацию гемоглобина человека до и после низкотемпературного воздействия

Ю.С. Говорова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Dimethyl Sulfoxide Effect on Thermal Denaturation of Human Hemoglobin Prior to and after Low Temperature Exposure

Yu.S. Govorova

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

Процесс низкотемпературного консервирования биологических систем сопровождается действием ряда повреждающих факторов, в частности возможны определенные изменения пространственной организации белков. Тепловая денатурация может служить маркером, отражающим эти явления. Одним из прямых экспериментальных методов исследования структурных изменений белков по их термоденатурации является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Этот подход позволяет оценить как термодинамические, так и кинетические параметры денатурации макромолекул. Гемоглобин – один из белков, который можно использовать в качестве модели при изучении влияния различных криопротекторов на его термостабильность. В данной работе в качестве криопротектора был выбран диметилсульфоксид (ДМСО), широко применяющийся в последние десятилетия при криоконсервировании различных биологических объектов. В связи с этим настоящая работа посвящена исследованию влияния ДМСО концентрацией от 0 до 50% на кинетические и термодинамические параметры тепловой денатурации гемоглобина человека до и после низкотемпературного замораживания до -196°C с помощью метода ДСК.

Термограммы регистрировали на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре «ДАСМ-4» (НПО «Биоприбор», Россия). Область сканирования температуры – от 25 до 90°C при избыточном давлении $2,5$ атм. Скорость нагрева – 1 град/мин. Нами рассчитаны значения калориметрической энтальпии денатурации, энергии активации и температуры денатурации для растворов гемоглобина с различными концентрациями ДМСО до и после низкотемпературного воздействия.

Температура денатурации гемоглобина в буферном растворе без криопротектора составляет $(72,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. Добавление 50% ДМСО к раствору гемоглобина, не подвергнутому замораживанию, снижает температуру денатурации белка до $(51 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$, что свидетельствует о понижении термостабильности гемоглобина. Замораживание растворов гемоглобина с криопротектором в диапазоне концентраций от 0 до 25% приводит к незначительному понижению температуры денатурации гемоглобина на 1°C , в то время как в диапазоне от 25 до 50% – повышению значений температуры денатурации на $(1,3-1,7)^{\circ}\text{C}$ по сравнению с таковыми без низкотемпературного воздействия.

В работе проведен анализ влияния ДМСО на кооперативность денатурации гемоглобина до и после замораживания. Показано, что снижение кооперативности денатурации наблюдается после замораживания при высоких концентрациях ДМСО. Обсуждаются возможные механизмы действия низких температур на пространственную организацию гемоглобина в присутствии криопротектора.

The process of low temperature preservation of biological systems is accompanied by the effect of some damaging factors, particularly, the certain changes in protein spatial organization are possible. Thermal denaturation may serve as a marker reflecting these phenomena. One of the direct experimental methods in studying structural changes in proteins on their thermodenaturation is differential scanning calorimetry (DSC). This approach allows evaluating both thermodynamic and kinetic parameters of macromolecule denaturation. Hemoglobin is one of the proteins that may be used as a model in studying the effect of different cryoprotectants on thermostability of biomolecules. We selected dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant, widely applied in recent decades in cryopreservation of different biological objects. This research was concerned with the investigation of the effect of DMSO concentrations from 0 to 50% on kinetic and thermodynamic parameters of thermal denaturation of human hemoglobin prior to and after low temperature exposure down to -196°C using DSC method.

Thermograms were recorded with a differential adiabatic scanning microcalorimetry DASM-4 (Biopribor, Russia). The temperature scan range was from 25 to 90°C under overpressure of 2.5 atm. The heating rate was 1 deg/min. We calculated the values of calorimetric enthalpy of denaturation, activation energy and denaturation temperature for hemoglobin solutions supplemented with different concentrations of DMSO before and after low temperature exposure.

Denaturation temperature of hemoglobin in cryoprotectant-free buffer solution was $(72.5 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$. Supplementation with 50% DMSO of hemoglobin solution not subjected to freezing decreased the denaturation temperature of protein down to $(51 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$, testifying to a reduced hemoglobin thermostability. Freezing of hemoglobin solutions with cryoprotectant with concentration from 0 to 25% resulted in a slight decrease in temperature of hemoglobin denaturation by 1°C , whereas in DMSO concentration range from 25 to 50% there was a rise in temperature denaturation values by $(1.3-1.7)^{\circ}\text{C}$ if compared to the indices without low temperature effect.

