



Тезисы 39-й ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2015 г., г. Харьков

<i>Пуговкин А.Ю., Конейка Е.Ф.</i> Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (<i>Esox lucius</i> L.).....	165
<i>Мартынова Ю.В., Бабийчук В.Г.</i> Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (–120°С) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс.....	166
<i>Kilbride P., Selden C., Fuller B., Morris J.</i> Хранение инкапсулированных сфероидов, состоящих из клеток печени, при –80°С после хранения при температуре жидкого азота.....	167
<i>Буцкий К.И., Дюбо Т.С., Федуняева И.А., Татарец А.Т., Конейка Е.Ф.</i> Определение вероятности образования микроскопических пор в мембранах криоконсервированных сперматозоидов карпа (<i>Cyprinus carpio</i>).....	168
<i>Севастьянов С.С., Осецкий А.И.</i> Влияние водородных связей на диаграммы состояния криопротекторных растворов.....	169
<i>Буркова В.В., Лаврик А.А.</i> Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах.....	170
<i>Борисов П.А., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н.</i> Анализ уровня экспрессии генов в криоконсервированных клетках фетальной печени в процессе рекультивирования.....	171
<i>Муценко В.В., Роговская Е.Ю., Тарусин Д.Н.</i> Ответ мезенхимальных стромальных клеток на криоконсервирование в составе скаффолдов, полученных из скелетов морских губок <i>Ianthella basta</i> (пилотное исследование).....	172
<i>Розанова С.Л.</i> Влияние низких температур на гемоглобин, встроенный в альгинатные микросферы.....	173
<i>Михайлова О.О., Зубов П.М.</i> Стан популяцій ядровмісних клітин кордової крові залежно від методу криоконсервування... ..	174
<i>Дябина О.А., Винник Ю.А., Останков М.В., Бондарович Н.А., Гольцев А.Н.</i> Корреляция между stemness-like состоянием клеток аденокарциномы Эрлиха и количеством циклов замораживания-отогрева.....	175
<i>Бабинцев О.М., Высеканцев И.П., Марценюк В.Ф.</i> Терапевтическая эффективность иммобилизованного препарата антибиотика и пробиотика после низкотемпературного хранения.....	176
<i>Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П.</i> Практический опыт экспериментальных микрососудистых операций.....	177
<i>Юрчук Т.А., Петрушко М.П., Пиняев В.И.</i> Вклад индивидуальных морфологических характеристик в результативность витрификации blastocyst человека.....	178
<i>Манченко А.А.</i> Исследования биоинтеграции соединительнотканых трансплантатов при создании тканезамещающих биоматериалов.....	179
<i>Беспалова І.Г., Рогоза Л.А., Гірич М.С.</i> Дослідження складу екстрактів криоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ.....	180
<i>Свидко Е.Н., Демин Ю.А.</i> Компенсация лимбальной недостаточности роговицы ядросодержащими клетками кордовой крови.....	181
<i>Трофимова А.В., Чиж Н.А., Белочкина И.В., Манченко А.А., Шаблій В.А., Сандомирский Б.П.</i> Функциональное состояние миокарда после комбинированного использования терапевтической гипотермии и мезенхимальных стромальных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда.....	182
<i>Тарусин Д.Н., Зайков В.С., Муценко В.В., Петренко Ю.А.</i> Влияние гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток в составе альгинатных микросфер.....	183



<i>Семионова Е.А., Шапкина О.А.</i> Влияние глюкозы на устойчивость эритроцитов млекопитающих к действию стрессовых факторов.....	184
<i>Челомбитько О.В., Бондарович Н.А., Останков М.В., Димитров А.Ю., Гольцев А.Н.</i> Влияние криоконсервирования на экспрессию генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха разных сроков развития.....	185
<i>Красникова А.О., Касян Н.А., Ващенко О.В., Лисецкий Л.Н., Компаниец А.М., Зинченко А.В., Соловьев Д.В., Булавин Л.А.</i> Влияние криопротекторов группы оксиэтилированных производных глицерина на структуру и фазовые переходы модельных липидных мембран.....	186
<i>Горячая И.П.</i> Влияние антисептика-стимулятора АСД-2 на устойчивость мембран эритроцитов быка к криовоздействиям.....	187
<i>Жаркова Е.Е., Гулевский А.К.</i> Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови человека (до 5 кДа) на морфофункциональные характеристики эритроцитов после гипотермического хранения.....	188
<i>Трутаева И.А., Киришча В.В., Божкова Ю.О., Бондаренко Т.П.</i> Оптимизация режима насыщения-отмывания овариальной ткани растворами проникающих криопротекторов.....	189
<i>Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Божок Г.А.</i> Морфологические и фенотипические особенности цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят, в обычных и низкоадгезивных условиях.....	190
<i>Говор И.В.</i> Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов.....	191
<i>Чуб О.В., Мусатова И.Б., Прокотюк В.Ю., Карпенко В.Г.</i> Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза.....	192
<i>Коробкова А.В., Компаниец А.М.</i> Криоконсервирование концентратов тромбоцитов при умеренно низких температурах (-70...-80°C) с консервантами на основе комбинаций криопротекторов.....	193
<i>Ищенко И.О., Власов А.А., Ковалев Г.А., Наумова О.В., Сандомирский Б.П.</i> Характеристика холодовых ран при лечении криоконсервированной сывороткой кордовой крови.....	194
<i>Власов О.О., Панов С.И., Ковальов Г.О., Белочкина И.В., Ніпот О.Є., Шпакова Н.М., Єфімова І.О., Сандомирський Б.П.</i> Вплив водного колоїдного розчину фулерену С60 на стан мембран та біохімічні показники <i>in vivo</i>	195
<i>Дорофеева Т.В., Кудогоцева О.В.</i> Вплив температур зберігання на життєздатність клітин <i>Escherichia coli</i> М-17.....	196
<i>Кавелина А.С., Попандоупо А.Г., Прокотюк О.С., Савчук М.В.</i> Создание трехмерного трансплантата поверхностных слоев клеток роговицы.....	197
<i>Роенко А.А., Прокотюк В.Ю., Фалько О.В., Шевченко Н.А., Волина В.В., Прокотюк О.С.</i> Применение криоконсервированных плодовых оболочек для лечения нейротрофических язв.....	198

coldinbiologyandmedicine

current issues of cryobiology,
transplantology and biotechnology



Abstracts of the 39th Annual Conference of Young Scientists 'Cold in Biology and Medicine. Current Issues in Cryobiology, Transplantology and Biotechnology'
May 20–21, 2015, Kharkov, Ukraine

<i>Puhovkin A. Yu., Kopeika E.F.</i> Study of Water Molecules Transfer Through Pike (<i>Esox lucius</i> L) Spermatozoa Membranes.....	165
<i>Martynova Yu.V., Babiichuk V.G.</i> Influence of Repeated Cycles of Rhythmic Cryostimuli (-120°C) on Ultrastructure Organization of Myocardium Blood Capillaries Endotheliocytes in Dynamics of Rats' Aging.....	166
<i>Kilbride P., Selden C., Fuller B., Morris J.</i> Storage of Encapsulated Liver Cell Spheroids at -80°C after Storage at Liquid Nitrogen Temperatures.....	167
<i>Butskiy K.I., Dyubko T.S., Fedunayeva I.A., Tatars A.L., Kopeika E.F.</i> Study of Probability of Microscopic Pore Formation in Post-Thaw Sperm Membranes.....	168
<i>Sevastianov S.S., Osetsky A.I.</i> Influence of Hydrogen Bonding on the State Diagram of Cryoprotective Solutions.....	169
<i>Burkova V.V., Lavrik A.A.</i> Activity of Rabies Virus Strain CVS (20% Cerebral Suspension) After Storage at Different Temperatures.....	170
<i>Borisov P.A., Dimitrov A. Yu., Goltsev A.N.</i> Analysis of Gene Expression Rates in Fetal Liver Cryopreserved Cells During Reculturing.....	171



<i>Mutsenko V.V., Rogulska O.Yu., Tarusin D.N.</i> The Response of Mesenchymal Stromal Cells to Cryopreservation within Scaffolds Derived from the Skeletons of Marine Sponges <i>Ianthella basta</i> (Pilot Study).....	172
<i>Rozanova S.L.</i> Low Temperature Influence on Hemoglobin Loaded in Alginate Microspheres.....	173
<i>Mykhailova O.O., Zubov P.M.</i> State of Human Cord Blood Nucleated Cell Populations Depending on Cryopreservation Method.....	174
<i>Diabina O.A., Vinnik Yu.A., Ostankov M.V., Bondarovich N.A., Goltsev A.N.</i> Correlation in Stemness-Like State of Ehrlich Carcinoma Cells and Number of Freeze-Thawing Cycles.....	175
<i>Babinets O.M., Vysekantsev I.P., Martsenyuk V.F.</i> Therapeutic Efficiency of Immobilized Preparation of Antibiotic and Probiotic After Low Temperature Storage.....	176
<i>Byzov D.V., Chizh N.A., Mikhaylova I.P., Sandomirsky B.P.</i> Practical Experience of Experimental Microvascular Procedures.....	177
<i>Yurchuk T.A., Petrushko M.P., Pinyaev V.I.</i> The Contribution of Individual Morphological Characteristics in the Effectiveness of Human Blastocyst Vitrification.....	178
<i>Manchenko A.A., Mikhailova I.P., Sandomirsky B.P.</i> Studies of Connective Tissue Graft Biointegration in Preparing of Tissue Replacing Biomaterials.....	179
<i>Bespalova I.G., Rohoza L.A., Girych M.S.</i> Study of Composition of Cryopreserved Fragment Extracts From Newborn Piglet Skin and Heart Using Tricine-SDS-PAGE.....	180
<i>Svidko E.N., Demin Yu.A.</i> Compensation of Corneal Limbal Deficiency with Cord Blood Nucleated Cells.....	181
<i>Trofimova A.V., Chizh N.A., Belochkina I.V., Manchenko A.A., Shabliy V.A., Sandomirsky B.P.</i> Functional State of Myocardium After Combined Application of Therapeutic Hypothermia and Mesenchymal Stromal Cells at Experimental Myocardial Infarction.....	182
<i>Tarusin D.N.</i> Effect of Hypothermic Storage in Various Media on Viability and Metabolic Activity of Human Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microspheres.....	183
<i>Semionova E.A., Shapkina O.A.</i> Glucose Affects the Resistance of Mammalian Erythrocytes to the Effect of Stress Factors.....	184
<i>Chelombitko O.V., Bondarovich N.A., Ostankov M.V., Dimitrov A.Yu., Goltsev A.N.</i> Effect of Cryopreservation on Pluripotency Gene Expression in Ehrlich Carcinoma Cells of Different Terms of Development.....	185
<i>Krasnikova A.O., Kasian N.A., Vashchenko O.V., Lisetski L.N., Kompaniets A.M., Zinchenko A.V., Soloviov D.V., Bulavin L.A.</i> Effect of Oxyethylated Glycerol Cryoprotectants on DPPC Model Lipid Membranes Structure and Phase.....	186
<i>Goryachaya I.P.</i> Effect of Antiseptic-Stimulator ASD-2 on Resistance of Bovine Erythrocyte Membranes to Cryoexposures.....	187
<i>Zharkova Ye.Ye., Gulevsky A.K.</i> Influence of Human Cord Blood Low-Molecular Fraction (below 5 kDa) on Morphological and Functional Characteristics of Erythrocytes after Hypothermic Storage.....	188
<i>Trutaeva I.A., Kiroshka V.V., Bozhkova Yu.O., Bondarenko T.P.</i> Optimization of Ovarian Tissue Saturation with and Washing of Penetrating Cryoprotectants Solutions.....	189
<i>Plaksina E.M., Sidorenko O.S., Bozhok G.A.</i> Morphological and Phenotypic Peculiarities of Cytospheres Forming in Adrenal Cell Cultures of Neonatal Piglets in Normal and Low Adhesive Conditions.....	190
<i>Govor I.V.</i> Investigation of Conformational Changes in Proteins Using Donor-Acceptor Pair of Fluorescent Probes.....	191
<i>Chub O.V., Musatova I.B., Prokopyuk V.Yu., Karpenko V.G.</i> Effect of Implantation of Cryopreserved Placental Explants on Behaviour Structure in Female Mice of Late Ontogenesis.....	192
<i>Korobkova A.V., Kompaniets A.M.</i> Cryopreservation of Platelet Concentrates Under Moderately Low Temperatures (-70...-80°C) with Preservatives Based on Combination of Cryoprotectants.....	193
<i>Ischenko I.O., Vlasov A.A., Kovalev G.A., Naumova O.V., Sandomirsky B.P.</i> Characteristics of Cold Wounds Under Therapy With Cryopreserved Cord Blood Serum.....	194
<i>Vlasov O.O.</i> <i>In Vivo</i> Study of Effect of C60 Fullerene Aqueous Colloidal Solution on Membrane State and Biochemical Indices.....	195
<i>Dorofeyeva T.V., Kudokotseva O.V.</i> Effect of Storage Temperatures on <i>Escherichia coli</i> M-17 Cell Viability.....	196
<i>Kavelina A.S., Popandopulo A.G., Prokopyuk O.S., Savchuk M.V.</i> Creation of 3D Graft of Cornea Surface Layers.....	197
<i>Roenko A.A., Prokopyuk V.Yu., Falko O.V., Shevchenko N.A., Volina V.V., Prokopyuk O.S.</i> Application of Cryopreserved Amniotic Membranes In Therapy of Neurotrophic Ulcers.....	198



Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L)

А.Ю. Пуговкин, Е.Ф. Копейка

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Water Molecules Transfer Through Pike (*Esox lucius* L) Spermatozoa Membranes

A.Yu. Puhovkin, E.F. Kopeika

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

Для обоснованного выбора режимов и сред криоконсервирования и, следовательно, эффективного сохранения генетического материала рыб необходимо более углубленное изучение таких параметров как проницаемость мембран и энергия активации переноса веществ через мембраны сперматозоидов рыб.

Цель исследования – определить осмотическую резистентность сперматозоидов щуки, коэффициент проницаемости мембран для молекул воды и энергию активации переноса молекул воды через мембраны клеток.

Сперму получали в период нереста от самцов щуки массой 1–1,5 кг. Осмотические реакции сперматозоидов исследовали с помощью спектрофотометрического метода [Пуговкин А.Ю. и соавт., 2014] на основании данных о динамике светопропускания суспензий клеток, помещенных в дистиллированную воду и растворы NaCl. Коэффициент проницаемости плазматических мембран сперматозоидов (L_p) для молекул воды определяли, сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени с данными, полученными при решении уравнений теоретической модели. Энергию активации (E_a) процесса переноса веществ через мембраны клеток рассчитывали из зависимостей $\ln L_p(1/T)$, наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен E_a/R , где R – универсальная газовая постоянная.

Проницаемость мембран сперматозоидов щуки для молекул воды составляет $(0,033 \pm 0,007)$ мкм/(атм×мин) (15°C). Снижение проницаемости мембран сперматозоидов для молекул воды в диапазоне $30 \dots 10^\circ\text{C}$ характеризуется энергией активации (64 ± 5) кДж/моль, что свидетельствует о проникновении воды в клетку путем пассивной диффузии через липидный бислой. Характерное время проникновения воды в клетку зависит от осмолярности среды инкубации клеток. Сперматозоиды щуки по реакции на среды различной осмолярности близки к идеальным осмометрам. Известно, что скорость и продолжительность движения, а также относительное число подвижных сперматозоидов зависит от осмолярности, ионного состава и pH среды активации [Alavi S.M.H. и соавт., 2009]. В этом контексте, поддержание осмотического равновесия является одной из наиболее важных функций мембран сперматозоидов, поскольку в процессе криоконсервирования возникают значительные перепады осмотического давления на мембране.

Разработанные нами подходы позволяют исследовать осмотическую толерантность сперматозоидов некоторых пресноводных рыб, могут быть использованы как простые и быстрые тесты функционального состояния клеточных мембран. Полученные результаты способствуют теоретически обоснованному выбору криозащитных сред и режимов криоконсервирования сперматозоидов.

Membrane permeability and activation energy of the substances transfer through the fish spermatozoa membranes should be studied more profoundly, since they are necessary for the reasonable choice of cryopreservation regimens and media, and, consequently, for an effective preservation of fish genetic material.

The objective of the study was to determine the osmotic resistance of pike spermatozoa, the coefficient of membrane permeability for water molecules and the values of activation energy for water molecules transfer through the cell membranes.

Sperm were obtained during the spawning season from males of 1–1.5 kg weight. Osmotic reactions of spermatozoa were studied using spectrophotometric method [Puhovkin A. Yu. *et al.*, 2014] on the basis of data concerning light transmission dynamics of cell suspensions placed into distilled water and NaCl solutions. Permeability coefficient of pike spermatozoa plasma membranes for water molecules (L_p) was determined by fitting the experimental dependencies of cell normalized volumes vs. time and the curve resulted from the data of solved theoretical model equations in given experimental conditions. Activation energy (E_a) of the substances transfer through cell membranes was calculated using $\ln L_p(1/T)$ dependencies, which slope according to Arrhenius equation was equal to E_a/R , where R was universal gas constant.

The pike spermatozoa membranes permeability for water molecules was (0.033 ± 0.007) $\mu\text{m}/(\text{atm} \times \text{min})$ (15°C). The decrease of pike spermatozoa membrane permeability for water molecules within $30 \dots 10^\circ\text{C}$ range was characterized by activation energy of (64 ± 5) kJ/mol, that indicated about the water molecules penetration into spermatozoa via a passive diffusion through the lipid bilayer. Characteristic time of water penetration into a cell depends on the osmolarity of cells incubation medium. By the reaction to media of different osmolarity pike spermatozoa are close to ideal osmometers. It is known that the velocity and duration of movement, as well as the relative number of motile spermatozoa are dependent on the osmolarity, ionic composition and pH of activation medium [Alavi S.M.H. *et al.*, 2009]. In this regard, the maintenance of osmotic equilibrium is one of the most important functions of spermatozoa membranes, because there are significant differences in osmotic pressure on the membrane during cryopreservation.

Developed approaches allow the study of osmotic tolerance of some freshwater fish spermatozoa, also they can be used as simple and quick tests of functional state of cell membranes. The obtained results facilitate the reasonable choice of cryoprotective media and modes of sperm cryopreservation.



Влияние повторных циклов ритмических криовоздействий (-120°C) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс

Ю.В. Мартынова, В.Г. Бабийчук

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Repeated Cycles of Rhythmic Cold Exposures (-120°C) on Ultrastructure Organization of Myocardium Blood Capillaries

Endotheliocytes in Dynamics of Rats' Aging

Yu.V. Martynova, V.G. Babiichuk

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

Общее охлаждение организма при экстремальных температурах улучшает его функциональное состояние, повышает адаптационный потенциал. Несмотря на распространенность применения 10 сеансов общего охлаждения организма, имеются данные [Lubkowska A. и соавт., 2012] о необходимости применения более длительной серии этих процедур для достижения благоприятных адаптивных изменений. Показано, что ритмические экстремальные холодовые воздействия (РЭХВ, -120°C) в отличие от стандартной методики охлаждения способствуют повышению внутриклеточного метаболизма животных [Бабийчук В.Г., 2010]. В то же время работы, касающиеся изучения эндотелиальной дисфункции при старении организма, направлены в основном на исследование биохимических характеристик процесса, а картина морфологических преобразований на субклеточном уровне остается нераскрыта. В связи с этим целью нашей работы было изучить влияние повторных циклов РЭХВ (-120°C) на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда в динамике старения крыс.