The investigation dealt also with analysis of the influence of DMSO on the cooperativity of hemoglobin denaturation process before and after freezing. The reduction of denaturation cooperative properties was shown to be observed after freezing at high concentrated DMSO. Possible mechanisms of low temperature effect on spatial organization of hemoglobin in cryoprotectant presence are discussed.



Модификация экспрессии генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха под действием криоконсервирования

О.В. Челомбитко, Н.А. Бондарович,

М.В. Останков, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of Expression of Pluripotency Genes in Ehrlich's Carcinoma Cells Following Cryopreservation

O.V. Chelombitko, N.A. Bondarovich, M.V. Ostankov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Согласно теории стволовых раковых клеток (СРК), в последнее время получающей все больше доказательств, опухоль содержит субпопуляции раковых клеток, которые обладают характеристиками стволовых или прогениторных клеток. Одним из маркеров, идентифицирующих СРК, является CD44. В связи с применением криодеструкции, как самостоятельного метода и вспомогательного этапа, при лечении онкологических заболеваний влияние низких температур на различные субпопуляции клеток опухоли остается актуальным вопросом.

Целью работы было оценить влияния процессов замораживания-отогрева на способность опухолеобразования клеток, экспрессирующих CD44, выделенных из культуры аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) 7 и 14-х суток развития.

Клетки АКЭ вводили внутривентриально (3×10^6 клеток) самкам мышей линии BALB/c и культивировали *in vivo*. На 7 и 14-е сутки получали культуру клеток АКЭ (АКЭ-7 и АКЭ-14). Популяцию клеток с маркером CD44 выделяли из АКЭ-7 (АКЭ-7CD44⁺) и АКЭ-14 (АКЭ-14CD44⁺) методом магнитной сепарации на магнитном сортере «iMagnet» («BD», США), криоконсервировали в асцитической жидкости без использования криопротекторов по двухэтапной программе (скорость охлаждения 1 град/мин до -80°C , 300–400 град/мин от -80 до -196°C) и снова культивировали *in vivo* (3×10^5 клеток на мышшь). Анализ процентного содержания субпопуляций с фенотипом CD44⁺CD24⁻ и CD44^{high} проводили на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США). Уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* определяли методом ОТ-ПЦР.

Установлено, что в культуре АКЭ, выращенной из нативных клеток АКЭ-7CD44⁺, содержание более дифференцированных клеток (CD44⁺CD24⁻) выше, чем в аналогичных криоконсервированных образцах, а содержание клеток-предшественников (CD44^{high}), наоборот, ниже. В культуре АКЭ, выращенной из АКЭ-14CD44⁺ наблюдались подобные эффекты, однако количество клеток-предшественников в культуре, выращенной из криоконсервированных образцов, было выше по сравнению с таковым в АКЭ-7CD44⁺. После культивирования криоконсервированных АКЭ-14CD44⁺ наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2*, а в нативных образцах – его снижение.

Таким образом, действие холода на СРК разных популяций опухолевых клеток изменяет направление их дальнейшей дифференцировки.

According to the theory of cancer stem cells (CSCs) gaining recently more evidence the tumor contains subpopulations of cancer cells with characteristics of stem or progenitor cells. One of the markers identifying CSCs is CD44. Due to the application of cryodestruction as both an independent method and auxiliary stage in the therapy of cancers, the issue about the effect of low temperatures on different subpopulations of tumor cells continues to be relevant.

The objective was to evaluate the effects of freeze-thawing processes on the tumor forming ability of cells expressing CD44, isolated from Ehrlich's carcinoma (EC) cell culture of 7 and 14 days of development.

EC cells were injected intraperitoneally (3×10^6 cells) to female BALB/c mice and cultured *in vivo*. To 7 and 14 days the EC cell culture (EC-7 and EC-14) was obtained. Cell population with CD44 marker was isolated from EC-7 (EC-7CD44⁺) and EC-14 (EC-14CD44⁺) by magnetic separation with magnetic sorter BD iMagnet (USA), then cryopreserved in ascitic fluid without cryoprotectant according two-stage program (1 deg/min cooling rate down to -80°C , 300–400 deg/min from -80 down to -196°C) and then recultured *in vivo* (3×10^5 cells per mouse). Percentage of subpopulations with phenotype CD44⁺CD24⁻ and CD44^{high} was analyzed with flow cytometer (BD FACSCalibur, USA). The expression level of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes was determined by RT-PCR.

It was established that in EC culture, grown from native cells of EC-7CD44⁺, the content of more differentiated cells (CD44⁺CD24⁻) was higher than in similar cryopreserved samples but the content of precursor cells (CD44^{high}) *vice versa* was lower. In the EC culture grown from EC-14CD44⁺ we observed the similar effects, but the number of progenitor cells in a culture grown from cryopreserved samples was higher compared with those in the EC-7CD44⁺. After culturing cryopreserved EC-14CD44⁺ we noted an increased expression level of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes, whereas in native samples the expression level of these genes was reduced.

Thus, the effect of cold on CSCs from different populations of tumor cells changes the direction of their further differentiation.



Устойчивость мезенхимальных стромальных клеток, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах

Д.Н. Тарусин, В.С. Зайков, В.В. Муценко, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Resistance of Mesenchymal Stromal Cells Encapsulated in Alginate Microspheres to Short-Term Storage at Positive Temperatures

D.N. Tarusin, V.S. Zajkov, V.V. Mutsenko, Y.A. Petrenko

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

Инкапсуляция мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в альгинатные микросферы (АМС) – перспективное направление клеточной биотехнологии, тканевой инженерии и трансплантологии. В связи с этим актуальным вопросом является разработка новых методов хранения МСК в составе АМС.

Целью данной работы было изучить устойчивость МСК, инкапсулированных в альгинатные микросферы, к краткосрочному хранению при положительных температурах.

Для хранения МСК, инкапсулированных в АМС, использовали герметично закрытые пробирки, содержащие 1 мл культуральной среды. Температура составляла 4, 22 и 37°C. После хранения альгинатные микросферы растворяли 1%-м раствором цитрата натрия, затем клетки культивировали в монослое. Жизнеспособность МСК определяли по МТТ-тесту. Метаболическую активность МСК оценивали по степени восстановления редокс-индикатора AlamarBlue (AB). Коэффициент клеточной адгезии определяли путем подсчета не прикрепившихся клеток после суточного монослойного культивирования.

В процессе хранения МСК в виде суспензии при всех температурных режимах наблюдалось быстрое снижение жизнеспособности и степени восстановления АВ. Так, на 2-е сутки инкубации жизнеспособность МСК составляла 50–60%, а метаболическая активность 40–60%. Более длительные сроки хранения сопровождались агрегацией клеток. Инкапсуляция МСК в АМС предотвращала агрегацию и позволяла сохранить жизнеспособность и метаболическую активность при 37 и 22°C на уровне 60–85% до 3-х суток инкубации. Высокие показатели жизнеспособности сохранялись вплоть до 7-х суток хранения. В то же время при хранении инкапсулированных МСК при 4°C не выявлено существенных различий в показателях сравниваемых клеток. Можно предположить, что низкие показатели жизнеспособности и метаболической активности МСК в условиях хранения при 4°C объясняются непригодностью культуральной среды для гипотермического хранения.

Установлено, что инкапсуляция МСК в АМС сопровождалась снижением степени восстановления АВ в 3 раза. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что причиной устойчивости МСК в процессе хранения при положительных температурах является снижение метаболической активности при инкапсуляции в АМС.

Encapsulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) in alginate microspheres (AMS) is a promising direction of cell biotechnology, tissue engineering and transplantology. In this regard the important issue is the development of new methods of storing MSCs in the AMS.

The aim of this work was to study the resistance of MSCs encapsulated in alginate microspheres to short-term storage at positive temperatures.

Encapsulated MSCs were stored at 4, 22 and 37°C in sealed tubes containing 1 ml of culture medium. After storage, the alginate microspheres were dissolved in 1% sodium citrate solution and the cells were cultured in monolayer. Viability was determined by MTT-test. Metabolic activity of MSCs was evaluated by the reduction of the redox indicator AlamarBlue (AB). Cell adhesion was determined by counting non-adhered cells after 24 hrs monolayer culture.