Исследования проводили на белых беспородных крысах-самцах в процессе их старения (возраст 6, 12 и 18 месяцев). Животных разных возрастных групп разделяли на интактных и опытных, которым проводили РЭХВ (-120°C , 2 мин). Каждые 6 месяцев цикл охлаждения, состоящий из 9 процедур, повторяли и спустя 30 дней животных выводили из эксперимента путем декапитации, осуществляли забор ткани миокарда для проведения ультрамикроскопических исследований с помощью электронной микроскопии.

Анализ субмикроскопической организации эндотелиоцитов кровеносных капилляров миокарда крыс 6-месячного возраста на фоне РЭХВ показал отсутствие существенных изменений, однако отмечено проявление внутриклеточных реакций на стрессовое воздействие. Незначительным изменениям подвергались органеллы 12-месячных крыс после РЭХВ. Характерным для этой группы было увеличение количества микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме эндотелиоцитов и гипертрофия комплекса Гольджи. Наибольшие изменения выявлены у третьей возрастной группы животных: для интактных крыс эти преобразования носили деактивационный характер, указывающий на начало возрастных преобразований, в то же время, как и в группе РЭХВ, напротив, происходила активация внутриклеточных синтетических процессов. Результаты наших исследований показывают, что применение повторных циклов РЭХВ, начиная с молодого возраста, не оказывает негативного влияния на ультраструктурную организацию эндотелиоцитов миокарда и повышает уровень синтетической активности и энергообеспечения в более поздние возрастные периоды.

The whole body cooling (WBC) at the extreme temperature improves its functional state and enhances its adaptive potential. Despite the widespread use of 10 sessions course of the WBC, there are evidences [A. Lubkowska *et al.*, 2012] of mandatory longer series of the procedures to be used to achieve favorable adaptive changes. There was shown that the rhythmic extreme cold exposures (RECEs, -120°C), unlike the standard method of cooling contributed to increase of animals' intracellular metabolism [V.G. Babiichuk, 2010]. At the same time the investigations of the endothelial dysfunction associated with aging are basically directed on the study of biochemical features of this process, while the morphological subcellular transformations have not been elucidated yet. Therefore the aim of our study was to investigate the influence of repeated cycles of RECEs (-120°C) on ultrastructure organization of myocardium blood capillaries endotheliocytes in dynamics of rats' aging.

Investigations were performed in white breedless male rats during their aging (age of 6, 12, 18 months). The animals of various age groups were divided into intact ones and the test ones undergoing RECEs (-120°C , for 2 min). Each 6 month the cooling cycle was repeated and the animals were sacrificed by decapitation 30 days after. The pieces of myocardium tissue were collected for ultramicroscopic study by electron microscopy.

Analysis of submicroscopic organization of myocardium blood capillary endotheliocytes of 6 months age rats on the background of RECEs revealed no significant changes, however there was indicated a manifestation of intracellular reactions to stressful influence. Only the minor changes were found in the organelles of 12-month-old rats after RECEs. Typical for this group was an increase in the number of micropinocytotic vesicles in the cytoplasm of endothelial cells and hypertrophy of the Golgi complex as well. The most significant transformations were identified in the third age group of animals: they were of inactivation nature and pointed to the initiation of age-associated alterations in the intact rats, while in RECEs group we revealed an activation of intracellular synthetic processes occurred. The results show that the application of repeated cycles of RECEs starting from a young age has no negative impact on ultrastructural organization of myocardium endothelial cells and increases a level of synthetic activity and energy supply at later age periods.



Хранение инкапсулированных сфероидов, состоящих из клеток печени, при -80°C после хранения при температуре жидкого азота

P. Kilbride¹, C. Selden¹, B. Fuller², J. Morris³

¹UCL Institute for Liver and Digestive Health, Royal Free Hospital Campus, London, UK

²UCL Department of Surgery, Royal Free Hospital Campus, London, UK

³Asymptote Ltd., St. John's Innovation Centre, Cambridge, UK

Storage of Encapsulated Liver Cell Spheroids at -80°C after Storage at Liquid Nitrogen Temperatures

P. Kilbride¹, C. Selden¹, B. Fuller², J. Morris³

¹UCL Institute for Liver and Digestive Health, Royal Free Hospital Campus, London, UK

²UCL Department of Surgery, Royal Free Hospital Campus, London, UK

³Asymptote Ltd., St. John's Innovation Centre, Cambridge, UK

Необходимым условием клинического применения многих биоинженерных тканей является их криоконсервирование и отогрев при первой необходимости. В данном случае может возникнуть вопрос относительно адекватного способа транспортировки таких тканей в отогретом либо криоконсервированном виде.

В работе изучено влияние различных вариантов хранения перед отогревом инкапсулированных в альгинате сфероидов из клеток печени (иСКП), предназначенных для использования в аппарате искусственной печени [1]. Целью исследования было моделирование транспортировки иСКП при температурах жидкого азота (-196°C) или сухого льда (-80°C).

Криоконсервированные при температуре жидкого азота иСКП отогревали и хранили при -80°C в течение 1, 4 или 8 суток перед оттаиванием либо оттаивали сразу после извлечения из жидкого азота без промежуточного хранения при -80°C . Через 72 ч после размораживания количество жизнеспособных клеток (определенное в тесте с окрашиванием пропидий иодидом/флуоресцеин диацетатом [1, 2]) составляло ($74,03 \pm 8,35$), ($46,03 \pm 1,96$), ($55,14 \pm 3,65$) и ($1,93 \pm 0,62$) млн кл/мл соответственно после отогрева без хранения при -80°C , а также хранения при -80°C в течение 1, 4 и 8 суток. Содержание альфа-1-фетопротеина [2] через 2-е суток после размораживания составило ($56,3 \pm 0,6$) нг/мл иСКП/24 ч в образцах без хранения при -80°C , ($3,1 \pm 0,3$) нг/мл иСКП/24 ч – после суток хранения при -80°C . В образцах, хранившихся при -80°C больше суток содержание данного белка было незначительным. Установлено, что пребывание при -80°C после хранения при -196°C (моделирование транспортировки в сухом льду) вызывает существенное повреждение иСКП по сравнению с отогретыми непосредственно после извлечения из жидкого азота без промежуточного хранения при -80°C . При любом варианте хранения при -80°C (после пребывания в жидком азоте) снижается жизнеспособность и общее количество клеток, потребление глюкозы и синтез альфа-1-фетопротеина.

Таким образом, аппарат искусственной печени, содержащий деконсервированные сфероиды из клеток печени, инкапсулированные в альгинате, может использоваться после транспортировки при температурах ниже температуры сухого льда либо после транспортировки в отогретом состоянии.

1. Erro E. et al. *Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System*. *BioResearch Open Access* 2013; 2(1): 1–11.

2. Kilbride P. et al. *A scale down process for the development of large volume cryopreservation*. *Cryobiology* 2014; 69(3): 367–375.

For many bioengineered tissues to have feasible clinical application, they must be cryopreserved for future thaw on demand. This raises the important question of transport of these tissues – either transport thawed or still cryopreserved is an option.

This study examined different thermal histories on warming to mimic transport at liquid nitrogen (-196°C) or dry ice (-80°C) temperatures of alginate encapsulated liver spheroids (ELS) for use in a bioartificial liver device (BAL) [1].

ELS cryopreserved at LN_2 temperatures were warmed to and held at -80°C for either 1, 4, or 8 days prior to thaw, and this was compared to ELS thawed directly from LN_2 with no stop at -80°C . At 72 h post thaw, viable cell number, determined through PI/FDA staining [1, 2] was recorded at (74.03 ± 8.35) million cells/ml, (46.03 ± 1.96) million cells/ml, (55.14 ± 3.65) million cells/ml, and (1.93 ± 0.62) million cells/ml for samples experiencing no hold at -80°C , a 1 day hold at -80°C , a 4 day hold at -80°C , and an 8 day hold at -80°C , respectively. Alpha-1-fetoprotein production was measured [2] at (56.3 ± 0.6) ng/ml ELS/24 h at 2 days post thaw for samples experiencing no hold at -80°C , this compares with (3.1 ± 0.3) ng/ml ELS/24 h in samples experiencing a 1 day hold at -80°C , and protein production was negligible in samples held at -80°C for periods greater than 1 day. It is determined that holding at -80°C after -196°C storage (mimicking dry ice transport) leads to ELS expressing heavy damage over those thawed directly from liquid nitrogen. Any storage at -80°C after -196°C storage results in lower cell viability, cell count, glucose consumption and alpha-1-fetoprotein production.

We conclude that for a bioartificial liver device composed of alginate encapsulated liver spheroids to be used after cryopreservation, it requires transport below dry ice temperatures or must be thawed prior to transport.

1. Erro E. et al. *Bioengineering the Liver: Scale-Up and Cool Chain Delivery of the Liver Cell Biomass for Clinical Targeting in a Bioartificial Liver Support System*. *BioResearch Open Access* 2013; 2(1): 1–11.

2. Kilbride P. et al. *A scale down process for the development of large volume cryopreservation*. *Cryobiology* 2014; 69(3): 367–375.



Определение вероятности образования микроскопических пор в мембранах криоконсервированных сперматозоидов карпа (*Cyprinus carpio*)

К.И. Буцкий¹, Т.С. Дюбко¹, И.А. Федуняева², А.Т. Татарец², Е.Ф. Копейка¹

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

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

Study of Probability of Microscopic Pore Formation in Post-Thaw Sperm Membranes

K.I. Butskiy¹, T.S. Dyubko¹, I.A. Fedunyayeva², A.L. Tatarets², E.F. Kopeika¹

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, Ukraine

Сперматозоиды пресноводных рыб, не утратившие подвижность после криоконсервирования, приобретают повышенную чувствительность к изменениям осмотичности среды. Природа этого явления до сих пор не объяснена. Одной из причин подобного эффекта, возможно, является образование микропор в мембранах сперматозоидов в процессе криоконсервирования [Копейка Е.Ф., 2015]. Поэтому целью данной работы было определить вероятность образования пор и их размер в сперматозоидах карпов, криоконсервированных по 3-этапной программе в солевой криозащитной среде с этиленгликолем [Копейка Е.Ф., 1986].

Для выявления пор были использованы флуоресцентные красители Square-460, DSP-8-4, DSP-16-4 с м. м. 423, 509 и 621, конечная концентрация которых составляла 1–6 мкМ. Интенсивность флуоресценции оценивали до и после криоконсервирования на конфокальном микроскопе LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия).

В результате исследования были установлены различия в локализации и интенсивности флуоресценции исследуемых зондов в сперматозоидах до и после криоконсервирования. После криоконсервирования спермы с зондом Square-460 количество клеток с высокой интенсивностью флуоресценции практически не изменилось по сравнению с контролем, тогда как с DSP-16-4 оно было на 40% больше. Также оценивали число сперматозоидов с агрегатами красителя. При окрашивании Square-460 и DSP-8-4 количество клеток с агрегатами под воздействием криоконсервирования не претерпевало существенных изменений, в то время как для DSP-16-4 оно увеличилось более чем наполовину. Тот факт, что количество проникших зондов с молекулярной массой 423 и 508 не изменялось после криоконсервирования, а DSP-16-4 с массой 621 проникало значительно больше, позволяет оценить размер образовавшихся дефектов в мембране. Ранее был рассчитан гидродинамический радиус молекул с различной молекулярной массой [Антонов В.Ф., 2008], для ПЭГ-600 он составлял 0,78 нм.

Таким образом, в результате этих экспериментов было впервые установлено образование пор в криоконсервированных сперматозоидах, радиус которых составляет более 0,78 нм. Это может быть причиной полной утраты подвижности частью клеток и повышения осмотической чувствительности мембран у оставшейся части, способной активироваться.

Spermatozoa of freshwater fish which have not lost the motility after freeze-thawing gain an increased sensitivity to the environmental osmoticity changes. This phenomenon basics have not been elucidated yet. There was supposed that one of the causes of this effect was the formation of micropores in spermatozoa membranes during cryopreservation [Kopeika E.F., 2015]. Therefore the aim of this work was to examine the probability of forming the pores and their dimensions in common carp spermatozoa cryopreserved according to three-step program in a saline cryoprotective medium with ethylene glycol [Kopeika E.F., 1986].

To reveal the pores there were used Square-460, DSP-8-4, DSP-16-4 fluorescent dyes with molecular weights of 423, 509, 621, the final concentration of those made 1–6 μ M. The fluorescence intensity was assessed prior to and after cryopreservation with confocal microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

The research results demonstrated the differences in the localization and intensity of fluorescence of the investigated probes in spermatozoa before and after cryopreservation. After cryopreservation of the sperm with Square-460 probe the number of cells with high fluorescence intensity did not virtually changed if compared with the control, but when using the probe DSP-16-4 it was by 40% higher, that correlated with a decreased motility of spermatozoa. In addition, there was found the number of spermatozoa with dye aggregates. Staining with Square 460 and DSP-8-4 did not changed significantly the number of cells with aggregates following cryopreservation effect, whilst for DSP-16-4 it was increased by more than a half. The fact that the amount of penetrated probe with molecular weight of 423 and 508 was not change after cryopreservation, and DSP-16-4 with molecular weight of 620 penetrated much better after cryopreservation, allowed us to estimate the dimensions of the resulting defects in membranes. Recently the hydrodynamic radius of molecules with different molecular weights was calculated [Antonov V.F., 2008], for PEG-600 it made 0.78 nm.

Thus, the performed experiments allowed to establish for the first time the formation of pores in cryopreserved spermatozoa, the approximate radius of those was more than 0.78 nm. This may be the cause of a complete loss of the motility by a part of the cells and an increased sensitivity of membranes in the remained part being capable of activating.



Влияние водородных связей на диаграммы состояния криопротекторных растворов

С.С. Севастьянов, А.И. Осецкий

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Hydrogen Bonding on the State Diagram 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*

Способность криопротекторных веществ связывать молекулы воды с помощью водородных связей (Н-связей) лежит в основе их криозащитных свойств. При этом для большинства используемых в практической криобиологии криопротекторных растворов значения энергии Н-связей лежат в пределах 3–7 ккал/моль. Поскольку среднее значение энергии связывания $\langle \epsilon_H \rangle$ в данном случае относительно небольшое ($2,5 \times 10^3$ К), то влияние Н-связей на структуру раствора при комнатных температурах незначительно. Это следует из оценки частоты w разрыва этих связей в $A_n B_m$ -комплексах, где n и m – количество молекул воды A и криопротекторного вещества B соответственно.

Согласно уравнению Аррениуса

$$w = v \cdot \varphi \cdot \exp\left(-\frac{\langle \epsilon_H \rangle}{k \cdot T}\right),$$

где v – частота тепловых колебаний молекул в АВ-комплексе; φ – стерический фактор; постоянная Больцмана ($k = 1,38 \times 10^{-16}$ эрг/град); T – температура.

Из представленного уравнения следует, что при комнатных температурах $w \sim 10^6$ с⁻¹, т. е. большую часть времени молекулы воды в растворе находятся в свободном состоянии. Однако с понижением температуры ситуация кардинально изменяется. Так, уже при $T < 200$ К величина w уменьшается до значений порядка 10 с⁻¹ и ниже, т. е. стабильность АВ-комплексов резко повышается. Это практически исключает образование отдельных кристаллов льда и, как следствие, эвтектическую кристаллизацию охлаждаемых криопротекторных растворов.

В связи с этим в работе рассматриваются принципы построения диаграмм состояния, описывающих кластерную кристаллизацию, которая является альтернативой эвтектической. Согласно этим диаграммам микрокристаллы льда образуются в составе кластеров без разрыва Н-связей. Данный процесс протекает в широком температурном диапазоне и завершается при достижении температур стеклования жидких микрофаз. Этот факт исключает целый ряд противоречий между экспериментальными данными и закономерностями эвтектической кристаллизации.

В работе также анализируется соответствие кластерных диаграмм состояния правилу равновесия фаз и вытекающему из него условию размерности границ между областями существования фаз.

Cryoprotective substance's ability to bind water molecules via hydrogen bonding (HB) underlies their cryoprotective properties. For the majority of cryoprotective solutions used in practical cryobiology the value of HB energy lies in the range of 3–7 kcal/mol. Since the average value of the binding energy $\langle \epsilon_H \rangle$ in this case is relatively small (2.5×10^3 K), the effect of HB influence on the solution structure at room temperature is negligible. It follows from the estimation of w , the frequency of rupture of these bonds in complexes $A_n B_m$, where n and m are the number of water molecules A and cryoprotective agent B , respectively.

According to Arrhenius equation,

$$w = v \cdot \varphi \cdot \exp\left(-\frac{\langle \epsilon_H \rangle}{k \cdot T}\right),$$

where v is the frequency of the thermal vibrations of molecules in complex AB, φ is the steric factor, k is Boltzmann constant (1.38×10^{-16} erg/deg), T is temperature.

From the equation it implies that at room temperature $w \sim 10^6$ sec⁻¹, i.e. most of the time the water molecules in a solution are in a free state. However, with decreasing temperature, the situation is substantially changed. For example, already at $T < 200$ K the value of w decreases to values of the order 10 sec⁻¹ or less, i.e. the stability of AB-complexes increases. This almost eliminates the formation of individual ice crystals and, as a result, eutectic crystallization of cooled cryoprotective solutions.

In this regard, the paper deals with the principles of plotting of state diagrams describing the cluster crystallization, which is an alternative to the eutectic one. According to these diagrams, the ice microcrystals are formed within clusters without breaking HB. This process occurs in a wide temperature range, and terminates when achieving the glass transition temperature of liquid microphases. This fact eliminates a range of discrepancies between the experimental data and the laws of eutectic crystallization.

The study also involves the analysis of conforming the cluster phase diagrams to the rule of phase equilibrium and stemming therefrom condition of dimensions of the boundaries between regions of phase existence.



Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах

В.В. Буркова^{1,2}, А.А. Лаврик²

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

²ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

Activity of Rabies Virus Strain CVS (20% Cerebral Suspension) After Storage at Different Temperatures

V.V. Burkova^{1,2}, A.A. Lavrik²

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

²Pharmstandard-Biolek PJSC, Kharkov, Ukraine

Для проверки иммуногенности инактивированной антирабической вакцины ВОЗ рекомендует использовать NIH-test (National Institutes of Health Test) [Wilbur L.A. и соавт., 1996]. Активность антирабического иммуноглобулина определяли с помощью MNT (Mouse Neutralization Test – реакция нейтрализации) [Fitzgerald E.A., 1996]. В данных реакциях используют аттенуированный штамм вируса бешенства CVS, пассированный в мозге мышей. В предыдущих исследованиях нами показано, что в ходе хранения аттенуированных культуральных штаммов вируса бешенства при низких температурах их активность снижается [Буркова В.В. и соавт., 2014].

Цель данного исследования – изучить активность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при температуре -20 , -80°C .