The storage of the MSCs in suspension at all the temperatures resulted in a rapid decrease in viability and the AB reduction level. On the 2nd day of incubation, the viability of MSCs was 50–60%, while the metabolic activity comprised 40–60%. Longer storage has been accompanied by cell aggregation. Encapsulation of MSCs in AMS prevented cell aggregation and allowed to preserve the viability and metabolic activity at 37 and 22°C in the 60–85% range for up to 3 days of incubation. High rates of viability remained until the 7th day of storage. However, the storage of MSCs at 4°C revealed no significant differences between encapsulated and non-encapsulated cells. We can assume that the low level of metabolic activity and viability of MSCs during storage at 4°C can be associated with the unsuitability of the culture medium for hypothermic storage.

It was established, that the encapsulation of MSCs in AMS was accompanied by the 3 times decrease in the AB reduction degree. These results may indicate that the resistance of the MSCs during storage at positive temperatures can be caused by the reduction of metabolic activity after AMS encapsulation.



Анализ ИДО-зависимого иммуномодулирующего эффекта мезенхимальных стволовых клеток фетальной печени мышей до и после криоконсервирования

А.Ю. Димитров, Т.Г. Дубрава, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Analysis of IDO-dependent Immunomodulatory Effect of Mice Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells Prior to and After Cryopreservation

A.Yu. Dimitrov, T.G. Dubrava, A.N. Goltsev

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

Реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), возникающую после трансплантации гистонесовместимого костного мозга (КМ), ассоциируют с аутоиммунной патологией. В терапии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) широко используются клетки фетальной печени (ФП), обладающие иммунокорригирующим эффектом благодаря содержанию мезенхимальных стволовых клеток (МСК), синтезирующих индоламин 2,3-диоксигеназу (ИДО). Работа этого фермента приводит к супрессии эффекторных Т-клеток и активации регуляторных Т-клеток (T_{reg}), что снижает выраженность АИЗ. Экспериментальную инактивацию ИДО проводят с использованием конкурентного ингибитора 1-метилтриптофана (1-МТ). Известно, что криоконсервирование обеспечивает не только долгосрочное хранение биоматериала, но и может изменять его характеристики. Цель работы – исследовать ИДО-зависимый механизм влияния нативных и криоконсервированных МСК ФП на T_{reg} -клетки мышей в модели РТПХ.

Суспензию клеток получали путем гомогенизации ФП мышей линии C57BL (14-е сутки). Фракцию CD105⁺ (МСК) выделяли методом иммуномагнитного сортирования. Клетки (1×10^6 клеток/мл) криоконсервировали под защитой 10% ДМСО в программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПККиК НАН Украины) по программе: охлаждение со скоростью 10 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот. Образцы отогревали на водяной бане при 40°C до исчезновения твердой фазы. Для инактивации ИДО проводили инкубацию клеток ФП с 1 мМ 1-МТ при 37°C в течение 2 ч. Для индукции острой РТПХ летально облученным мышам (CBA/H \times C57BL)F1 внутривенно вводили 5×10^6 клеток КМ с 30% клеток лимфоузлов мышей линии CBA/H; 5×10^5 нативных или криоконсервированных МСК ФП вводили сразу после индукции патологии. Интенсивность РТПХ оценивали на 14-е сутки после индукции и лечения. Содержание T_{reg} в селезенках реципиентов оценивали на проточном цитофлуориметре с использованием антител к Foxp3, CD4 и CD25.

Установлено снижение содержания T_{reg} у реципиентов с РТПХ. Показан иммунокорригирующий эффект МСК ФП на модели острой РТПХ, выражающийся в стимуляции T_{reg} . Выявлена зависимость между клиническим проявлением РТПХ и снижением интенсивности формирования T_{reg} у животных после введения МСК ФП, обработанных 1-МТ. Криоконсервирование оказывало определенное влияние на терапевтическую активность МСК ФП при лечении АИЗ *in vivo*.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли ИДО в реализации активности МСК ФП и могут учитываться при разработке методов клеточной терапии АИЗ.