Вирус получали путем пассирования в мозговой ткани белых лабораторных мышей. Вирусную суспензию фасовали в криопробирки и замораживали при -20 и -80°C . Инфекционную активность исследовали после хранения образцов в течение 2 недель, 1, 3 и 6 месяцев. После низкотемпературного хранения мозговую суспензию размораживали и готовили серийные разведения. Изменение вирулентности определено при интрацеребральном заражении лабораторных мышей после титрации. Таким образом были смоделированы условия постановки MNT и NIH-test. В качестве контроля использовали данные по активности вирусной суспензии до замораживания. При моделировании условий постановки MNT приготовленные вирусные разведения инкубировали при 37°C в течение 100 мин и затем вводили в мозг животных. Титр вируса рассчитывали с помощью формулы Спирмена-Карбера и выражали в $IgLD50$ [Fitzgerald E.A., 1996; Wilbur L.A. и соавт., 1996].

Через 6 месяцев хранения при -20°C инфекционная активность вируса снизилась с $(7,75 \pm 0,15)$ до $(5,47 \pm 0,12) IgLD50$, и до $(6,18 \pm 0,15) IgLD50$ – после хранения при -80°C . После моделирования условий постановки MNT активность вируса значимо снижалась по сравнению с образцом, поставленным в тест сразу после размораживания, на $(15,57 \pm 3,31)\%$.

Результаты данного исследования свидетельствуют о снижении активности суспензии контрольного штамма вируса бешенства CVS после хранения при низких температурах (-20 и -80°C) и последующего инкубирования при 37°C . Полученные результаты подтверждают необходимость разработки коэффициента снижения вирулентности с целью пересчета заражающей дозы при постановке контрольных исследований активности антирабических препаратов.

NIH-test (National Institutes of Health Test) is recommended by WHO to examine immunogenicity of an inactivated rabies vaccine [Wilbur L.A. *et al.*, 1996]. Activity of rabies immunoglobulin was determined by MNT (Mouse Neutralization Test) [Fitzgerald E.A., 1996]. In these reactions an attenuated strain of rabies virus CVS, passaged in murine brain is used. In previous studies we have shown that during storage of attenuated culture strains of rabies virus at low temperatures, their activity is reduced [Burkova V.V. *et al.*, 2014].

The research aim was to study the activity of control strain of rabies virus CVS (20% cerebral suspension) after storage at -20 and -80°C .

The virus was obtained by passaging in brain tissue of white laboratory mice. The viral suspension was packed into cryovials and frozen at -20 and -80°C . Infectious activity was assayed in the samples after storage for 2 weeks, 1, 3 and 6 months. After low-temperature storage cerebral suspension was frozen-thawed and serial dilutions were prepared. Virulence change was determined at intracerebral infection of laboratory mice after titration. Thus, the conditions of MNT and NIH-test setting were simulated. The data on activity of viral suspension prior to freezing were the control. During MNT simulation the prepared viral dilutions were incubated at 37°C for 100 minutes and then injected into animal brain. The virus titer was calculated using Spearman-Karber formula and expressed in $IgLD50$ [Fitzgerald E.A., 1996; Wilbur L.A. *et al.*, 1996].

After 6 months of storage at -20°C infectious virus activity decreased from (7.75 ± 0.15) down to $(5.47 \pm 0.12) IgLD50$, and after storage at -80°C it reduced down to $(6.18 \pm 0.15) IgLD50$. After MNT simulation virus activity was significantly reduced if compared with the sample tested immediately after thawing by $(15.57 \pm 3.31)\%$.

The results of this study testify to a reduction of activity in suspension of control strain of rabies virus CVS after storage at low temperatures (-20 and -80°C) and the following incubation at 37°C . These results confirm the necessity to develop a coefficient of virulence reduction in order to recalculate the infection dose in control tests of rabies preparations activity.



Анализ уровня экспрессии генов в криоконсервированных клетках фетальной печени в процессе рекультивирования

П.А. Борисов, А.Ю. Димитров, А.Н. Гольцев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Analysis of Gene Expression in Cryopreserved Fetal Liver Cells During Reculturing

P.A. Borisov, A.Yu. Dimitrov, A.N. Goltsev

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

Известно, что криоконсервирование – мощный физико-химический стрессорный фактор, который обуславливает структурно-функциональные изменения многих биообъектов, в том числе клеток фетальной печени (КФП). Такого рода модификации могут затрагивать различные уровни регуляции состояния КФП, в частности и геномный, и влиять на терапевтический потенциал биоматериала. Данный феномен должен учитываться при оптимизации протоколов криоконсервирования и применения КФП с целью повышения эффективности лечения различных заболеваний. При этом остается неизученным вопрос влияния факторов криоконсервирования на гены КФП после отогрева, а также динамика изменения их экспрессии в процессе рекультивирования. Поэтому целью данной работы было исследовать уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* и *ido* в КФП в течение 7 суток после криоконсервирования.

Суспензию КФП получали из плодов мышей линии СВА/Н 14-и суток гестации. Криоконсервировали КФП под защитой 10% ДМСО со скоростью охлаждения 1 град/мин до -25°C с последующим погружением в жидкий азот на программном замораживателе УОП-6 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). Отогрев проводили на водяной бане при 41°C . Нативные и криоконсервированные КФП культивировали в среде Iscove с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в чашках Петри при 37°C в течение 7 суток. Экспрессию генов *nanog*, *oct4*, *sox2*, *ido* в КФП определяли методом ПЦР непосредственно после криоконсервирования, через 1 ч, 1, 3 и 7 суток.

В образцах, полученных сразу после криоконсервирования, уровень экспрессии всех указанных генов снижался. Однако при рекультивировании в течение недели направленность изменения и временной промежуток восстановления уровня экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* и *ido* до контрольного были индивидуальны. Полученные данные свидетельствуют о важности временного параметра при терапевтическом использовании криоконсервированных КФП.

Cryopreservation is known to be a powerful physical and chemical stress factor, which causes structural and functional changes in many biological objects, including fetal liver cells (FLCs). These modifications may involve various levels of FLCs state regulation, in particular, genomic as well as affect a therapeutic potential of biomaterial. This phenomenon must be taken into account when optimizing the cryopreservation protocols and FLCs application for increasing the treatment efficiency for various diseases. However, the question about the post-effects of cryopreservation on FLCs genes after thawing has remained unstudied, as well as the dynamics of changes in their expression during re-culturing. Therefore, the aim of this study was to investigate the level of expression of *nanog*, *oct4*, *sox2* and *ido* genes in FLCs within 7 days after cryopreservation.

The FLC suspension was derived from fetuses of CBA/H mice of 14 gestation days. FLCs were cryopreserved under the protection of 10% DMSO at a cooling rate of 1 deg/min down to -25°C followed by an immersion in a liquid nitrogen using a programmable freezer UOP-6 (Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C). Thawing was performed in a water bath at 41°C . Native and cryopreserved FLCs were cultured in Iscove's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in Petri dishes at 37°C for 7 days. Expression of *nanog*, *oct4*, *sox2*, *ido* genes in FLCs was examined by PCR directly after cryopreservation, 1 hr, 1, 3 and 7 days later.

In the samples obtained immediately after cryopreservation, the expression rate of all these genes was reduced. However, during one week re-culturing the power of changes and duration of the expression recovery for *nanog*, *oct4*, *sox2* and *ido* genes up to the to control value were specific. The findings suggest the importance of a time parameter in therapeutic use of cryopreserved FLCs.



**Ответ мезенхимальных стромальных клеток на криоконсервирование
в составе скаффолдов, полученных из скелетов морских
губок *lanthella basta* (пилотное исследование)**

В.В. Муценко, Е.Ю. Рогульская, Д.Н. Тарусин
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**The Response of Mesenchymal Stromal Cells to Cryopreservation within Scaffolds
Derived from the Skeletons of Marine Sponges *lanthella basta* (Pilot Study)**

V.V. Mutsenko, O.Yu. Rogulska, D.N. Tarusin
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в суспензии по общепринятому протоколу (1 град/мин, 10% ДМСО и 20% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота) обеспечивает возможность их многократного применения в экспериментальных и клинических целях. В то же время концепция создания биобанков тканеподобных структур, обусловленная требованиями быстроразвивающейся области тканевой инженерии, расширяет возможности применения МСК и ставит перед криобиологами задачу поиска подходов для сохранения этих клеток в адгезированном состоянии в составе трехмерного скаффолда в силу сокращения временных затрат.

В настоящей работе исследовали возможность получения и криоконсервирования скаффолдов на основе хитиновых скелетов морских губок *lanthella basta*, заселенных МСК человека.

Скелеты очищали, заселяли МСК и культивировали в течение 21 суток. Затем полученные скаффолды криоконсервировали под защитой 10% ДМСО и 20% ЭС с использованием стандартного метода, разработанного для МСК в суспензии. Оценку жизнеспособности проводили сразу после криоконсервирования по окрашиванию флуоресцеин диацетатом/пропидий йодидом, а метаболического статуса – сразу после криоконсервирования и через сутки по Alamar Blue-тесту. Адипогенную дифференцировку клеток оценивали с помощью окрашивания нильским красным.

Клетки адгезировали и распластывались на поверхностях хитиновых скаффолдов, в ходе их культивирования пролиферировали, заполняя свободное пространство пор. Стандартный протокол криоконсервирования продемонстрировал высокую криочувствительность скаффолдов, заселенных МСК. В некоторых случаях отмечалось повреждение скаффолдов *per se*. Деконсервированные образцы содержали значительную часть FDA-позитивных клеток, а их метаболическая активность сохранялась на уровне $(46,8 \pm 5,8)\%$ и не уменьшалась на 1-е сутки рекультивирования. Через 21 сутки клетки, криоконсервированные в составе хитинового скаффолда, были способны дифференцироваться в адипогенном направлении.

Данная работа может послужить основой для дальнейшей разработки методов криоконсервирования стволовых клеток в составе трехмерных тканеинженерных конструкций.

Cryopreservation of mesenchymal stromal cells (MSCs) in suspension according to conventional protocol (1 deg/min, 10% DMSO and 20% fetal bovine serum, FBS) provides an opportunity for their multiple applications in experimental and clinical settings. At the same time, a concept of establishing biobanks for tissue-like structures based on the requirements of rapidly evolving field of tissue engineering extends an application field of MSCs and sets a task for cryobiologists to search for approaches for storing them in adhered state within three-dimensional scaffold in virtue of shortening time expenditure.

In the present study we investigated the possibility of deriving and cryopreserving scaffolds based on chitin skeletons of marine sponges *lanthella basta* seeded with human MSCs.

Skeletons were purified, seeded with MSCs and cultured for 21 days. Next, the derived scaffolds were cryopreserved under the protection of 10% DMSO and 20% FBS using the conventional protocol developed for MSCs in suspension. The assessment of viability was performed immediately after cryopreservation by staining with FDA/PI and metabolic status was determined by AB-test both immediately post-thaw and after 1 day. Adipogenic differentiation of the cells was evaluated by staining with Nile Red.

MSCs adhered and spread on surfaces of chitin scaffolds, proliferated in the course of cultivation and filled available pore spaces. Standard cryopreservation protocol demonstrated high cryosensitivity of the scaffolds populated with MSCs. In some cases, damage of the scaffolds *per se* was observed. Thawed samples contained a considerable proportion of FDA-positive cells, their metabolic activity maintained at a level of $(46.8 \pm 5.8)\%$ and did not decrease on day 1 of reculturing. After 21 days the cells cryopreserved within chitin scaffold were able to differentiate into the adipogenic lineage.

This work could serve as a basis for further development of methods for cryopreserving stem cells within three-dimensional tissue-engineered constructs.



Влияние низких температур на гемоглобин, встроенный в альгинатные микросферы

С.Л. Розанова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Low Temperature Influence on Hemoglobin Loaded in Alginate Microspheres

S.L. Rozanova

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

В последние годы альгинатные системы для инкапсулирования нашли широкое применение в фармацевтической промышленности для доставки лекарств орального применения, терапии, а также иммобилизации других молекул [Sachan N.K. и соавт., 2009]. Так, инкапсулированный в микросферы гемоглобин рассматривается как искусственные эритроциты в трансфузионной медицине [Dalmoro A. и соавт., 2012]. Криоконсервирование может быть оптимальным методом хранения инкапсулированного гемоглобина. Целью данной работы было исследовать влияние замораживания-оттаивания на свойства гемоглобина, инкапсулированного в кальций-альгинатные микросферы, а также выяснить, способен ли инкапсулированный гемоглобин переносить кислород.

Альгинатные микросферы, содержащие гемоглобин, получали путем ионотропного гелирования. Замораживание микросфер проводили в воде, физиологическом растворе и фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при температуре -20°C . Функциональную активность гемоглобина анализировали по способности высвобождать кислород в анаэробных условиях с использованием дитионита натрия. Процентное содержание окси-, дезокси- и метгемоглобина в микросферах оценивали по спектрам поглощения гемоглобина. Исследование восстановления ABTS^+ -радикала использовали для оценки стабильности белка.

Показано, что замораживание-оттаивание микросфер, содержащих гемоглобин, приводит к частичной потере гемоглобина, а также к снижению белковой ABTS^+ -радикалвосстанавливающей активности, которое наиболее выражено при использовании воды в качестве среды замораживания. Было показано, что гемоглобин, инкапсулированный в альгинатные микросферы, способен высвобождать кислород в анаэробных условиях. Замораживание микросфер как в физиологическом растворе, так и в ФСБ, не влияло на эту способность. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности клинического применения инкапсулированного в микросферы гемоглобина.

Recently alginate encapsulating systems have found wide applications in pharmaceutical industry as a drug delivery, for therapy and for immobilizing other macromolecules [Sachan N.K. *et al.*, 2009]. In particular, hemoglobin-encapsulated microspheres were considered as artificial erythrocyte substitute in transfusion medicine [Dalmoro A. *et al.*, 2012]. Cryopreservation could be as a proper way of encapsulated hemoglobin storage. Thus, obtaining of the data concerning freeze-thawing influence on properties of hemoglobin encapsulated in calcium alginate microspheres and the elicitation whether encapsulated hemoglobin is still able to transfer oxygen is of great importance for widening perspectives of its clinical usage.

Hemoglobin-loaded alginate microspheres were obtained by ionotropic gelation. Microspheres were frozen in water, physiological solution or phosphate-buffered saline (PBS) down to -20°C . Hemoglobin functional activity was analyzed by ability to release oxygen in anaerobic conditions using sodium dithionite. Percentage of oxy-, deoxy- and methemoglobin in microspheres was detected by alterations in hemoglobin absorption spectra. ABTS^+ radical cation decolorization assay was used to investigate protein stability.

Freeze-thawing of hemoglobin loaded microspheres has been shown to lead to partial hemoglobin loss as well as to the lowering of protein ABTS^+ radical scavenging ability, the most severe in the case of using water as a freezing medium. It has been demonstrated that hemoglobin loaded into alginate microspheres was able to release oxygen in anaerobic condition. Freezing of microspheres both in physiological solution and in PBS did not affect this ability. The obtained results make Hb-loaded microspheres perspective for clinical application.



Стан популяцій ядровмісних клітин кордової крові залежно від методу криоконсервування

О.О. Михайлова, П.М. Зубов

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

State of Human Cord Blood Nucleated Cell Populations Depending on Cryopreservation Method

O.O. Mykhailova, P.M. Zubov

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

Досліджено структурно-функціональний стан та життєздатність різних популяцій ядровмісних клітин (ЯВК, CD45⁺) кордової крові людини (КК), у тому числі й гемопоетичних стовбурових клітин-попередників (CD34⁺), залежно від способів їх виділення з цільної крові, використання кріопротекторів із різним механізмом дії та низьких температур.

Показано високу ефективність виділення ЯВК із цільної КК методом двохетапного центрифугування, який не передбачає використання хімічних речовин і дозволяє виділяти більше 90% CD45⁺- і CD34⁺-клітин без втрати їх життєздатності. Також високу ефективність виділення ЯВК забезпечував метод седиментації у поліглюкіні – більше 80% CD45⁺- і CD34⁺-клітин. Встановлено, що криоконсервування ЯВК, виділених у поліглюкіні, під захистом ДМСО, а також ЯВК виділених двохетапним центрифугуванням, під захистом ПЕГ-1500 дозволяє зберегти у життєздатному стані більше 80% CD45⁺- і більше 90% CD34⁺-клітин.

Показано різну чутливість популяцій ЯВК до пошкоджуючої дії факторів криоконсервування: максимальною кріостійкістю характеризуються лімфоцити і моноцити (життєздатність понад 95 і 90% відповідно). При цьому основне зменшення кількості ЯВК та зниження показника їх життєздатності відбувалось за рахунок гранулоцитів.

Продемонстровано збереження асиметричного розподілу фосfolіпідів у 99% лімфоцитів, 96% моноцитів і 83% гранулоцитів КК, криоконсервованих під захистом як ДМСО, так і ПЕГ-1500, після виділення клітин у поліглюкіні та двохетапного центрифугування відповідно. Встановлено підвищення вмісту в клітинах активних форм кисню після криоконсервування з ДМСО і ПЕГ-1500, яке не є критичним і може розглядатися як реакція клітин на вплив факторів криоконсервування.

Проведений аналіз стадій апоптозу ЯВК показав, що виділення у поліглюкіні та криоконсервування з 5%-м ДМСО, а також виділення методом двохетапного центрифугування та заморожування з 10%-м ПЕГ-1500 зберігало живими (Annexin V-7AAD⁻) більшість клітин, а їх пошкодження відбувалось шляхом некрозу (Annexin V-7AAD⁺). Основний відсоток ушкоджених клітин при використанні будь-якої з технологій криоконсервування припадав на популяцію гранулоцитів, а лімфоцити та моноцити мали високу кріостійкість.

Таким чином, представлені методи криоконсервування, які базуються на виділенні клітин у поліглюкіні та методом двохетапного центрифугування та застосуванні ДМСО і ПЕГ-1500, забезпечують високий рівень збереженості та життєздатності ЯВК, незважаючи на формування АФК, що зумовлює високий потенціал клітин для використання в клінічній практиці.

We studied structural and functional states as well as viability of various populations of human cord blood (CB) nucleated cells (NCs, CD45⁺), including hematopoietic progenitor cells (HPCs, CD34⁺), depending on the method of whole cord blood separation and choice of cryoprotectants with different mechanism of action and low temperatures.

The experiments showed high efficiency of the NCs isolation from the whole CB by the two-step centrifugation without use of additional chemicals that allowed to collect more than 90% of CD45⁺ and CD34⁺ cells without loss of their viability. High efficiency was also provided by sedimentation in dextran solution: more than 80% CD45⁺ and CD34⁺ cells. It was established that NCs isolation in dextran solution and subsequent freezing under 5% DMSO protection, as well as cells isolation by two-step centrifugation and subsequent freezing under 10% PEG-1500 protection, kept viable more than 80% CD45⁺ and 90% CD34⁺ cells. Different sensitivity of NC populations to the damaging effects of cryopreservation factors was shown: lymphocytes and monocytes were the most cryoresistant (more than 95 and 90% viable cells, correspondingly). Herewith, the main decrease in cells amount and their viability was due to granulocytes.