Graft-versus-host disease (GVHD) occurring after transplantation of histoincompatible bone marrow (BM) is associated with autoimmune pathology. In the treatment of autoimmune diseases (AIDs) there are widely used fetal liver (FL) cells possessing an immunocorrecting effect due to the content of mesenchymal stem cells (MSCs), synthesizing indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). Functioning of this enzyme leads to the suppression of effector T cells and activation of regulatory T cells (T_{reg}) that reduces the severity of AIDs. Experimental inactivation of IDO is performed using a competitive inhibitor 1-methyltryptophan (1-MT). It is known that cryopreservation provides not only long-term storage of biomaterial but also can alter its characteristics. The purpose of research was to study the IDO-dependent mechanism of the effect of native and cryopreserved FL MSCs on T_{reg} cells in mice in the model of GVHD.

The cell suspension was derived by homogenization of C57BL mice FL (day 14). CD105⁺ fraction (MSCs) was isolated by immunomagnetic sorting. Cells (1×10^6 cells/ml) were cryopreserved under 10% DMSO protection in programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine) using the following program: cooling rate of 10 deg/min down to -25°C , followed by plunging into liquid nitrogen. Samples were thawed in water bath at 40°C until the disappearance of solid phase. To inactivate IDO the FL cells were incubated with 1 mM 1-MT at 37°C for 2 hours. For the induction of acute GVHD lethally irradiated (CBA/H \times C57BL) F1 mice were injected intravenously with 5×10^6 BM cells with 30% lymph node cells of CBA/H mice; 5×10^5 native or cryopreserved FL MSCs were introduced immediately after the induction of pathology. GVHD intensity was assessed to day 14 after induction and treatment. Content of T_{reg} in the spleen of recipients was assessed with flow cytometer using antibodies to Foxp3, CD4 and CD25.

Reduction in T_{reg} content was noted in recipients with GVHD. We have shown the immunocorrecting effect of FL MSCs in the model of acute GVHD, which was manifested in the stimulation of T_{reg} . There was established the dependence between clinical manifestation of GVHD and decrease in intensity of T_{reg} formation in animals after administration of FL MSCs treated with 1-MT. Cryopreservation had a certain influence on therapeutic activity of FL MSCs in the treatment of AIDs *in vivo*.

The findings attest an important role of IDO in implementing the activity of FL MSCs and may be considered when developing the methods for cell therapy of AIDs.



Влияние различных концентраций криопротектора ДМСО на уровень экспрессии stemness-генов в стволовых клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, М.В. Останков, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Different DMSO Concentrations on Expression Level of Stemness Genes in Mice Fetal Liver Stem Cells Prior to and after Cryopreservation

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev

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

Криоконсервирование является обязательным этапом использования клеточного материала в клинической практике. Варьирование условий криоконсервирования, включая начальные этапы предобработки криопротектором, может оказывать разное влияние на характеристики биообъекта. Мезенхимальные (МСК) и гемопоэтические (ГСК) стволовые клетки фетальной печени (КФП) широко применяются в клеточной терапии. Плюрипотентность стволовых клеток контролируется рядом транскрипционных факторов, наиболее значимыми из которых являются *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*. Анализ состояния stemness-генов может дать понимание принципов функционирования геномного аппарата клеток после криоконсервирования и оптимизировать его существующие протоколы.

Цель исследования – изучить влияние температуры экспозиции и разных концентраций криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) на уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4* и *sox2* в стволовых клетках фетальной печени мышей до и после криоконсервирования.

Материалы и методы. Суспензию клеток получали методом гомогенизации фетальной печени 14 и 18 суток гестации мышей линии C57BL. Фракции CD105⁺ (МСК) и CD117⁺ (ГСК) КФП получали методом иммуномагнитного сортирования. К выделенным фракциям при температуре 20 или 4°C добавляли ДМСО, конечная концентрация которого составляла 5 или 10%. Экспозицию клеток в растворе проводили в течение 10 мин при вышеуказанной температуре. Суспензию клеток криоконсервировали на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) со скоростью 1 град/мин до –25°C с последующим погружением в жидкий азот, отогревали на водяной бане при 37°C. Анализ экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* в субпопуляциях нативных, экспонированных с криопротектором и криоконсервированных клеток проводили методом ОТ-ПЦР анализа (методом $\Delta\Delta Ct$). Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы «Origin».

Результаты исследования показали, что повышение концентрации криопротектора приводило к снижению уровня экспрессии stemness-генов до и после криоконсервирования. Экспозиция с охлажденным криопротектором оказывала меньшее влияние на данный параметр. В клетках, которые замораживали с 10%-м ДМСО, добавленным в среду при температуре 4°C, уровень экспрессии до и после криоконсервирования изменялся в наименьшей степени по сравнению с нативом.

Cryopreservation is a mandatory stage for using cell samples in clinical practice. Varying conditions of cryopreservation, including the initial stages of treatment with cryoprotectant may have different effects on the characteristics of bioobject. Mesenchymal (MSCs) and hematopoietic (HSCs) stem cells of fetal liver (FLC) are widely applied in cell therapy. Pluripotency of stem cells is controlled by a number of transcription factors, the most significant of which are *nanog*, *oct4* and *sox2*. Analysis of the stemness-genes status can give understanding of the functioning of cell genomic apparatus after cryopreservation and optimize the existing protocols.

The research aim was to study the effect of exposure temperature and different concentrations of cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) on the expression level of *nanog*, *oct4* and *sox2* genes in mice fetal liver stem cells prior to and after cryopreservation.

Materials and methods. The cell suspension was procured by homogenization of C57BL mice fetal liver of 14 and 18 gestation days. CD105⁺ (MSCs) and CD117⁺ (HSCs) fractions of FLCs were obtained by immunomagnetic sorting. The extracted fractions were supplemented with DMSO at 20 or 4°C, final concentration of cryoprotectant in the solution was 5 or 10%. Cell exposure in the solution was carried out for 10 min at the stated temperatures. Cell suspension was cryopreserved using the programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of IPCC of NAS of Ukraine) with the cooling rate of 1 deg/min down to –25°C and following plunging into liquid nitrogen, then thawed in water bath at 37°C. The expression of *nanog*, *oct4*, *sox2* genes in subpopulations of native cells, those exposed to cryoprotectant and cryopreserved ones was analyzed by RT-PCR (using $\Delta\Delta Ct$). The results were statistically processed by Student's t-test using Origin software.

The results showed that elevated cryoprotectant concentration resulted in a lower expression level of stemness-genes before and after cryopreservation. Exposure with the cooled cryoprotectant had less effect on this parameter. In the cells frozen with 10% DMSO added at 4°C the expression level prior to and after cryopreservation changed in the least degree if compared to the native.



Инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы снижает токсическое действие криопротекторов при витрификации

В.С. Зайков, В.В. Муценко, Д.Н. Тарусин, Ю.А. Петренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Encapsulation of Cells into Alginate Microspheres Reduces Toxic Effect of Cryoprotectants During Vitrification

V.S. Zaikov, V.V. Mutsenko, D.N. Tarusin, Yu.A. Petrenko
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Витрификация трехмерных тканеинженерных конструкций – перспективный криобиологический подход, позволяющий сохранить как жизнеспособность и функциональные свойства клеток, так и структурные особенности и трехмерную организацию биообъекта. Многообещающим направлением тканевой инженерии является инкапсуляция клеток в альгинатные носители. Ранее нами было установлено, что для успешной витрификации инкапсулированных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) необходимо проводить более длительную экспозицию с раствором криопротекторов по сравнению с суспензией клеток. При этом более продолжительная экспозиция значимо не влияла на морфофункциональные свойства инкапсулированных МСК и позволяла получить высокие показатели их жизнеспособности после витрификации. Это может быть связано с тем, что инкапсуляция в альгинатные носители снижает негативное действие криопротекторов на этапе экспозиции.

Целью данной работы было изучить влияние инкапсуляции в альгинатные микросферы на жизнеспособность МСК после экспозиции и витрификации в многокомпонентных растворах криопротекторов.

В работе использовали МСК дермы взрослого человека 6–8 пассажей. В качестве криозащитных сред было выбрано 5 растворов: раствор 1 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы; 20% ЭГ и 20% ПД (8,45 М); раствор 2 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 30% ЭГ (7,31 М); раствор 3 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 40% ЭГ (9 М); раствор 4 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 50% ЭГ (10,88 М); раствор 5 – 10% ДМСО; 0,5 М сахарозы и 60% ЭГ (12,68 М).