There was shown the preservation of asymmetric phospholipid distribution in 99% lymphocytes, 96% monocytes and 83% granulocytes of CB, cryopreserved under the protection of DMSO and PEG-1500 after cells isolation in dextran solution and by two-step centrifugation respectively. It was established that an increased content of intracellular reactive oxygen species (ROS) after cryopreservation with DMSO and PEG-1500 was not critical and could be considered as cells response to the stress effects of freeze-thawing.

The analysis of apoptosis stages in CB NCs showed that isolation in dextran solution and cryopreservation with 5% DMSO, as well as isolation by two-step centrifugation and cryopreservation with 10% PEG-1500, kept alive (Annexin V-7AAD⁻) the majority of cells, and cell damage occurred primarily by necrosis (Annexin V-7AAD⁺). Major percentage of damaged cells in any of the utilized cryopreservation methods was due to granulocyte population, and lymphocytes and monocytes were highly cryoresistant.

To emphasize, we can conclude that the presented methods of cryopreservation of CB NCs based on isolation in dextran solution and by two-step centrifugation and application of DMSO and PEG-1500, provided a high level of survival and viability in spite of ROS formation, that provided their high potential for application in clinical practice.



Корреляция между stemness-like-состоянием клеток аденокарциномы

Эрлиха и количеством циклов замораживания-отогрева

О.А. Дябина¹, Ю.А. Винник², М.В. Останков¹, Н.А. Бондарович¹, А.Н. Гольцев¹

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

²Харьковская медицинская академия последипломного образования, г. Харьков

Correlation in Stemness-Like State of Ehrlich Carcinoma Cells and Number of Freeze-Thawing Cycles

O.A. Diabina¹, Yu.A. Vinnik², M.V. Ostankov¹, N.A. Bondarovich¹, A.N. Goltsev¹

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

Метод криодеструкции нашел широкое применение при лечении онкологических заболеваний. Дискутабельным остается вопрос относительно выбора условий криовоздействия на опухолевую ткань, в частности температурных режимов, кратности воздействия, количества циклов. Особое внимание уделяется изучению влияния холода на структурные и функциональные характеристики стволовых раковых клеток (СРК), активность которых определяет инициацию и метастазирование опухолей.

Цель исследования – проведение сравнительного анализа влияния однократного и многократного замораживания на структурные и функциональные свойства стволовых раковых клеток в динамике развития аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Клетки АКЭ получали на 7-е (АКЭ-7) и 14-е (АКЭ-14) сутки их культивирования *in vivo* в перитонеальной полости мышей линии BALB/c. Клетки замораживали однократно и многократно (2–4 раза) в асцитической жидкости. Функциональный потенциал размороженных клеток оценивали по интенсивности роста опухоли (объем асцитической жидкости и концентрация клеток) к 7- и 14-м суткам культивирования, одновременно определяя методом проточной цитофлуориметрии содержание в ней наиболее канцерогенных CD44^{high}- и продвинутых в дифференцировке CD44⁺CD24⁻-клеток.

Установлен разный характер изменения функционального статуса СРК с указанным фенотипом после однократного и многократного криовоздействия в зависимости от этапа развития опухолевого процесса. При однократном криовоздействии функциональный потенциал 7-суточной «молодой» культуры был ингибирован, тогда как в отношении 14-суточной «старющей» культуры АКЭ – «ревитализирующий» эффект. После двух- и трехкратного цикла замораживания-отогрева пролиферативная активность клеток обоих сроков роста была ингибирована. При этом в АКЭ-14 была более выраженной, чем у клеток «молодой» культуры. После четырехкратного замораживания-отогрева в суспензиях клеток АКЭ-7 и АКЭ-14 наблюдалось полное отсутствие CD44^{high}-клеток и их пролиферативной активности.

Полученные данные демонстрируют очевидную необходимость применения многократного криовоздействия на АКЭ с целью инактивации функционального статуса СРК и роста опухоли. Значимость многократного криовоздействия на опухолевую ткань возрастает по мере «старения» опухоли, что должно быть принято во внимание при использовании криохирургических методов в клинической онкологии.

Cryoablation is widely used in treatment of oncology diseases. The question as for selecting the conditions of cryoeffect on tumor tissue, in particular, temperature regimens, number of cycles has remained disputable. Special attention is paid to studying the influence of the cold exposure on structural and functional characteristics of cancer stem cells (CSCs), which activity determines the initiation and metastasis of tumors.

In this regard, effect of single and multiple freezing on CSCs in Ehrlich carcinoma (EC) development dynamics was analyzed in this investigation.

EC cells were obtained to the 7th (EC-7) and 14th (EC-14) day of their culturing *in vivo* in peritoneal cavity of BALB/c mice. The cells were single and multiple (2–4 times) frozen in ascitic fluid. Functional potential of thawed cells was assessed on intensity of tumor growth (volume of ascitic fluid and cell concentration) to the 7th and 14th culturing day with simultaneous determination of the content of the most cancerogenic CD44^{high} and advanced in differentiation CD44⁺CD24⁻ cells by flow cytometry.

We found a different pattern of changes in functional state of CSCs with stated phenotype following single and multiple cryoexposure depending on the stage of malignancy. In particular, single cryoeffect caused inhibition of functional potential in ‘young’ culture, whilst in case of ‘ageing’ culture it did ‘revitalizing’ effect. After two and three-fold freeze-thawing cycle the proliferative activity of both type of cell culture was inhibited, moreover, in EC-14 it was in greater extent. After four-fold freeze-thawing EC-7 and EC-14 suspensions had no sign of CD44^{high} cells and their proliferation.

The findings demonstrate the evident need of multiple cryoexposure cycles when treating EC with the purpose of CSC function inhibition and tumor growth stop. This necessity increases with the tumor ageing that should be taken into account in clinical oncology when using cryosurgical methods.



Терапевтическая эффективность иммобилизованного препарата антибиотика и пробиотика после низкотемпературного хранения

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Therapeutic Efficiency of Immobilized Preparation of Antibiotic and Probiotic 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

К осложнениям, связанным с антибактериальной терапией, в том числе и бактериальными кишечными инфекциями, относятся дисбиоз кишечника и антибиотик-ассоциированная диарея. Для профилактики этих осложнений проводят вспомогательную терапию пробиотическими препаратами. В настоящее время широкое распространение получили иммобилизованные в носителях иммунобиологические препараты и лекарственные субстанции. Для их долгосрочного хранения используют низкие температуры.

Целью исследования было изучение терапевтической эффективности совместно иммобилизованных в гелевом носителе антибиотиков и антибиотикорезистентного пробиотика *S. boulardii*, хранившихся при -80 и -196°C в течение 6 месяцев.

Эксперименты проводили на беспородных белых крысах. Экспериментальную кишечную инфекцию клиническим штаммом *K. pneumoniae* воспроизводили после иммуносупрессии гидрокортизона ацетатом. В гранулах геля альгината натрия иммобилизовали смеси ципрофлоксацина или ампиокса с пробиотиком. Терапию проводили антибиотиками, смесями антибиотиков и *S. boulardii*, иммобилизованными в гранулах геля с антибиотиками. Одна контрольная группа животных препарата не получала. Среднесуточные дозы антибиотиков и пробиотика рассчитывали в соответствии с массой животных (180–200 г). Все препараты вводили через оральный зонд.

В группе, не получавшей препараты, все животные погибли. В остальных группах животные не погибали. В группах животных, получавших антибиотик и пробиотик, которые были иммобилизованы в одном носителе, сроки эрадикации возбудителя из организма и восстановление микробиоценоза кишечника сокращались по сравнению с группами, получавшими только антибиотик на 2–3 суток. Хранение при -80 и -196°C в течение 6 месяцев (срок наблюдения) не влияло на терапевтическую эффективность препаратов.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности исследований, посвященных конструированию комплексных иммобилизованных препаратов и разработке методов их консервирования при низких температурах.

The intestinal dysbiosis and antibiotic-associated diarrhea are referred to the antibacterial therapy-related complications, including bacterial intestinal infections. To prevent these complications an auxiliary therapy with probiotic preparations is implemented. Nowadays the immunobiological preparations and drug substances immobilized in carriers are widespread. One uses low temperatures for their long-term storage.

The research aim was to study a therapeutic efficiency of antibiotics and antibiotic-resistant probiotic *S. boulardii*, immobilized together in gel carrier, and stored at -80 and -196°C for 6 months.

Experiments were carried out in white outbred rats. Experimental intestinal infection with clinical strain *K. pneumoniae* was made after immune suppression with hydrocortisone acetate. The mixtures of either Ciprofloxacin or Ampioxum with probiotic were immobilized in granules of sodium alginate gel. The therapy with antibiotics, their mixtures with *S. boulardii*, immobilized in gel granules with antibiotics, was carried out. There was one control group of animals with no preparation administered. The average daily doses of antibiotics and probiotic were calculated according to the animal weight (180–200 g). All the preparations were introduced through an oral probe.

In the group, which received no preparations, all the animals died. In other groups the animals remained alive. In groups of animals, received antibiotic and probiotic, immobilized in one carrier the terms of pathogen eradication from organism and the microbiocenosis recovery reduced by 2–3 days, as compared to the groups with only antibiotic. The storage at -80 and -196°C within 6 months (observation term) did not change a therapeutic efficiency of preparations.

Our findings testify to the prospects of the studies on designing the combined immobilized preparations and methods of their low temperature preservation.



Практический опыт экспериментальных микрососудистых операций

Д.В. Бызов, Н.А. Чиж, И.П. Михайлова, Б.П. Сандомирский
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Practical Experience of Experimental Microvascular Procedures

D.V. Byzov, N.A. Chizh, I.P. Mikhaylova, B.P. Sandomirsky
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Современная медицина тесно связана с использованием миниинвазивных подходов в диагностике и лечении заболеваний. Внедрение в клиническую практику новых медицинских имплантатов и устройств требует предварительного проведения широких доклинических исследований *in vivo* с использованием во многих случаях микрохирургической техники. Несмотря на высокую значимость, детальные описания техники экспериментальных микрохирургических манипуляций с подробными инструкциями публикуются крайне редко и не всегда приемлемы для исследований с ограниченным финансированием.

Цель работы – представить пути решения основных практических проблем, возникающих при выполнении экспериментальных микрохирургических манипуляций; описать простую и доступную технику экспериментального сосудистого стентирования и протезирования.

Операции были выполнены на кроликах массой 2,5–4,5 кг и овцах массой 30–40 кг. Сосудистые протезы малого диаметра (менее 6 мм) и длиной 20–70 мм разработаны нами ранее [Пат. 68379 Украина]. Биодegradирующие сосудистые стенты были предоставлены согласно партнерскому проекту УНТЦ №554 (длина стента – 15 мм, закрытый диаметр – 1,2 мм, открытый диаметр – 3,5 мм). Для проведения операций к общехирургическому набору был добавлен базовый микрохирургический инструментарий и шовный материал (пролен 7–0). В качестве экспериментальной модели использовали брюшную аорту кролика и общую сонную артерию овцы. Выбор связан с подходящим диаметром сосуда, отсутствием необходимости во временном шунтировании, доступностью данных видов животных. Для общей анестезии использовали три комбинации препаратов. Во всех приведенных схемах эндотрахеальная вентиляция не является необходимой, однако при этом требуется постоянный мониторинг адекватности спонтанного дыхания.

Адаптированная хирургическая техника позволила выполнить микрососудистое протезирование аорты и сонной артерии с использованием графтов различной длины. Разработанный нами метод сосудистого стентирования с применением внутривенного катетера помог быстро выполнить установку стента в брюшной отдел аорты кролика. Всего проведено 40 операций по сосудистому протезированию и 27 стентирований без осложнений в раннем и позднем послеоперационном периоде.

Таким образом, описанные оперативные вмешательства могут быть использованы в качестве моделей для доклинических исследований сосудистых протезов и стентов *in vivo*.

Modern medicine is closely associated with use of mini-invasive approaches for diagnosis and treatment. Introduction into clinical practice of medical implants and devices requires thorough pre-clinical studies *in vivo* with wide involvement of a microsurgical technique. In spite of high relevance, detailed descriptions of microsurgical experimental procedures with comprehensive instructions are rare and often are not suitable for low budget research.

The aim of current report was to show the main practical problems and their solving when performing microvascular experimental procedures as well as to describe simple and low-cost techniques of experimental vascular stent implantation and microvascular grafting.

The surgeries were performed in rabbits of 2.5–4.5 kg and sheep of 30–40 kg. Vascular prostheses of small diameter (under 6 mm) and length of 20–70 mm were obtained by us earlier [Patent of Ukraine 68379]. Biodegradable vascular stents were provided according to the Partner Project P554 of Science and Technology Center in Ukraine (15 mm stent length, 1.2 mm closed diameter, 3.5 mm expanded diameter). General surgical kit was supplemented by basic microsurgical instruments and suture material (prolene 7–0). Rabbit abdominal aorta and ovine common carotid artery were chosen as the objects of experimental surgery. The choice was due suitable vessel diameter, no need in temporary bypassing *etc.* Three drug combinations were used for general anesthesia. Endotracheal intubation was not essential in all cases but adequacy of breathing should be monitored constantly.

Adapted surgical techniques allowed performing an experimental small-diameter vascular grafting of aorta and carotid artery using grafts of different length of grafts. Developed by us method of vascular stenting using intravenous catheter allowed to perform a rapid introducing of the vascular stents to rabbit abdomen aorta. Overall 40 surgeries and 27 stentings have been done without complications in early and late postsurgery period.

Thus, the described surgeries may be used as models for pre-clinical investigations of vascular prostheses and stents *in vivo*.



Вклад индивидуальных морфологических характеристик в результативность витрификации бластоцист человека

Т.А. Юрчук, М.П. Петрушко, В.И. Пиняев

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Contribution of Individual Morphological Characteristics in the Outcome of Human Blastocyst Vitrification

T.A. Yurchuk, M.P. Petrushko, V.I. Pinyaev

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

В репродуктивных технологиях для решения проблемы бесплодия все чаще используется криоконсервирование гамет и эмбрионов. Оставшиеся бластоцисты после цикла лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий подвергаются низкотемпературному хранению, что позволяет использовать в последующих менструальных циклах без применения гормональной терапии.

Цель исследования – изучить выживаемость доимплантационных эмбрионов человека на стадии бластоцисты в зависимости от их индивидуальных морфологических характеристик.

Бластоцисты криоконсервировали методом витрификации с использованием многокомпонентной витрифицирующей среды («Kitozato», Япония) на носителях («CryoTec»). Выживаемость витрифицированных бластоцист оценивали по восстановлению их развития *in vitro*. Морфологический анализ проводили по Гарднеру [Gardner D. и соавт., 1999], учитывая степень зрелости бластоцист, состояние внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы, а также наличие цитоплазматической фрагментации и вакуолей.

Наиболее высокие показатели выживаемости эмбрионов были получены при криоконсервировании на стадии ранней бластоцисты с плотноупакованной ВКМ и многоклеточной трофэктодермой ((98,4 ± 7,2) и (99,6 ± 2,9)% соответственно). На стадии полной бластоцисты выживаемость бластоцист снижалась до (82,8 ± 4,2)%. На стадии хэтчинга только (22,4 ± 1,9)% бластоцист восстанавливали свое развитие *in vitro*. Наличие внеклеточной фрагментации и цитоплазматических вакуолей негативно влияло на выживаемость бластоцист.

Таким образом, при витрификации доимплантационных эмбрионов важным условием высоких показателей выживаемости бластоцист являются стадия их развития, а также состояние ВКМ, трофэктодермы и цитоплазмы.

Reproductive technologies tend to use cryopreservation of gametes and embryos to solve the problem of infertility. The blastocysts remaining after cycle of infertility treatment by assisted reproductive technology (ART) methods are low-temperature preserved, which allows to use them in future menstrual cycles without hormonal stimulation.

The purpose of the research was to study the survival of pre-implantation human embryos at the blastocyst stage, depending on their individual morphological characteristics.

Blastocysts were cryopreserved by vitrification using multicomponent vitrification medium (Kitozato, Japan) on the carriers (CryoTec). The survival rate of vitrified blastocysts was assessed by recovery of their development *in vitro*. Morphological assessment was performed by Gardner [D. Gardner *et al.*, 1999] basing on maturity of the blastocysts, the state of the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm, and the presence of cytoplasmic fragmentation and vacuoles.

It was found that the highest survival rates of embryos were obtained following cryopreservation at the early blastocyst stage with packed ICM and multicellular trophoctoderm ((98.4 ± 7.2) and (99.6 ± 2.9)%, respectively). At the full blastocyst stage the survival rate decreased to (82.8 ± 4.2)%. At the hatching stage only (22.4 ± 1.9)% of blastocysts continued their development *in vitro*. The presence of extracellular fragmentation and cytoplasmic vacuoles adversely affected the blastocysts survival rate.

Thus, the essential condition for the high survival rates of blastocysts during vitrification of pre-implantation embryos is the stage of their development, and the status of the ICM, trophoctoderm and cytoplasm.



Исследования биоинтеграции соединительнотканых трансплантатов при создании тканезамещающих биоматериалов

А.А. Манченко, И.П. Михайлова, Б.П. Сандомирский
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Studies of Connective Tissue Graft Biointegration in Preparing of Tissue Replacing Biomaterials

A.A. Manchenko, I.P. Mikhailova, B.P. Sandomirsky
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Одним из подходов создания тканевых эквивалентов для регенеративно-восстановительной хирургии является девитализация ксеногенных тканей. Предимплантационную обработку перикарда (Р) и створок аортального клапана (AVL) свиньи осуществляли криорадиационным способом с использованием низких температур и β -излучения.

Цель работы – изучить в динамике местную тканевую реакцию в ответ на имплантацию различных вариантов перикарда и створок; функциональность и биосовместимость девитализированного Р на модели *in vivo*.

Образцы Р (1,0×1,5 см) и AVL были имплантированы под кожу в межлопаточную область 80 крысам. Проводили сравнительный анализ групп Р и AVL: N – нативные; R – облученные потоком электронов в дозе 25 кГр; F – после замораживания (–196°C) и отогрева; FR – после замораживания и облучения. Сроки наблюдения – 7, 14, 30, 90, 180 суток и год после операции. В качестве модели трансплантации выполняли протезирование дефекта мочевого пузыря (МП) на 18 кролях породы «Шиншилла». Размещали лоскут (2×2,7 см) в стенке тела мочевого пузыря в качестве заплаты. Животных выводили из эксперимента через 3 и 6 месяцев. Выполняли УЗИ. Случаев отторжения и осложнений не выявлено. Гистологически (H&E) исследовали образцы тканей из фрагментов, содержащих имплантат. Маркерами приживления служили: воспалительная реакция в окружающей ткани и трансплантате; капсула и степень ее зрелости; компактность; присутствие в инфильтрате различных клеточных элементов; развитие грануляционной ткани.

В группе N процесс резорбции шел от периферии к центру, к 3-м месяцам остались небольшие фрагменты ткани. В местах контакта имплантатов R с тканями реципиента развивалась воспалительная реакция с сильной нейтрофильной инфильтрацией и деструкцией тканевых структур. Имплантаты F представлены компактной структурой с небольшими фокусами воспаления в виде скопления макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток. На ранних сроках в группе FR начинала формироваться капсула из незрелой соединительной ткани, а в область пересадки активно мигрировали фибробласты, происходил активный ангиогенез. К году трансплантат представлен узким непрерывным тяжем, окруженным спокойной соединительной тканью. В МП к 3-м месяцам в области трансплантата появилась эпителизация, к 6-ти месяцам полностью сформирован эпителий, который встраивался в структуру стенки, восстанавливая ее целостность без признаков рубцовой деформации.

Модифицированные ксеноткани стимулируют образование фиброзной ткани; вызывают минимальную воспалительную реакцию; обладают потенциалом к клеточной репопуляции *in vivo*, что проявляется в активной эндогенной регенерации; могут служить новым биоматериалом.

One of the approach in preparing the tissue equivalents for regenerative/restorative surgery is xenogenic tissue devitalization. Porcine pericardium (P) and aortic valve leaflets (AVL) preimplantation processing was performed by cryoirradiation using effect of low temperatures and β -irradiation.

The aim of the research was to study the dynamics of the local tissue evocation in response to implantation of various porcine pericardium and aortic valve leaflets, functionality and biocompatibility of devitalized P in the *in vivo* model.

The samples of P (1.0×1.5 cm) and AVL have been subcutaneously implanted into the interscapular region of rats. The work has been performed in 80 rats. P and AVL groups have been compared: N – native, R – radiated at a dose of 25 kGr, F – after freezing to –196°C and thawing, FR – after freezing and irradiating. Observation time was 7, 14, 30, 90, 180 days and one year after the surgery. As a model for transplantation the prosthesis of urinary bladder (UB) defect has been performed in 18 Chinchilla rabbits. Patch was stitched (2×2.7 cm) in the bladder wall as a patch graft. Observation time was 3 and 6 months. There was performed a ultrasound control. Tissue samples derived from implant-containing fragments were histologically studied (H&E). No implant failure and postoperative period complications have been detected. Signs of implant survival were inflammatory evocation in surrounding tissue and graft, capsule and its degree of maturity, density, availability of various cellular elements the infiltration, granulation tissue development.

In group N the resorption advanced from periphery to the centre. Inflammatory response with tissue neutrophile infiltration and destruction has been evident in places of the R implants contact with recipient tissues. The F implants become a dense structure, incapsulated by thin connective tissue with small inflammation loci, comprised by the aggregation of macrophages, lymphocytes and plasma cells. The FR group demonstrated an early start of the capsule formation consisted of immature connective tissue, fibroblasts were actively migrating into the zone of grafting, and active angiogenesis was evident. After one year the graft was presented as a narrow uninterrupted band/bundle surrounded by a smooth connective tissue. After 3 months, the area around implant in UB had the signs of epithelization, by 6 months a completely formed epithelium appeared, that was the part of the wall structure and restored its integrity with no scar presense.

Thus, the modified xenotissues stimulate the formation of fibrous tissue, cause minimal inflammatory response; have the potential to cell repopulation *in vivo*, which is manifested in active endogenous regeneration; and can serve as a new biomaterial.



Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ

I.G. Беспалова¹, Л.А. Порожа¹, М.С. Гірич²

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Науково-дослідний інститут біології, Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

Study of Composition of Cryopreserved Fragment Extracts From Newborn Piglet Skin and Heart Using Tricine-SDS-PAGE

I.G. Bepalova¹, L.A. Rohoza¹, M.S. Giryach²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Research Institute of Biology, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів є актуальною задачею. Експериментально показано, що екстракти з кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят прискорюють загоєння термічних травм шкіри і нормалізують кровопостачання серцевого м'яза щурів із ішемією міокарда.

У роботі було проведено електрофоретичне дослідження пептидного складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри (ЕШП) і серця (ЕСЦП) новонароджених поросят.

Екстракти одержували шляхом інкубації фрагментів у фізіологічному розчині протягом 60 хв, фільтрували і видаляли термолабільні протеїни. Початкова концентрація речовин пептидної природи в екстрактах становила 100 мкг/мл. Дослідження екстрактів проводили методом одновимірного вертикального електрофорезу з використанням поліакриламідного гелю (ПААГ) у денатуруючих умовах. У анодного, катодного та гел-буфера рН становив 8,9, 8,25 і 8,45 відповідно. Катодний буфер містив трицин («Chem Cruz», США) [Schagger H., 2006]. Розмір пластини 10×10×0,1 см. Готували 4%-й формуючий та 16%-й фракціонуючий гелі, в яких формували комірки для внесення проби. Досліджувані екстракти концентрували (упарювали у вакуумі) в 5–6 разів. Об'єм проб становив 15–20 мкл на одну комірку, початковий струм – 10 мА/см². Фіксацію гелів проводили в 5%-му формальдегіді протягом 20–30 хв, а фарбування – у розчині кумасі діамантового блакитного G-250 («DIA-M», Росія). Як маркери-свідки використовували цитохром С із серця бика і Color Marker ULR («Sigma-Aldrich», США). Електрофореграми аналізували за допомогою програми «TotalLab TL120 1D» («Nonlinear Dynamics», Велика Британія).

Виявлено різницю між електрофореграмами пептидів ЕШП і ЕСЦП: основна маса речовин пептидної природи, які детектуються в ЕШП, знаходиться в діапазоні м. м. 600–14 000, а ЕСЦП – 1 000–14 000. Проведено денситометрію одержаних електрофореграм.

Метод електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ у комплексі з іншими методичними підходами може бути використаний для більш детального вивчення складу екстрактів.

Studying the composition of the extracts from cryopreserved organ fragments is now an actual task. It was experimentally demonstrated that the extracts from cryopreserved fragments of newborn piglet skin and heart accelerated the healing of thermal injuries of skin and normalized blood supply to heart muscle in rats with myocardial ischemia.

The research aim was to perform an electrophoretic determination of peptide composition of the extracts from piglet skin and heart cryopreserved fragments.

The extracts were obtained from cryopreserved fragments of newborn piglet skin (EPS) and heart (EPH) via incubating them in physiological solution for 60 min, then filtering and removing thermolabile proteins. An initial concentration of substances of peptide nature in the extracts was 100 µg/ml. The extracts were studied using the method of one-dimensional vertical electrophoresis in polyacrylamide gel (PAAG) under denaturing conditions. The anode, cathode and gel buffers had pH 8.9, 8.25 and 8.45, respectively. Cathode buffer comprised Tricine (Chem Cruz, USA) [Schagger H., 2006]. The plate dimension was 10×10×0.1 cm. There were prepared the 4% forming and 16% fractionating gels. The cells for sample introduction were formed in this gel. Studied extracts were concentrated (evaporated in vacuum) in 5–6 times. The sample volume was 15–20 µl per one cell. An initial current was 10 mA/cm². Gels were fixed in 5% formaldehyde within 20–30 min, and stained in Coomassie Brilliant Blue (DIA-M, Russia) solution. Cytochrome C from bovine heart and Color Marker ULR (Sigma-Aldrich, USA) were used as tracking markers. Electrophoregrams were analysed using TotalLab TL120 1D software (Nonlinear Dynamics, Great Britain).

Electrophoregrams of EPS and EPH peptides were different. The bulk of substances of peptide origin, detected in EPS was ranging from MW 600 to 14,000, and for EPH it was from 1,000 to 14,000. The densitometry of the obtained electrophoregrams was carried-out.

The electrophoresis in Tricine-SDS-PAAG together with other methodical approaches may be applied for more detailed study of extract composition.



Компенсация лимбальной недостаточности роговицы ядросодержащими клетками кордовой крови

Е.Н. Свидко^{1,3}, Ю.А. Демин²

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

²Харьковская медицинская академия последипломного образования, г. Харьков

³ТОВ «ММЦ Офтальмика»

Compensation of Corneal Limbal Deficiency with Cord Blood Nucleated Cells

E.N. Svidko^{1,3}, Yu.A. Demin²

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

²Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, Kharkov

³International Medical Center Oftalmika Ltd.

Потеря зрения по причине поражения роговицы существенно отражается на качестве жизни человека, что является экономической и социальной проблемой. При воздействии повреждающего фактора уменьшается количество лимбальных стволовых клеток и ухудшается состояние их микроокружения из-за недостатка специфических ростовых факторов.

Цель исследования – экспериментально обосновать возможность применения криоконсервированных ядро-содержащих клеток кордовой крови человека (кЯКККЧ) для коррекции роговицы в экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР).

Работа была выполнена на кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой 2,0–2,5 кг ($n = 38$; 76 пар глаз) в возрасте 6 месяцев. Криоконсервировали ЯКККЧ по двух-этапной программе на программном замораживателе производства СКТЬБ с ОП ИПКиК Украины.

Животные были разделены на 5 групп: 1 – с индукцией ЛНР и введением кЯКККЧ; 2 – индукцией ЛНР; 3 – индукцией ЛНР и введением разрушенных клеток кЯКККЧ; 4 – индукцией ЛНР и введением физиологического раствора; 5 – глаза здорового кроля (контроль).

Для обоснования применения кЯКККЧ при лечении ЛНР была выбрана экспериментальная модель Милюдина в нашей модификации. Определение ИФН проводили методом ИФА.

Содержание ИФН- γ в слезной жидкости у здоровых животных было выше, чем содержание ИФН- α . У кролей 2-й группы уровень ИФН- α в крови был в 2,3 раза, а в слезной жидкости в 2 раза ниже по сравнению с контролем. На фоне проводимой терапии у кролей группы 1 к 7-м суткам показатели ИФН- α как в крови, так и в слезной жидкости повышались, а к 14-м суткам достигали уровня контрольных значений. Такого эффекта не наблюдали у животных групп 3 и 4.

На основании полученных данных было показано, что введение кЯКККЧ нормализовало уровень цитокинов как в сыворотке крови, так и в слезной жидкости у животных с индукцией ЛНР. Показатели содержания цитокинов коррелировали с воспалительной реакцией роговицы. Гистологические исследования показали, что применение кЯКККЧ восстанавливало структуру роговицы, а клинические данные подтвердили, что данная терапия способствовала восстановлению зрительных функций.

Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рекомендовать кЯКККЧ для лечения ЛНР в клинике.

Loss of vision due to corneal lesions significantly affects the quality of human life and it is an economic and social problem. Under the influence of the damaging factor the amount of limbal stem cells decreases and the state of their microenvironment aggravates because of the lack of specific growth factors.

The research aim was to prove experimentally the possibility of using the cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs) for the correction of the cornea in an experimental model of corneal limbal deficiency (CLD).

The work was performed in 6 months aged male Chinchilla rabbits weighing of 2.0–2.5 kg ($n = 38$; 76 pairs of eyes). cCBNCs were cryopreserved by a two-stage protocol with UOP-6 programmable freezer (Special Design and Technical Bureau of the IPC&C).

The animals were divided into 5 groups: 1 – induced CLD and cCBNCs introduction; 2 – induced CLD; 3 – induced CLD and introduction of the destroyed cCBNCs; 4 – induced CLD and administration of a physiological saline; 5 – eyes of healthy rabbit (control).

To substantiate the use of cCBNCs in CLD treatment we used Milyudin's experimental model in our modification. IFN was examined by ELISA.

The content of IFN- γ in tear fluid from healthy animals was higher than that of IFN- α . In rabbits of the second group the IFN- α level in blood was 2.3 times, and in tear fluid 2 times lower if compared with the control. In the course of performed therapy the content of IFN- α in rabbits of group 1 rised to the day 7, and to the day 14 they reached the control values. Such an effect was not observed in the animals of group 3 and 4.

Basing on the findings it has been demonstrated that introduction of cCBNCs normalized the cytokine level both in blood serum and tear fluid in the animals with induced CLD. Cytokine content indices correlated with inflammatory reaction of cornea. The histological study showed that application of cCBNCs recovered the corneal structure and clinical data confirmed that this therapy contributed to visual function restoration.

The experimental findings allow us to recommend the using of cCBNCs in treatment of CLD.



Функциональное состояние миокарда после комбинированного использования терапевтической гипотермии и мезенхимальных стромальных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда

А.В. Трофимова¹, Н.А. Чиж¹, И.В. Белочкина¹, А.А. Манченко¹, В.А. Шаблий², Б.П. Сандомирский¹

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

²Институт клеточной терапии, г. Киев

Functional State of Myocardium After Combined Application of Therapeutic Hypothermia and Mesenchymal Stromal Cells at Experimental Myocardial Infarction

A.V. Trofimova¹, N.A. Chizh¹, I.V. Belochkina¹, A.A. Manchenko¹, V.A. Shablii², B.P. Sandomirsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Cell Therapy, Kiev

Своевременное применение терапевтической гипотермии (ТГ) в лечении инфаркта миокарда (ИМ) эффективно снижает гипоксическое повреждение миокарда и риск летального исхода [Lundbye J.B., 2012]. В современной литературе широко обсуждается возможность применения клеточной терапии инфаркта миокарда [Fukuda K., 2001], позволяющей уменьшить зону некроза и ускорить репаративные процессы в миокарде. Целью работы было установить эффективность сочетанного применения ТГ и введения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при лечении ИМ.

Исследование выполнено на 85 белых беспородных крысах-самцах. После моделирования ИМ путем перевязки левой коронарной артерии экспериментальные животные были разделены на 5 групп, по 15 в каждой: 1 (контроль 1) – без лечения; 2 (контроль 2) – терапия антиоксидантным препаратом «Кудесан» (ЗАО «Аквион», Россия) в дозе 7,2 мг/кг/сутки внутривентриально; 3 – индукция ТГ в холодной камере в течение часа сразу же после моделирования ИМ; 4 – однократное внутривенное введение криоконсервированных аллогенных плацентарных МСК в дозе $0,6 \times 10^6$ кл. сразу же после операции; 5 – сочетанная терапия ТГ и МСК. Группы нормы составили 10 крыс. Термометрию (ректальная, тимпаническая и локальная температура кожи воротниковой зоны) осуществляли с помощью цифрового электронного термометра МР 707 («Радиоимпекс», Россия), ЭКГ-мониторинг – на аппаратно-программном комплексе «Поли-Спектр 8/В» («Нейрософт», Россия) на 1, 7, 14 и 30-е сутки. ЭХО-КГ выполнены на 7 и 30-е сутки после операций в ВМ и ВД режимах на ультразвуковом сканере «Сономед-500» («Сономед», Россия). Клинические и биохимические показатели крови исследовали на 7, 14 и 30-е сутки.

На 14-е сутки после применения ТГ и МСК нормализовались электрокардиографические показатели, что проявлялось в восстановлении амплитуды зубца R, сегмента ST, отмечено изменения баланса вегетативной нервной системы в сторону парасимпатического отдела. При комбинированном использовании ТГ и МСК снижалась вероятность развития постинфарктной дилатационной кардиомиопатии, восстанавливалась фракция выброса за счет снижения систолического объема левого желудочка. Результаты биохимических исследований в ранние сроки (до 14-х суток) после моделирования ИМ демонстрируют преимущества комбинированного использования ТГ и терапии МСК, что проявляется в восстановлении показателей маркеров цитолиза к этому сроку наблюдения.

Timely application of therapeutic hypothermia (TH) in treatment of myocardial infarction (MI) effectively reduces hypoxic myocardial injury and lethal risk [Lundbye J.B., 2012]. Contemporary scientific publications widely discuss the possibility of usage of stem cell therapy at myocardial infarction [Fukuda K., 2001], enabling to reduce the necrosis area and accelerate reparative processes in myocardium. The research aim was to determine the efficiency of combined application of TH and administration of mesenchymal stromal cells (MSCs) during treatment of MI.

The study was performed in 85 white breedless male rats. After MI modelling by ligation of left coronary artery the experimental animals were divided into 5 groups. There were 15 rats in each group: the 1st group (control 1) was without treatment; the 2nd one (control 2) was antioxidant therapy with Kudesan (Akviion JSC, Russia) at a dose of 7.2 mg/kg per day intraperitoneally; 3 – induction of TH in cold chamber for an hour immediately after MI modelling; 4 – single intravenous administration of cryopreserved allogeneic placental MSCs in a dose of 0.6×10^6 immediately after surgery; 5 – combined therapy of TH and MSCs. The norm group consisted of 10 rats. Thermometry (rectal, tympanic and local skin temperature of collar zone) was performed with a digital electronic thermometer MP 707 (Radioimpeks, Russia), ECG was monitored with Poly-Spectrum 8/B hardware-software complex (Neurosoft, Russia) to the 1st, 7th, 14th and 30th days. Echocardiography was performed to the 7th and 30th days after surgery in ВМ and ВД regimens with Sonomed-500 ultrasound scanner (Sonomed, Russia). Clinical and biochemical parameters of blood were examined to the 7th, 14th and 30th days.

To the 14th day after application of TH and MSCs the electrocardiographic parameters were normalized, that was manifested in restoration of R wave and ST segment amplitude, changes in balance of vegetative nervous system towards parasympathetic division. Combined application of TH and MSCs resulted in decreased possibility of post-infarction dilated cardiomyopathy development, recovery of ejection fraction due to reduction of left ventricle systolic volume. The results of biochemical studies in early stages (up to 14th day) after MI modelling demonstrate the advantages of combined application of TH and MSCs therapy, manifested in recovery of cytolysis markers by this observation time.



**Влияние гипотермического хранения в различных средах
на жизнеспособность и метаболическую активность мезенхимальных
стромальных клеток в составе альгинатных микросфер**

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

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Effect of Hypothermic Storage in Various Media on Viability and Metabolic Activity
of Human Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Microspheres**

D.N. Tarusin, V.S. Zaikov, V.V. Mutsenko, Yu.A. Petrenko

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

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК), инкапсулированные в альгинатные микросферы (АМС), находят все более широкое применение в регенеративной медицине и трансплантологии. В связи с этим актуальным вопросом является разработка простых и эффективных способов краткосрочного хранения и транспортировки МСК в составе АМС.

Цель данной работы – изучение влияния гипотермического хранения в различных средах на жизнеспособность и метаболическую активность МСК в составе АМС.

Мезенхимальные стромальные клетки в виде суспензии и инкапсулированные в АМС хранили в составе различных сред: культуральная среда, сахарозо-содержащий раствор (ССР) и University of Wisconsin solution (UW) при 4°C в герметично закрытых криопробирках. После хранения альгинатные микросферы растворяли и клетки культивировали в стандартных условиях. Жизнеспособность определяли по МТТ-тесту и способности клеток адгезировать на культуральный пластик после суточного монослойного культивирования. Метаболическую активность МСК оценивали по интенсивности флуоресценции восстановленной формы редокс-индикатора AlamarBlue (АВ).

При хранении МСК в виде суспензии в составе сред ССР и UW на протяжении 3-х суток жизнеспособность и метаболическая активность оставались на уровне 80–90%, а на 7-е сутки снижались до 55–75%. При аналогичных условиях хранения инкапсуляция МСК в АМС не способствовала существенному сохранению клетками жизнеспособности и метаболической активности независимо от сроков инкубации. В то же время хранение суспензии и инкапсулированных МСК при 4°C в составе культуральной среды приводило к значительному снижению жизнеспособности и метаболической активности на 3-и сутки инкубации, что вероятно связано с непригодностью использования культуральной среды для гипотермического хранения данных клеток.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что для гипотермического хранения МСК как в виде суспензии, так и инкапсулированные в АМС, целесообразно использовать среды внутриклеточного типа; при этом разработанный в ИПКиК НАН Украины сахарозо-содержащий раствор продемонстрировал такую же эффективность, как и UW.