Экспозицию инкапсулированных клеток с растворами криопротекторов проводили в течение 5 мин при 20°C. Образцы замораживали путем прямого погружения в жидкий азот (–196°C). Жизнеспособность МСК до и после криоконсервирования оценивали с использованием МТТ-теста.

Было установлено, что жизнеспособность МСК в суспензии после экспозиции с растворами криопротекторов снижалась при увеличении общей молярной концентрации раствора. При этом экспозиция клеток в растворе 5 приводила к полной потере жизнеспособности клеток. Напротив, уровень жизнеспособности инкапсулированных МСК после экспозиции с каждым из растворов оставался выше 70%. При этом использование криозащитных растворов с более высокой общей молярной концентрацией позволило добиться близких показателей жизнеспособности инкапсулированных МСК до и после замораживания-оттаивания.

Полученные данные свидетельствуют о том, что инкапсуляция МСК в альгинатные носители позволяет снизить негативное действие растворов криопротекторов, проводить более длительную экспозицию в данных растворах и, в результате, повысить эффективность криоконсервирования.

Vitrification of three-dimensional tissue-engineered constructs is a promising cryobiological approach that allows preserving both the viability, functional properties of cells and structural features and three-dimensional organization of bioobject. Cell encapsulation into alginate carriers is a promising direction of tissue engineering. Previously, we have established that a successful vitrification of encapsulated mesenchymal stromal cells (MSCs) needs more prolonged exposure with cryoprotectant solution if compared with cell suspension. In this case more prolonged exposure did not significantly affect the morphofunctional properties of encapsulated MSCs and allowed to achieve high viability indices after vitrification. This may be due to the fact that encapsulation into alginate carriers reduces a negative effect of cryoprotectants at exposure stage.

The aim of this work was to study the effect of encapsulation into alginate microspheres on MSCs viability after exposure and vitrification in multicomponent cryoprotectant solutions.

We used MSCs of adult human derma of 6–8 passages. As cryoprotective media there were selected 5 solutions: solution 1 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose; 20% EG, and 20% PD (8.45 M); solution 2 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 30% of EG (7.31 M); solution 3 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 40% of EG (9 M); solution 4 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 50% EG (10.88 M); solution 5 – 10% DMSO; 0.5 M sucrose and 60% EG (12.68 M).

The exposure of encapsulated cells with cryoprotectant solutions was carried out for 5 min at 20°C. Samples were frozen by direct immersion into liquid nitrogen (–196°C). MSCs viability before and after cryopreservation was assessed using the MTT assay.

The viability of MSCs in the suspension after exposure with cryoprotectant solutions was established to decrease with increasing the total molar concentration of the solution. In this case the cell exposure in the solution 5 resulted in a complete loss of cell viability. In contrast, the viability level of encapsulated MSCs after exposure with each of the solutions remained above 70%. The use of cryoprotective solutions with higher total molar concentration enabled to achieve close indices of viability of encapsulated MSCs prior to and after freeze-thawing.

The findings suggest that MSCs encapsulation into alginate carriers allows to reduce a negative effect of cryoprotective solutions, to implement more prolonged exposure in these solutions and, as a result, to improve the efficiency of cryopreservation.



Сохранность иммобилизованных в гелях клеток *Escherichia coli* M-17 при низких температурах

Т.В. Дорофеева, Е.В. Кудокотцева

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Preservation of *Escherichia coli* M-17 Cells Immobilised in Gels Under Low Temperatures

T.V. Dorofeyeva, E.V. Kudokotseva

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

В комплексной терапии и профилактике дисбиозов ЖКТ широко используют микроорганизмы – пробиотики, в том числе штамм *Escherichia coli* M-17.

В настоящее время разрабатывают пробиотические препараты IV поколения – синбиотики, иммобилизованные в гелях или на сорбентах. Для хранения препаратов пробиотиков применяют лиофилизацию и различные низкие температуры. Сохранность микроорганизмов, иммобилизованных в гелях при низких температурах, находится на стадии изучения.