Mesenchymal stromal cells (MSCs), encapsulated into alginate microspheres (AMS), are being increasingly applied in transplantation and regenerative medicine. In this regard, an important issue is to develop simple and effective methods of short-term storage and transportation of the MSCs in AMS.

The aim of this work was to study the effect of hypothermic storage in various media on viability and metabolic activity of MSCs in AMS.

MSCs in suspension and encapsulated into AMS were stored in various media: culture medium, sucrose-based solution (SBS) and the University of Wisconsin solution (UW) at 4°C in sealed cryovials. After storage, the alginate microspheres were dissolved and the cells were cultured at standard conditions. The viability was determined by MTT assay and the ability of cells to adhere to the culture plastic after daily monolayer culture. Metabolic activity of MSCs was evaluated by fluorescence intensity of the reduced form of the redox-indicator AlamarBlue (AB).

Storage of MSCs in suspension in SBS and UW media for 3 days resulted in preserving a viability and metabolic activity at the level of 80–90%, and after 7 days the indices decreased down to 55–75%. Under the same storage conditions, the encapsulation of MSC into AMS did not contribute to the preservation of a significant cell viability and metabolic activity, regardless of the incubation time. At the same time, storage of the suspension and encapsulated MSCs at 4°C in the culture medium led to a significant decrease in the viability and metabolic activity at day 3 of incubation, probably due to the unsuitability of the culture medium for hypothermic storage of the cells.

The results of this work indicate that hypothermic storage of the MSCs either as a suspension, or encapsulated in AMS could be performed in the media of the intracellular type; the developed at IPC&C sucrose-based solution showed the same efficiency as the UW.



Влияние глюкозы на устойчивость эритроцитов млекопитающих к действию стрессовых факторов

Е.А. Семионова¹, О.А. Шапкина²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

Glucose Affects the Resistance of Mammalian Erythrocytes to the Effect of Stress Factors

E.A. Semionova¹, O.A. Shapkina²

¹V.N. Karazin Kharkov National University

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

Глюкоза является одним из важных компонентов среды для гипотермического хранения и низкотемпературного консервирования эритроцитов. Глюкозный компонент призван обеспечить энергетическую стабильность клеток в результате образования АТФ. Представляло интерес изучить влияние глюкозы на чувствительность эритроцитов млекопитающих (человек, крыса, кролик) к гипертоническому, холодовому и механическому шоку (ГШ, ХШ, МШ соответственно). Гипертонический и холодовой шок использовали в качестве модели факторов криоповреждения клеток, а МШ – для оценки вязко-эластичных свойств мембран эритроцитов.

Обработку эритроцитов млекопитающих глюкозой (0,6; 5%) осуществляли при температуре 37°C в течение 2 ч. Затем клетки подвергали действию ГШ (4,0 моль/л NaCl, 0°C), ХШ (охлаждение от 37 до 0°C в среде, содержащей 1,2 моль/л NaCl) или МШ [Шпакова Н.М. и соавт., 2010]. Уровень гемолиза эритроцитов определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 543 нм, выход ионов калия из клеток – ионометрическим методом.

Показано, что среди эритроцитов исследуемых млекопитающих к обработке глюкозой наиболее чувствительны клетки человека, для которых характерно наличие повреждения в результате инкубации с глюкозой в концентрации 5%. Сочетанное действие глюкозы и ГШ проявляется в увеличении гемолиза эритроцитов человека в отличие от клеток крысы и кролика. Модификация эритроцитов глюкозой в концентрации 0,6% не влияет на уровень гипертонического гемолиза клеток исследуемых млекопитающих. Выявлено, что уровень гемолитического повреждения эритроцитов кролика при сочетанном действии глюкозы (5%) и ХШ не изменяется, в то время как клеток человека и крысы – повышается. Установлено, что контрольные и модифицированные глюкозой (5%) эритроциты кролика более устойчивы к МШ (при использовании показателей гемолиза и выхода калия из клеток) в отличие от эритроцитов человека и крысы.

Таким образом, обработка эритроцитов кролика глюкозой не оказывает влияния на их чувствительность к действию ГШ, ХШ и МШ, в то время как чувствительность эритроцитов человека и крысы к этим стрессовым факторам варьирует в разной степени. Выявленная высокая стойкость эритроцитов кролика, по-видимому, связана с низкой способностью этих клеток накапливать глюкозу [Albert S.G., 1984; Montel-Hagen A. и соавт., 2008]. Кроме того, эритроцитарная мембрана кролика лишена гликофорина А [Ligi F. и соавт., 1998], что снижает степень ее контакта с внутриклеточными молекулами гемоглобина [Rauenbuehler P.B. и соавт., 1982] и уменьшает вероятность образования трансмембранных дефектов в условиях действия стрессовых факторов.

Glucose is one of the important components of media for hypothermic storage and low temperature preservation of erythrocytes, providing an energetic stability of cells as a result of ATP formation. Of interest was to study the glucose effect on sensitivity of mammalian erythrocytes (human, rat, rabbit) to hypertonic, cold and mechanical shocks (HS, CS and MS, respectively). The HS and CS were used as the model of cryodamage factors of cells; and MS for assessing the viscous-elastic properties of erythrocyte membranes.

Mammalian erythrocytes were treated with glucose (0.6, 5%) at 37°C for 2 hrs. Then the cells were subjected to the effect of HS (4.0 mol/l NaCl, 0°C), CS (cooling from 37 to 0°C in the medium, containing 1.2 mol/l NaCl) or MS [Shpakova N.M. *et al.*, 2010]. The level of erythrocyte hemolysis and potassium ions release out of cells were determined spectrophotometrically at 543 nm and by ionometric method, respectively.

It was demonstrated that among erythrocytes of studied mammals the most sensitive to glucose treatment were human cells, where the injury was observed already after incubating with 5% glucose. Combined effect of glucose and HS was manifested in an increased hemolysis of human erythrocytes in contrast to rat and rabbit cells. Erythrocyte modification with 0.6% glucose did not affect the level of hypertonic hemolysis of cells of the studied mammals. The level of hemolytic damage of rabbit erythrocytes under a combined effect of glucose (5%) and CS was revealed to remain unchanged, meanwhile for human and rat cells it was increased. It was established that the control and glucose (5%) modified rabbit erythrocytes were more resistant to MS (in terms of the indices of hemolysis and potassium release out of cells) in contrast to human and rat erythrocytes.

Thus, the glucose treatment of rabbit erythrocytes caused no effect on their sensitivity to the effects of HS, CS and MS, meanwhile the human and rat erythrocytes sensitivity changed in different extent. Possibly, a high resistance of rabbit erythrocytes was associated to a low capability of these cells to accumulate glucose [Albert S.G., 1984; Montel-Hagen A. *et al.*, 2008]. In addition, the rabbit erythrocyte membrane is deprived of glycoprotein A [Ligi F. *et al.*, 1998], that decreases the extent of its contact with intracellular molecules of hemoglobin [Rauenbuehler P.B. *et al.*, 1982] and reduces the probability of transmembrane defect formation under stress factors.



Влияние криоконсервирования на экспрессию генов плюрипотентности в клетках аденокарциномы Эрлиха разных сроков развития

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

Effect of Cryopreservation on Pluripotency Gene Expression in Ehrlich Carcinoma Cells of Different Terms of Development

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

Успех применения метода криодеструкции солидных опухолей в клинике базируется на понимании характера влияния криовоздействия на структурные и функциональные свойства стволовых раковых клеток (СРК) как индукторов злокачественного процесса. Существенным моментом при этом является изучение криочувствительности СРК в опухолях разных сроков развития. Удобная модель для проведения подобных исследований – это асцитная форма аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

Цель работы – оценить влияние криоконсервирования на экспрессию генов *nanog*, *oct4*, *sox2* в различных субпопуляциях клеток АКЭ разных сроков развития и их способность к опухолеобразованию.

Эксперименты проводили на мышах линии Balb/c, в перитонеальной полости (ПП) которых культивировали АКЭ. Асцит получали на 7- и 14-е сутки культивирования АКЭ. Методом магнитной сепарации (сортер «BD IMagnet», США) общая популяция клеток АКЭ была разделена на CD44⁺- и CD44⁻-фракции, которые криоконсервировали в асцитической жидкости по двухэтапной программе: 1 град/мин до –80°C, 300–400 град/мин от –80 до –196°C. Способность криоконсервированных CD44⁺- и CD44⁻-клеток разных сроков развития к опухолеобразованию оценивали через 7 суток культивирования в ПП (3×10⁵ кл/мышь). Интенсивность развития АКЭ в каждой группе определяли по объему асцитической жидкости в ПП и концентрации клеток. Содержание субпопуляций АКЭ с маркерами CD44⁺CD24⁻ и CD44^{hi} оценивали на цитофлуориметре «FACS Calibur» («BD», США); уровень экспрессии генов *nanog*, *oct4*, *sox2* – методом ОТ-ПЦР.

Установлено, что CD44⁺-фракция обладала большим опухоль-индуцирующим потенциалом, чем фракция CD44⁻, независимо от стадии развития АКЭ. В культуре АКЭ, иницированной криоконсервированной фракцией CD44⁺-клеток, выделенных из АКЭ-7, наблюдались стимуляция экспрессии генов *nanog* и *sox2* и ингибирование *oct4*, что проявилось в усилении пролиферации наиболее потенциальной (CD44^{hi}-клетки) и дифференцированной (CD44⁺CD24⁺-клетки) субпопуляции. В культуре, иницированной криоконсервированной фракцией CD44⁺-клеток, выделенных из АКЭ-14, наблюдалось повышение экспрессии всех исследуемых генов, что сопровождалось усилением пролиферации наиболее потенциальных субпопуляций АКЭ (CD44^{hi} и CD44⁺CD24⁺).

Таким образом, в зависимости от срока развития опухоли криоконсервирование может оказывать стимулирующий эффект на экспрессию генов плюрипотентности, что необходимо учитывать при проведении криоиррадиации.

The successful application of cryodestruction for solid tumours in the clinic is based on understanding the nature of cryoexposure impact on structural and functional properties of cancer stem cells (CSCs) as a malignancy initiators. The essential point here is the study of CSCs cryosensitivity in tumours of different terms of development. A convenient model for implementing these studies is ascitic Ehrlich carcinoma (EC).

The research aim was to assess the cryopreservation effect on *nanog*, *oct4*, *sox2* gene expression in different subpopulations of EC cells of different terms of development and their capability to tumor formation.

Experiments were performed in Balb/c mice, in peritoneal cavity (PC) of which the EC was cultured. The ascite was obtained to day 7 and 14 of EC culturing. Using magnetic separation (BD IMagnet sorter, USA) the total population of EC cells was separated into CD44⁺ and CD44⁻ fractions, cryopreserved in ascitic fluid by two-step program: 1 deg/min down to –80°C, 300–400°C/min from –80 down to –196°C. The capability of cryopreserved CD44⁺ and CD44⁻ cells of different terms of development to tumour formation was assessed after 7 days of culture in PC (3×10⁵ cells/mouse). The intensity of EC development in each group was determined by the volume of ascitic fluid in PC and cell concentration. The content of EC subpopulations with CD44⁺CD24⁻ and CD44^{hi} markers was assessed with cytofluorimeter FACS Calibur (BD, USA); the level of *nanog*, *oct4*, *sox2* gene expression was done by RT-PCR.

It was found that CD44⁺ fraction had a greater tumour-inducing potential than CD44⁻ fraction, regardless of the stage of EC development. In EC culture, initiated by cryopreserved fraction of CD44⁺ cells, isolated from EC-7, we observed the stimulation of *nanog* and *sox2* gene expression and *oct4* inhibition, that was manifested in an increased proliferation of the most potent (CD44^{hi} cells) and differentiated (CD44⁺CD24⁺ cells) subpopulations. In the culture, initiated by cryopreserved fraction of CD44⁺ cells, isolated from EC-14, we noted an increased expression of all the studied genes, that was accompanied by strengthened proliferation of the most potent EC subpopulations (CD44^{hi} and CD44⁺CD24⁺).

Thus, depending on the term of tumour development the cryopreservation may cause a stimulating effect on the pluripotency gene expression, that should be taken into account during cryoirradiation.



Влияние криопротекторов группы оксиэтилированных производных глицерина на структуру и фазовые переходы модельных липидных мембран

А.О. Красникова¹, Н.А. Касян¹, О.В. Ващенко¹, Л.Н. Лисецкий¹,
А.М. Компаниец², А.В. Зинченко², Д.В. Соловьев³, Л.А. Булавин⁴

¹Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

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

³Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна, Россия

⁴Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, г. Киев

Effect of Oxyethylated Glycerol Cryoprotectants on Model Lipid Membranes Structure and Phase Transitions

A.O. Krasnikova¹, N.A. Kasian¹, O.V. Vashchenko¹, L.N. Lisetski¹,

A.M. Kompaniets², A.V. Zinchenko², D.V. Soloviov³, L.A. Bulavin⁴

¹Institute for Scintillation Materials, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

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

³Joint Institute of Nuclear Research, Dubna, Russia

⁴Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Установление взаимодействия криопротекторов с клеточными мембранами является важным этапом подготовки к хранению биологических объектов. Для выяснения некоторых аспектов этого взаимодействия используют модельные фосфолипидные мембраны.

Цель данной работы – установление влияния криопротекторов группы оксиэтилированных производных глицерина (ОЭГ_n) со степенями полимеризации $n = 5, 25$ и 30 на фазовые состояния и переходы, структурные параметры модельных липидных мембран.

Модельные липидные мембраны на основе дипальмитоилфосфатидил-холина (ДПФХ) были приготовлены на субфазах вода/ОЭГ_n и вода/глицерин с варьированием концентрации криопротектора от 0 до 100 мас.%. Фазовые переходы в системах ДПФХ/вода/ОЭГ_n и ДПФХ/вода/глицерин исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии с помощью микрокалориметра «DSC 1» («Mettler», Швейцария) и методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) с помощью спектрометра «SmAxs-3000» («Rigaku», Япония). Методом МУРР определяли период повторяемости D бислоев ДПФХ в гелевой (L_{β}), складчатой (P_{β}) и жидкокристаллической (L_{α}) фазах.

Показано, что замена воды на ОЭГ_n приводит к существенному увеличению температур предперехода ($L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$) и плавления ($P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$) модельной мембраны. При этом влияние криопротектора возрастает в ряду $OEG_{n=5} > OEG_{n=25} > OEG_{n=30}$, что может быть связано с уменьшением удельного количества групп, участвующих в сольватации ДПФХ. Пик плавления сохраняется вплоть до 100 мас.% ОЭГ_n, что вместе с данными МУРР свидетельствует о сохранении мультибислойной организации модельных мембран.

Обнаружено возрастание энтальпии плавления мембраны в присутствии глицерина и ОЭГ_{n=5}, что может свидетельствовать о переходе мембраны в интердигитированную фазу геля ($L_{\beta 1}$). Показано увеличение D в L_{β} -фазе и уменьшение D в L_{β} -фазе для системы ДПФХ/вода/глицерин с повышением концентрации глицерина, что подтверждает образование $L_{\beta 1}$ -фазы. При этом во всех фазах системы ДПФХ/вода/ОЭГ_{n=5} D снижается с увеличением концентрации криопротектора. Это, вероятно, обусловлено уменьшением толщины водной прослойки, а не липидного бислоя, как при фазовом переходе $L_{\beta} \rightarrow L_{\beta 1}$. Выявлены различные температурные зависимости D в L_{α} -фазе в присутствии глицерина и ОЭГ_{n=5}.

Studying of cryoprotectant interactions with cell membranes is an important step in preparing to a storage of biological specimens. To elucidate some aspects of these interactions, the model phospholipid membranes are used.

The aim of this work was the establishing of the effects of oxyethylated glycerol cryoprotectants (OEG_n) with polymerization degree $n = 5, 25$ and 30 on phase states, phase transitions and structural parameters of model lipid membranes.

Model lipid membranes based on dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) were obtained on water/OEG_n and water/glycerol subphases with cryoprotectant concentration varied within 0 to 100 % w/w. Phase transitions in DPPC/water/OEG_n and DPPC/water/glycerol systems were studied by differential scanning calorimetry (DSC) by means of Mettler DSC 1 calorimeter (Switzerland) and small-angle X-ray scattering (SAXS) by means of SmAxs-3000 spectrometer (Rigaku, Japan). Lamellar repeat distances, D , in gel (L_{β}), ripple (P_{β}) and liquid crystal (L_{α}) phases were determined by SAXS.

It was demonstrated that water substitution by OEG_n led to a substantial increase of the pre-transition ($L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$) and melting ($P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$) temperatures. This effect increases in the row $OEG_{n=5} > OEG_{n=25} > OEG_{n=30}$, which can be attributed to lowering of the relative number of groups that contribute to the DPPC solvation. Melting peak persists up to 100% w/w OEG_n, which together with SAXS data shows that the membrane multilamellar structure is preserved under these conditions.

Increase of melting enthalpy was detected in the presence of glycerol and OEG_{n=5}, which indicated the interdigitated ($L_{\beta 1}$) gel phase formation. For DPPC/water/glycerol system, the D values increased together with glycerol concentration in L_{α} phase and decreased in L_{β} phase. This evidenced for $L_{\beta 1}$ phase formation in this system. However, in DPPC/water/OEG_{n=5} system, D decreased together with OEG_{n=5} concentration in all phases. This could be ascribed to depletion of the water interlayer thickness rather than decreasing of the lipid bilayer thickness, which was characteristic for $L_{\beta} \rightarrow L_{\beta 1}$ phase transition (interdigitation). Different temperature behavior of the D values in L_{α} phases for glycerol and OEG_{n=5} were observed and discussed.



Влияние антисептика-стимулятора АСД-2 на устойчивость мембран эритроцитов быка к криовоздействиям

И.П. Горячая

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Antiseptic-Stimulator ASD-2 on Resistance of Bovine Erythrocyte Membranes to Cryoexposures

I.P. Goryachaya

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

Известно, что живые системы в состоянии адаптивного ответа на стресс способны приобретать устойчивость к другим видам стресса, иногда более сильным и длительным, чем первичный.

Целью данной работы явилось изучение адаптивного ответа клеток на стресс не холодной природы, вызванный перед замораживанием, на их устойчивость к последующему замораживанию-отогреву.

Исследовали влияние антисептика-стимулятора Дорогова (АСД-2, «Ареал Медикал», Россия) на сохранность мембран эритроцитов быка в присутствии криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО). Используемый АСД-2 представляет собой водный раствор продуктов термического разложения тканей животных, концентрация растворенных веществ в котором около 9%. Замораживали эритроциты быка в криозащитных растворах, содержащих 7,5 и 12,5 об.% ДМСО и 5, 10, 15 и 20 об.% АСД-2. Установлено, что уровень гемолиза эритроцитов быка после замораживания в средах, содержащих 7,5 и 12,5 об.% ДМСО, составляет $(23,6 \pm 1,2)$ и $(9,6 \pm 0,4)\%$ соответственно. При замораживании в средах, содержащих 7,5% ДМСО + 15% АСД-2 и 12,5% ДМСО + 15% АСД-2, значение гемолиза составило $(2,6 \pm 0,1)$ и $(1,8 \pm 0,1)\%$ соответственно.

При использованных концентрациях АСД-2 не проявляется криозащитного действия по сравнению с традиционными криопротекторами в силу низких концентраций растворенных веществ. Исследование низкотемпературных фазовых переходов в растворах АСД-2 показало, что осмотический эффект АСД-2 при указанных концентрациях сопоставим с действием физиологического раствора. Установлена U-образная зависимость влияния концентрации АСД-2 на гемолиз, которая характерна для гормезиса при действии слабого раздражителя на живую систему.

Таким образом, в данной ситуации АСД-2 действует на эритроциты как слабый стресс-фактор, повышающий их устойчивость к стрессу, вызванному замораживанием-отогревом.

It is known that living systems being in adaptive response to stress are capable of resisting other stress types, sometimes stronger and longer than an initial one.

This research aim was to study an adaptive response of cells to stress of non-cold nature, caused before freezing, on their resistance to following freeze-thawing.

We studied the effect of antiseptic-stimulator of Dorogov (ASD-2, Areal Medical, Russia) on the integrity of bovine erythrocyte membranes in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO). The used ASD-2 is an aqueous solution of thermal decay products of animal tissues, where the concentration of dissolved substances is about 9%. Bovine erythrocytes were frozen in cryoprotective solutions, containing 7.5 and 12.5% v/v DMSO and 5, 10, 15 and 20% v/v ASD-2. The level of bovine erythrocytes hemolysis after freezing in the media, containing 7.5 and 12.5% v/v DMSO was established to make (23.6 ± 1.2) and $(9.6 \pm 0.4)\%$, respectively. When freezing in the media containing 7.5% DMSO + 15% ASD-2 and 12.5% DMSO + 15% ASD-2 the hemolysis value was (2.6 ± 0.1) and $(1.8 \pm 0.1)\%$, respectively.

Under the used concentrations the ASD-2 manifested no cryoprotective effect as compared to the traditional cryoprotectants due to low concentrations of dissolved substances. The study of low-temperature phase transitions in ASD-2 solutions showed an osmotic effect of ASD-2 under the mentioned concentrations as similar to the one of physiological saline. The U-shaped dependency of the effect of ASD-2 concentration on hemolysis was established. This dependency is typical for hormesis under the effect of a slight stimulus to living system.

Thus, in these conditions the ASD-2 affected erythrocytes as a slight stress factor that increased their resistance to stress, caused by freeze-thawing.



Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови человека (до 5 кДа) на морфофункциональные характеристики эритроцитов после гипотермического хранения

Е.Е. Жаркова, А.К. Гулевский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Human Cord Blood Low-Molecular Fraction (below 5 kDa) on Morphological and Functional Characteristics of Erythrocytes after Hypothermic Storage

Ye.Ye. Zharkova, A.K. Gulevsky

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

Максимальный срок хранения консервированной донорской крови – 35 суток, однако уже на 3–4-е сутки значительно снижается основная функция эритроцитов – кислород-транспортная. При этом снижается рН, увеличивается содержание свободного гемоглобина, изменяется содержание калия и натрия. Кроме того, дискоциты изменяют свою форму, трансформируясь в эхиноциты, а в последствии – в сфероциты, что связано с использованием клетками молекул АТФ. Ввиду этого применение такой ценной трансфузионной среды в клинической практике затруднено.

Целью работы является определение способности низкомолекулярной фракции кордовой крови человека (до 5 кДа) влиять на морфофункциональное состояние эритроцитов.

Консервированную донорскую кровь человека инкубировали в течение часа с низкомолекулярной фракцией кордовой крови человека (НМФ ККЧ) при 37°C (конечная концентрация 0,6 мг/мл) или с препаратом сравнения «Актовегин»® («Nicomed», Австрия) (конечная концентрация 0,6 мг/мл). Количества нормоцитов, эхиноцитов и сфероцитов на 1, 7, 14 и 21-е сутки гипотермического хранения определяли методом световой микроскопии, рН и показатели кислород-транспортной функции (напряженность кислорода, напряженность CO₂ и сатурация) – с помощью катриджного анализатора газов крови «IL GEM Premier» (Германия).

Полученные данные свидетельствовали о репаративных способностях НМФ ККЧ и «Актовегина» на морфологические и биохимические показатели эритроцитов консервированной донорской крови. Низкомолекулярная фракция кордовой крови человека оказалась эффективнее, чем препарат сравнения, а именно: число нормоцитов восстановилось на 50% по сравнению с контролем, а число непереходных форм уменьшилось в 2 раза. Кроме того, установлено, что НМФ ККЧ способна восстанавливать показатели, характеризующие кислород-транспортную функцию: сродство гемоглобина к кислороду повышается на 20%; напряженность кислорода увеличивается на 25%; напряженность CO₂ снижается на 10%, а рН, которое на 21-е сутки гипотермического хранения составляет 6,66, восстанавливается до 6,88, т. е. до значения, соответствующего 7-м суткам гипотермического хранения.

Таким образом, НМФ ККЧ обладает способностью восстанавливать морфофункциональные свойства эритроцитов, а использование НМФ ККЧ в качестве реабилитирующей среды на практике является целесообразным.

It is known that the storage time of preserved donor blood is not longer than 35 days, however, as early as after 3–4 days the main function of erythrocytes, oxygen transport, is significantly reduced. A number of relevant changes occurs: pH lowers, free hemoglobin content increases, potassium and sodium contents change. In addition, discocytes change their shape, turning into echinocytes, which is associated with ATP utilization by cells. Due to this, use of such valuable transfusion material is complicated in clinical practice.

The study aim was to determine a potential of human cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) (HCB LMF) to influence morphofunctional status of erythrocytes.

Banked human donor blood was incubated with either HCB LMF for 1 h (37°C) (0.6 mg/ml final concentration) or with the reference drug Actovegin® (Nicomed, Austria) (0.6 mg/ml final concentration). To determine normocyte, echinocyte and spherocyte counts at days 1, 7, 14, 21 of hypothermic storage, we used light microscopy. The pH and oxygen transportation function (oxygen tension, \dot{N}_2 tension and saturation) were assessed by the IL GEM Premier 3000 blood gas analyzer (Germany).

The obtained data suggested rehabilitating capacity of HCB LMF and Actovegin® in terms of morphological and biochemical parameters of banked human donor blood erythrocytes. Moreover, HCB LMF was more effective than the reference drug: normocyte count recovered by 50% in comparison with control, and spherocyte count decreased by 2 times. In addition, the results indicated the HCB LMF potential to restore the parameters characterizing oxygen transport function: hemoglobin affinity to oxygen increased by 20%, oxygen tension increased by 25%, CO₂ tension decreased by 10%, and pH, which was 6.66 at day 21 of hypothermic storage, enhanced to the level of the 7th day of storage – 6.88.

Thus, the above facts allow us to draw a conclusion about restoring ability of HCB LMF on erythrocytes morphology and function. Use of HCB LMF as rehabilitating medium is feasible.



Оптимизация режима насыщения-отмывания овариальной ткани растворами проникающих криопротекторов

И.А. Трутаева, В.В. Киروشка, Ю.О. Божкова, Т.П. Бондаренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Optimization of Ovarian Tissue Saturation with and Washing of Penetrating Cryoprotectants Solutions

I.A. Trutaeva, V.V.Kiroshka, Yu.O.Bozhkova, T.P. Bondarenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В настоящее время одной из задач для повышения эффективности протокола криоконсервирования овариальной ткани является снижение осмотического повреждения различных типов клеток в структуре ткани при насыщении-отмывании гиперосмолярными растворами проникающих криопротекторов (КП).

Цель работы – исследование сохранности морфологической структуры овариальной ткани и характера объемных изменений ооцитов при многоэтапном насыщении-отмывании растворами проникающих КП в зависимости от композиционного состава среды инкубации.

В работе были использованы фрагменты овариальной ткани. В качестве КП применяли 1,2-ПД и ДМСО. Насыщение ткани КП проводили с помощью сред: 1 – ДМЕМ; 2 – ДМЕМ, 10% ЭТС; 3 – ДМЕМ, 200 мМ сахарозы. Криопротекторы добавляли поэтапно (10%→20%) при 22°C. Время инкубации составляло 30 мин на каждом этапе. Для удаления КП использовали два режима: 1 – ДМЕМ, 250 мМ сахарозы, 10% КП → ДМЕМ, 250 мМ сахарозы → ДМЕМ; 2 – ДМЕМ+500 мМ маннита, 10% КП → ДМЕМ + 500 мМ маннита → ДМЕМ + 250 мМ маннита. Время инкубации составляло 10 мин на каждом этапе (22°C).

Динамика морфологических трансформаций овариальной ткани и объемные изменения ооцитов определялись композиционным составом среды насыщения и типом используемого КП. Так, при насыщении ткани КП средами 2 и 3 наблюдалась аккумуляция жидкости в строме овариальной ткани, тогда как при использовании среды 1 в структуре ткани сохранялись плотные межклеточные контакты. При этом насыщение ткани 1,2-ПД приводило к значимому увеличению объема ооцитов в среде 2 относительно контроля и его уменьшению в среде 3. При использовании ДМСО объемные изменения ооцитов не имели значимых отличий в зависимости от состава среды насыщения, что обусловлено более высоким коэффициентом проницаемости этого КП. Следует отметить, что уровень сохранности фолликулов после удаления КП был сопоставим при обоих исследуемых режимах и определялся композиционным составом среды насыщения. Максимальная сохранность фолликулов после удаления КП была выявлена при использовании для насыщения среды 3. После чего была проведена инкубация ткани в физиологических условиях. При этом восстановление морфологической целостности ткани наблюдалось в случае использования режима 2 для удаления 1,2-ПД и ДМСО и режима 1 для ДМСО.

Таким образом, использование среды ДМЕМ, содержащей 200 мМ сахарозы, для насыщения овариальной ткани КП и многоступенчатого режима отмывки раствором маннитола приводит к максимальной сохранности ее морфологической структуры.

Currently, one of the tasks to improve the protocol for ovarian tissue cryopreservation is the reduction of the osmotic damage of different types of cells of the tissue when adding and removing hyperosmolar solutions of penetrating cryoprotectants (CP).

The research aim was to examine the preservation of ovarian tissue morphological structure and the character of volumetric changes of oocyte during multistage adding/removing of penetrating CP solutions depending on the composition of incubation medium.

The ovarian tissue fragments were used in the research. As the CP we used 1,2-PD and DMSO. Tissue was saturated by the following media: 1 – DMEM; 2 – DMEM, 10% FBS; 3 – DMEM, 200 mM sucrose. CPs were added step-by-step (10%→20%) at 22°C. The incubation time was 30 minutes at each step. Two procedures of removing the CP were tested: 1) DMEM, 250 mM sucrose, 10% CP → DMEM, 250 mM sucrose → DMEM; 2) DMEM + 500 mM mannitol + 10% CP → DMEM + 500 mM mannitol → DMEM + 250 mM mannitol. The incubation time was 10 min at each stage, 22°C.

It was shown that the dynamics of morphological transformation of ovarian tissue depended on the composition of saturation medium and the type of used CP. In particular, in case of using the media 2 and 3 to saturate the tissue we observed accumulation of fluid in the ovarian tissue stroma, whereas the application of the medium 1 resulted in preservation of tight intercellular contact between stromal elements in the tissue structure. Saturation of tissue by 1,2-PD resulted in a significant increase of oocyte volume in a medium 2 comparing to the control and its reduction in the medium 3. Using DMSO did not result in significant volumetric changes in oocytes depending on the composition of the saturation medium, likely due to the higher permeability coefficient of this CP. It should be noted that the level of follicles integrity after CP removal was similar after both procedures, and was determined only by the composition of the saturation medium. Maximum follicles integrity after removing the CP was found in the case of saturation medium 3. The removal of CPs was followed by incubation of the tissue in physiological conditions. The recovery of tissue morphological structure was observed in the case of procedure 2 for 1,2-PD and DMSO removal and for DMSO in case of procedure 1.

Thus, using DMEM medium with 200 mM sucrose for the procedure of ovarian tissue saturation by CPs and multistep washing procedures using mannitol solution results in the maximum preservation of tissue morphological structure.



Морфологические и фенотипические особенности цитосфер, формирующихся в культуре клеток надпочечников неонатальных поросят в обычных и низкоадгезивных условиях

Е.М. Плаксина, О.С. Сидоренко, Г.А. Божок

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Morphological and Phenotypic Peculiarities of Cytospheres Forming in Adrenal Cell Cultures of Neonatal Piglets in Normal and Low Adhesive Conditions

E.M. Plaksina, O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok

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

Ранее было установлено, что в надпочечниках человека [Santana M.M. и соавт., 2012], быка [Chung K.F. и соавт., 2009], мыши [Debatin K.M., 2013] присутствуют стволовые/прогениторные клетки, формирующие хромосферы, несущие специфические маркеры производных нервного гребня и обладающие способностью дифференцироваться в хромоаффинные клетки и нейроны. Нами была предпринята попытка получения подобных клеток из надпочечников свиней. Стандартный протокол выделения и экспансии нервных стволовых клеток включает культивирование в бессывороточной среде с определенным набором ростовых факторов и использование низкоадгезивных поверхностей.

Целью представленной работы являлось сравнительное изучение морфологических и фенотипических особенностей цитосфер, формирующихся при культивировании клеток надпочечников неонатальных поросят как в обычных условиях, так и в условиях, разработанных для получения хромосфер.

Клеточную суспензию получали из надпочечных желез ферментативным методом. Клетки высевали в концентрации $1-2 \times 10^5$ кл/мл, культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в чашках Петри с низкоадгезивной поверхностью в среде DMEM/F12 и добавляли 2% B27, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 10 Ед/мл гепарина и антибиотиков (бессывороточная среда). Осуществляли замену половины среды раз в 4–5 суток. Для сравнения клетки культивировали в среде DMEM/F12 с 10%-й фетальной телячьей сывороткой в культуральной посуде с нормальной или низкоадгезивной поверхностью. Экспрессию хромогранина А в клетках исследовали методами проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимии с помощью первичных поликлональных антител кролика («Abcam», Великобритания, 1:100) и вторичных антикроличьих AlexaFluor488-конъюгированных антител («Abcam», 1:500).

Формирование флотирующих цитосфер установлено на 5-е сутки при культивировании в низкоадгезивных условиях в сывороткосодержащей и бессывороточной средах. Наблюдалось постепенное увеличение размера цитосфер в течение 28 суток культивирования. Способность цитосфер к прикреплению и дальнейшей пролиферации изучали при их переносе на подложки с адгезивной поверхностью (культуральный планшет, коллаген, фибронектин) и культивировании на среде с 10% ФТС. Различия в экспрессии хромогранина А и морфологические особенности клеток, выселяющихся из цитосфер, позволили сделать вывод о том, что состав среды и степень адгезивности поверхности являются факторами, определяющими клеточный состав и дифференцировочный потенциал цитосфер.

It was previously reported that adrenal glands of human [Santana M.M. *et al.*, 2012], bovine [Chung K.F. *et al.*, 2009] and mice [Debatin KM, 2013] contain stem/progenitor cells forming the chromospheres carrying specific markers of neural crest derivatives and able of differentiation into chromaffin cells and neurons. We have attempted to derive these cells from the adrenal glands of pigs. A standard protocol for isolation and expansion of neural stem cells comprises culturing in a serum-free medium with a particular set of growth factors and use of low adhesive surfaces.

The aim of the research presented was to compare morphological and phenotypic features of the cytospheres forming in cultures of new-born piglet adrenal cells both in normal conditions and in the environment specific for the obtaining chromospheres.

The cell suspension was derived from adrenal glands by enzymatic method. Cells were seeded in a concentration of $1-2 \times 10^5$ cells/ml and cultured at 37°C in atmosphere with 5% CO_2 in Petri dishes with low adhesive surface in DMEM/F12 supplemented with 2% B27, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 10 IU/ml heparin and antibiotics (serum-free medium). A half of the medium was replaced every 4–5 days. To make the comparison samples the cells were cultured in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum in culture dishes with either normal or low adhesive surface. Expression of chromogranin A in cells was examined by flow cytometry and immune cytochemistry using primary polyclonal rabbit antibodies (Abcam, UK, 1: 100) and anti-rabbit secondary antibody conjugated to AlexaFluor488 (Abcam, 1: 500).

Formation of floating cytospheres was found to day 5 in culture with low adhesive conditions in serum containing and serum-free media. A gradual increase in the dimensions of cytospheres was observed within 28 days of culturing. The ability of cytospheres to adhesion and subsequent proliferation was studied following their transfer to the substrates with an adhesive surface (culture plate, collagen, fibronectin) and culturing in the media supplemented with 10% FBS. The differences in chromogranin A expression and morphological characteristics of the cells migrating from cytospheres, allowed to conclude that the composition of medium and adhesive properties of surfaces were the factors determining the cell composition and differentiation potential of cytospheres.



Исследование конформационных изменений белков с применением донорно-акцепторной пары флуоресцентных зондов

И.В. Говор

Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс «Институт монокристаллов» НАН Украины», г. Харьков

Investigation of Conformational Changes in Proteins Using Donor-Acceptor Pair of Fluorescent Probes

I.V. Govor

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

Для разработки новых методик криоконсервирования плазмы крови и органов, а также при мониторинге их сохранности необходимо проводить оценку конформационных изменений белков. В настоящее время для такого мониторинга применяют два подхода, основанных на флуоресценции. При использовании первого метода регистрируют изменение флуоресцентного сигнала от красителя-зонда, спектральные характеристики которого чувствительны к микроокружению, в частности, к конформации белка. Другой метод использует изменение эффективности ферстеровского переноса энергии (FRET) между двумя нечувствительными красителями – донором (D) и акцептором (A), ковалентно связанными с белком. Однако эти классические методы часто не обеспечивают необходимую чувствительность к малым изменениям конформации белка.

В работе представлен новый метод определения конформационных изменений белков, сочетающий оба подхода: в качестве донора и акцептора во FRET-паре использованы чувствительные к микроокружению зонды – скварайновые красители Square-634 (D) и Square-685 (A) («SETA BioMedicals», США). Модельным белком был бычий сывороточный альбумин, конформационные изменения которого вызывали мочевиной ($c_{\text{Urea}} = 0-7 \text{ M}$) в 10 mM фосфатном буфере с pH 7,4. Полученные результаты сопоставляли с таковыми для известных методов: FRET-пары нечувствительных к микроокружению цианиновых красителей Cy5 и Cy5.5 и с использованием индивидуальных флуоресцентных зондов Square-634 и Square-685.

Показано, что наибольшей чувствительностью к конформационным изменениям белка обладает новый метод, использующий FRET-пару чувствительных к микроокружению красителей Square-634 и Square-685. Так, в присутствии 5 M мочевины, вследствие изменения конформации белка, отмечается ~17-кратное уменьшение эффективности FRET. Существенно меньшей чувствительностью (изменение флуоресцентного сигнала примерно в 3–5 раза) обладает известный метод флуоресцентных зондов (Square-634 и Square-685), а еще более низкой чувствительностью (всего ~1,1 раза) – метод FRET (Cy5-Cy5.5).

Таким образом, предложенный метод позволяет значительно повысить чувствительность флуоресцентного определения конформационных изменений белков. Кроме того, этот метод может применяться при определении биологических свойств плазмы крови в процессе длительного хранения.