Целью исследования было изучение жизнеспособности клеток *E. coli* M-17, иммобилизованных в блоках и гранулах гелей альгината натрия и *k*-каррагинана после хранения в течение 6 месяцев при температурах 4, –20, –80, –196°C.

Объектом исследования был штамм бактерий *E. coli* M-17. Бактерии иммобилизовали в блоках и гранулах альгината натрия и *k*-каррагинана и замораживали в криопробирках («Nunc», США) с рабочим объемом 1,8 мл по 1,5 мл клеток и по 10 гранул соответственно. Контролем служила суспензия бактериальных клеток в ростовой среде М9. В работе использовали следующие режимы замораживания: охлаждение со скоростью 1 и 20 град/мин до –40°C с последующим погружением в жидкий азот, а также с неконтролируемой скоростью до –196°C.

Установлено, что при охлаждении клеток *E. coli* M-17 в среде М9 со скоростями 1 и 20 град/мин до –40°C и последующим погружением в жидкий азот и при замораживании с неконтролируемой скоростью до –196°C жизнеспособность бактерий (*Ig* КОЕ/мл) составляла 9,25 ± 0,04; 9,44 ± 0,04; 9,50 ± 0,03 соответственно, что незначимо отличалось от контроля.

Охлаждение иммобилизованных бактерий в гелях 1% альгината и 1% *k*-каррагинана при указанных выше режимах замораживания значимо не влияло на жизнеспособность клеток.

Для изучения влияния условий хранения на жизнеспособность клеток образцы помещали в холодильные камеры с температурными режимами 4, –20, –80°C, а часть образцов замораживали путем погружения в жидкий азот.

После хранения на протяжении 6 месяцев при –80 и –196°C количество жизнеспособных свободных и иммобилизованных клеток *E. coli* M-17 значимо не изменилось, а при 4 и –20°C – значимо уменьшилось. Наиболее низкие показатели жизнеспособности свободных и иммобилизованных бактерий отмечали после хранения при –20°C.

Полученные результаты свидетельствуют о защитной функции гелей альгината натрия и *k*-каррагинана при низких температурах.

Probiotic microorganisms, including *Escherichia coli* M-17 strain are widely used in a combined therapy and prevention of gastrointestinal dysbiosis.

Currently there are developed the probiotic preparations of IV generation: sinbiotics, immobilized in gels or sorbents. To store the probiotic preparations one applies freeze-drying and storage at different low temperatures. The integrity of microorganisms immobilized in gels at low temperatures is under study.

The research was aimed to study the viability of *E. coli* M-17 cells immobilized in blocks and granules of sodium alginate and *k*-carrageenan gels after storing within 6 months at 4, –20, –80, and –196°C.

The object of the study was bacteria *E. coli* M-17 strain. The bacteria were immobilized in blocks and granules of sodium alginate and *k*-carrageenan, and frozen in 1.8 ml cryovials (Nunc, USA) by 1.5 ml of cells and 10 granules respectively. Suspension of bacterial cells in M9 growth medium served as the control. In research we used the following freezing regimens: cooling with 1 and 20 deg/min rate down to –40°C followed by immersion into liquid nitrogen, as well as with uncontrolled rate down to –196°C.

It was established that cooling *E. coli* M-17 cells in M9 medium with rates of 1 and 20 deg/min to –40°C followed by immersion in liquid nitrogen and freezing with uncontrolled rate down to –196°C resulted in following indices of bacterial viability (*Ig* CFU/ml): 9.25 ± 0.04; 9.44 ± 0.04; 9.50 ± 0.03, respectively, that was insignificantly different from the control.

Cooling of immobilized bacteria in 1% alginate and 1% *k*-carrageenan gels under the mentioned above cooling regimens did not significantly affect a cell viability.

To study the effect of storage conditions on cell viability the samples were placed into cold-storage chambers with temperature regimens of 4, –20, –80°C, and some samples were frozen by immersion in liquid nitrogen.

After storing within 6 months at –80 and –196°C the number of viable free and immobilized cells of *E. coli* M-17 was not significantly changed, but in case of 4 and –20°C it significantly decreased, the lowest levels of viability of free and immobilized bacteria was noted after storage at –20°C.

The results indicate a protective function of sodium alginate and *k*-carrageenan gels at low temperatures.