Работа выполнена при поддержке Национальной академии наук Украины (проект 0113U001410).

To develop new methods for cryopreservation of blood plasma and organs, as well as during monitoring of organs' preservation it is necessary to evaluate the conformational changes of proteins. Currently, for such a monitoring two approaches based on fluorescence measurements are used. One of them is the control of the change in fluorescent signal from a dye-probe, which spectral characteristics are sensitive to a microenvironment, in particular to the protein conformation. The other one consists in the determination of the change of the Foerster energy transfer (FRET) efficiency between two microenvironment-insensitive dyes, donor (D) and acceptor (A), which are bound to protein by a covalent chemical bond. However, these classical methods often do not provide the necessary sensitivity to small changes in protein conformation.

We developed a method to assess the conformational changes in proteins, which combines these two classical approaches: there were used microenvironment sensitive probes as a donor and an acceptor in the FRET pair. Squaraine dyes Square-634 (D) and Square-685 (A) (SETA BioMedicals, USA) were selected as microenvironment sensitive probes. Bovine serum albumin (BSA) was assumed as a model protein. Conformational changes in BSA were induced by urea ($c_{\text{Urea}} = 0-7 \text{ M}$) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. Results of the study were compared to those obtained by the classical methods, *i.e.* using FRET pairs of microenvironment-insensitive cyanine dyes Cy5 and Cy5.5 and fluorescent probe method with individual Square-634 or Square-685 dyes.

New method, using a FRET pair of microenvironment-sensitive Square-634 and Square-685 dyes, was found to be the most sensitive to the conformational changes in protein. In particular, protein unfolding in the presence of 5 M urea caused about 17-fold reduction in the FRET efficiency. Substantially lower sensitivity (3-5 fold variation of the fluorescence signal) exhibited the classical method of fluorescent probes (with Square-634 and Square-685). FRET method (with Cy5-Cy5.5 pair) had the lowest sensitivity (only ~1.1).

To conclude, the proposed method allowed to significantly increase the sensitivity of fluorescence-based examining of conformational changes in proteins. Among others, this method can be applied to determine biological properties of blood plasma during long-term storage.

The investigation was supported by the National Academy of Sciences of Ukraine (Project 0113U001410).



Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза

О.В. Чуб¹, И.Б. Мусатова¹, В.Ю. Прокопюк¹, В.Г. Карпенко²

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

²Харьковская медицинская академия последипломного образования

Effect of Implantation of Cryopreserved Placental Explants on Behaviour Structure in Female Mice of Late Ontogenesis

O.V. Chub¹, I.B. Musatova¹, V.Yu. Prokopyuk¹, V.G. Karpenko²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education

Для улучшения качества жизни, продления периода трудоспособности и социальной активности пожилых людей могут быть использованы плацентарные биообъекты, содержащие разнообразные регуляторы, стволовые клетки и обладающие геропротекторными и геротерапевтическими свойствами. В связи с этим актуальной научной и практической проблемой является исследование механизмов воздействия на организм и биобезопасности плацентарной терапии в гериатрической практике. Цель работы – выявление влияния имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на адаптационные реакции и общие морфологические показатели самок мышей позднего репродуктивного возраста.

Исследовали три экспериментальные группы самок мышей линии BALB/c: 1 – 6-месячные, 2 – 12-месячные, 3 – 12-месячные с имплантацией криоконсервированного экспланта плаценты 1 раз в 3 месяца с 6-месячного возраста. Изучали следующие параметры: внешний вид по 5-бальной шкале, рост, массу, длину хвоста, температуру тела, физическую активность (тестом «открытого поля» определяли вертикальную и горизонтальную локомоторную активность, груминг). Степень тревожности и способность животного адаптироваться к стрессу исследовали методом «крестообразного лабиринта», социальную активность – в «трехкамерном тесте». Физическую силу и выносливость оценивали методом динамометрии и тестом «висения на струне».

Согласно полученным результатам с возрастом у самок мышей в структуре поведения снижается горизонтальная и вертикальная локомоторная активность, а также социальная активность в тесте с однополым животным; уменьшается длительность висения на струне, снижается адаптация к стрессу. Социальная активность в тесте с разнополым животным повышается и остается почти на 30% выше среднего показателя у молодых животных. Увеличиваются также показатели общего балла внешнего вида, роста, веса, длины хвоста, а также физическая сила и груминг.

У самок третьей экспериментальной группы, по сравнению с группами старых и молодых животных, преобладает исследовательское поведение (растет горизонтальная локомоторная активность); увеличена активность в тесте как с однополым, так и с разнополым животным. По сравнению с группой старых самок увеличены общий оценочный балл, масса и физическая сила. Показано, что имплантация экспланта плаценты старым животным способствовала снижению тревожности и влияния стрессорных факторов на структуру их поведения.

Таким образом, у самок мышей возрастные изменения поведения и внешних физических показателей поддаются коррекции путем имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты.

Placental bioobjects, containing different bioregulators, stem cells and possessing geroprotective and gerotherapeutic properties, may be used to improve the quality of life, to extend the active period and social activity of aged people. Therefore, an actual scientific and practical task is to study the impact mechanisms on the body and biological safety of placental therapy in geriatric practice. The research aim was to reveal the impact of implantation of cryopreserved placental explants on adaptation reactions and general morphological indices of female mice in late reproductive age.

We studied three experimental groups of BALB/c female mice: 1 – 6-month-old mice, 2 – 12-month-old animals, 3 – 12-month-old mice with implanted cryopreserved placental explant once in 3 months since age of 6 months. We investigated the following parameters: an external appearance by a 5-point scale, height, weight, length of the tail, body temperature. The open field test was carried out to study the physical activity (we determined the vertical and horizontal locomotor activities, grooming). The degree of anxiety and the animal capability to stress adaptation were examined by the cross-shaped maze test. Social activity was studied in the three-chambered test. The physical strength and endurance were evaluated by dynamometry method and 'string' test.

According to our findings the horizontal and vertical locomotor activities in behaviour structure were reduced with age in female mice, as well as the social activity in the test with same-sex animals; the duration of hanging on string decreased. Social activity in the test with opposite-sex animals was thereby growing and remained almost by 30% higher than average index in young animals. Indices of total point of external appearance, height, weight, tail length, as well as physical strength and grooming increased with the age in female mice.

In female mice of experimental group 3 an exploratory behaviour predominated (increased horizontal locomotor activity) if comparing with the group of aged and young animals; the activity in the test with both same-sex and opposite-sex animals was also increased. If comparing with the group of aged females the total points, weight, physical strength were increased. It was shown that the implantation of placental explant to aged animals contributed to reduce the anxiety and stress factor impact on their behaviour structure.

Thus, in female mice the age-related changes in behaviour and external physical characteristics answer to correction with implantation of cryopreserved placental explants.



Криоконсервирование концентратов тромбоцитов при умеренно низких температурах ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) с консервантами на основе комбинаций криопротекторов

А.В. Коробкова, А.М. Компаниец

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of Platelet Concentrates Under Moderately Low Temperatures ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) With Preservatives Based on Combination of Cryoprotectants

A.V. Korobkova, A.M. Kompaniets

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

При разработке консервантов для замораживания тромбоцитов в условиях низких температур ($-150...-196^{\circ}\text{C}$) экспериментально установлен наиболее высокий уровень криозащитного действия растворов, содержащих комбинации диметилацетамида (ДМАц) с 1,2-пропандиолом (1,2-ПД), глицерином и оксиэтилированным глицерином со степенью полимеризации $n = 5$ (ОЭГ _{$n=5$}).

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности разработанных консервантов при криоконсервировании концентратов тромбоцитов в морозильной камере ($-70...-80^{\circ}\text{C}$).

Концентрат тромбоцитов (КТ), выделенный из отдельных доз донорской крови методом из лейкоцитарного слоя, соединяли в соотношении 1:1 с криозащитными средами, содержащими 10%-ю суммарную концентрацию ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} ; ДМАц/глицерин или ДМАц/1,2-ПД в плазме, а также с 10%-м ДМСО и раствор «Тромбокриодмац» (контроль). Время экспозиции составляло 30 мин. Суспензию тромбоцитов ((110 ± 10) мл) в полимерных контейнерах вместимостью 300 мл помещали в металлические криокассеты и охлаждали по следующему режимам: непосредственно в морозильной камере ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) (режим 1) или охлаждение в парах азота при $-188...-193^{\circ}\text{C}$ до $-65...-70^{\circ}\text{C}$ с последующим хранением в камере (режим 2). Образцы отогревали на водяной бане (37°C). Сохранность КТ оценивали после удаления криопротекторов по следующим показателям: агрегация, индуцированная АТФ (200×10^{-6} и 50×10^{-6} М) и коллагеном ($6,7 \times 10^{-3}$ М); реакция на гипотонический шок, ретракция сгустка; количество тромбоцитов в КТ.

Наиболее высокие показатели сохранности функциональных свойств криоконсервированных КТ по тестам *in vitro* установлены для криоконсерванта ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} при условии замораживания в парах азота с последующим хранением в морозильной камере (режим 2). Для замораживания и хранения при $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (режим 1) наилучшие показатели получены для криоконсерванта ДМАц/1,2-ПД, криозащитная эффективность остальных консервантов распределилась следующим образом (в порядке убывания): ДМАц/ОЭГ _{$n=5$} ; ДМСО; «Тромбокриодмац», ДМАц/глицерин.

Показана возможность повышения эффективности криоконсервирования стандартных доз КТ донорской крови человека при умеренно низких температурах за счет использования комбинированных криоконсервантов, а также более высоких скоростей охлаждения тромбоцитов до температуры -70°C .

When developing the preservatives for freezing platelets under low temperatures ($-150...-196^{\circ}\text{C}$) there was experimentally established the highest level of cryoprotective effect of the solutions, containing combinations of dimethylacetamide (DMAc) with 1,2-propanediol (1,2-PD), glycerol and oxyethylated glycerol with polymerization degree $n = 5$ (OEG _{$n=5$}).

This research aim was to study the efficiency of developed preservatives during platelet concentrate cryopreservation in freezing chamber ($-70...-80^{\circ}\text{C}$).

Platelet concentrate (PC), derived from individual samples of donor blood by the method from buffy coat was combined in 1:1 ratio with cryoprotective media comprising 10% total concentration of DMAc/OEG _{$n=5$} ; DMAc/glycerol or DMAc/1,2-PD in plasma, as well as with 10% DMSO and 'Trombokriodmats' solution (control). The exposure time was 30 min. Platelet suspension ((110 ± 10) ml) in 300 ml polymeric containers was placed into metal cryoholders and cooled by the following regimens: directly in freezing chamber ($-70...-80^{\circ}\text{C}$) (Regimen 1) or cooling in nitrogen vapours at $-188...-193^{\circ}\text{C}$ to $-65...-70^{\circ}\text{C}$ with following storage in a chamber (Regimen 2). Samples were thawed in a water bath (37°C). PC integrity was assessed after cryoprotectants removal according to the following indices: aggregation, induced by ATP (200×10^{-6} and 50×10^{-6} M) and collagen ($6,7 \times 10^{-3}$ M); response to hypotonic shock, clot retraction; number of platelets in PC.

The highest indices of preserved functional properties of cryopreserved PC according to *in vitro* tests were established for cryopreservative DMAc/OEG _{$n=5$} for freezing in nitrogen vapours and following storage in freezing chamber (Regimen 2). For the regimen of freezing and storage at $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (Regimen 1) the best indices were obtained for DMAc/1,2-PD, a cryoprotective efficiency of other preservatives was arranged as follows (in descending order): DMAc/OEG _{$n=5$} ; DMSO; 'Trombokriodmats', DMAc/glycerol.

Thus, the study showed the possibility to increase the cryopreservation efficiency for the standard dose of human donor blood PC under moderately low temperatures due to applying combined cryopreservatives, as well as higher cooling rates for platelet cooling down to -70°C .



Характеристика холодовых ран при лечении криоконсервированной сывороткой кордовой крови

И.О. Ищенко¹, А.А. Власов¹, Г.А. Ковалев¹, О.В. Наумова², Б.П. Сандомирский¹

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

²Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

Characteristics of Cold Wounds Under Therapy With Cryopreserved Cord Blood Serum

I.O. Ischenko¹, A.A. Vlasov¹, G.A. Kovalev¹, O.V. Naumova², B.P. Sandomirsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Kharkov National Medical University

Улучшение результатов лечения ран – одна из важнейших задач хирургии. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови (КСКК) является источником естественных биорегуляторов, способных стимулировать репарацию тканей. Цель исследования – изучить влияние лечения КСКК на морфологические проявления холодового раневого процесса в эксперименте.

Холодовые раны моделировали на крысах породы «Сфинкс» медным аппликатором диаметром 10 мм с температурой -196°C в течение 30 с. Введение КСКК (экспериментальная группа (ЭГ)) и 0,9%-го раствора NaCl (контрольная группа (КГ)) осуществляли на протяжении 10 дней внутримышечно по 0,1 мл/кг массы тела, через день, начиная с 3-х суток после криодеструкции.

Морфологическая картина ран на 7-е сутки наблюдения во всех группах была представлена зоной некроза, окруженной перифокальным клеточным валом различного состава. У животных КГ инфильтрат представлен лейкоцитарно-макрофагальными клеточными элементами в глубоких отделах и грануляционной тканью (ГТ) в периферических. В ЭГ во всех наблюдениях определялся непрерывный широкий пласт ГТ, выявлены уменьшение нейтрофильной инфильтрации и усиление макрофагально-фибробластического представительства. Во всех группах отмечена краевая эпителизация дефекта, однако регенерирующий эпидермис с очаговой гипертрофией, гипертрофией и дистрофией клеток был наиболее выражен в КГ. На 14-е сутки в обеих группах отмечена позитивная динамика раневого процесса. В ранах у животных КГ под зоной некроза сформирован пласт созревающей ГТ. В нижних отделах ГТ представлена горизонтальными фибробластами, сосудами, коллагеновыми волокнами. Верхние отделы ГТ состоят из участков вертикально ориентированных сосудов, тяжелой фибробластов. В ранах большинства животных ЭГ ГТ полностью заполняет зону предшествующей криотравмы, характеризуется усилением коллагенообразования в нижних отделах и формированием непрерывного слоя сосудов в верхних. Эпидермизация более активно происходит в ЭГ, а очаговые пролиферативные и дистрофические изменения эпидермиса в ней носят менее выраженный характер. К 21-м суткам наблюдения раны очищаются от некротических масс. Четко определяются такие признаки перестройки ГТ, как увеличение содержания волокнистых структур, уменьшение количества клеточных элементов и сосудов. При этом выраженность и распространенность очаговых пролиферативных и дистрофических процессов в эпидермисе крыс ЭГ была ниже, чем в КГ.

Таким образом, лечение КСКК оказывало позитивное влияние на динамику морфологических признаков раневого процесса, которое, по-видимому, реализовывалось комплексным эффектом ее биологически активных веществ.

The improvement of wound therapy is one of the most important tasks in surgery. Cryopreserved cord blood serum (CCBS) is the source of natural bioregulators, capable to stimulate the tissue reparation. The research aim was to study the effect of CCBS therapy on morphological manifestations of cold wound process in the experiment.

Cold wounds were modeled in Sphinx rats using copper applicator of 10 mm diameter with temperature -196°C during 30 sec. The administration of CCBS (experimental group (EG)) and 0.9% NaCl solution (control group (CG)) was done intramuscularly by 0.1 ml/kg of body weight for 10 days in a day starting from day 3 after cryodestruction.

Morphological pattern of wounds to day 7 of observation in all the groups was represented by necrotic area, surrounded with perifocal cell bank of different composition. In CG animals the infiltrate was represented by leukocyte-macrophage cell elements and granulation tissue (GT) in deep and peripheral compartments, respectively. In EG in all the observations there was determined a continuous wide layer of GT, a decrease in neutrophil infiltration and strengthening of macrophage-fibroblast representation. In all the groups there was noted a marginal epithelization of the defect, but a regenerating epidermis with a focal hyperplasia, hypertrophy and cell dystrophy was the most pronounced in CG. To day 14 a positive dynamics of wound process was noted in both groups. In wounds of CG animals the layer of maturing GT was formed under necrotic area. In lower compartments the GT was represented by horizontal fibroblasts, vessels, collagen fibers. The upper compartments of GT consisted of the sites of vertically oriented vessels and fibroblast bands. In the wounds of most EG animals the GT completely filled the area of previous cryoinjury, that was characterized by strengthening of collagen-formation in lower compartments and formation of continuous vascular layer in the upper ones. The epidermization proceeded more actively in EG, but focal proliferative and dystrophic changes of epidermis in it were less pronounced. To day 21 of observation the wounds were free of necrotic mass. Such signs of GT rearrangements as an increased content of fibrous structures, the reduction of a number of cell elements and vessels were distinct. At the same time the visibility and prevalence of focal proliferative and dystrophic processes in EG rat epidermis was lower than in CG.

Thus, the CCBS therapy positively affected the dynamics of morphological signs of wound process, which was apparently implemented via a number of effects of biologically active substances.



Вплив водного колоїдного розчину фулерену C60 на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*

О.О. Власов¹, С.І. Панов¹, Г.О. Ковальов¹, І.В. Белочкіна¹, О.Є. Ніпот¹,
Н.М. Шпакова¹, І.О. Єфімова², Б.П. Сандомирський¹

¹Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

²Харківська обласна травматологічна лікарня

***In Vivo* Study of Effect of C60 Fullerene Aqueous Colloidal Solution on Membrane State and Biochemical Indices**

O.O. Vlasov¹, S.I. Panov¹, G.O. Kovalov¹, I.V. Byelochkina¹, O.E. Nipot¹,
N.M. Shpakova¹, I.O. Yefimova², B.P. Sandomirsky¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Kharkiv Regional Traumatological Hospital

Однією з актуальних проблем розвитку сучасних нанобіотехнологій є цілеспрямоване застосування біосумісних нанорозмірних матеріалів. Перспективи застосування фулеренів у медицині пов'язують із їхньою високою антиоксидантною активністю. Активація вільнорадикальних процесів відіграє істотну негативну роль у пошкодженні біологічних об'єктів після впливу низьких температур, тому застосування фулеренів на етапах криоконсервування біооб'єктів може бути перспективним. Враховуючи властивості фулеренів, можливо передбачити їх потрапляння з трансплантатом в організм реципієнта. Проте, дані щодо токсичності фулеренів наразі є суперечливими.

Метою роботи було дослідження впливу внутрішньочеревного введення водного колоїдного розчину фулерену C60 на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів, а також на біохімічні маркери гепатотоксичності у щурів.

У дозі 1 мг/кг вводили C60 в концентраціях 34,7 мкмоль/л (група 1) і 173 мкмоль/л (група 2). Через 1 і 5 діб досліджували осмотичну крихкість еритроцитів у гіпотонічних розчинах NaCl (40–100 ммоль/л). У сироватці крові визначали концентрації аспартатамінотрансферази (АСТ), аланінаміно-трансферази (АЛТ), лужної фосфатази (ЛФ).

При вивченні чутливості еритроцитів до гіпотонії через добу після введення C60 в обох групах відзначали підвищення на 30–60% рівня гемолізу в 70 ммоль/л і 60 ммоль/л розчині NaCl. У групі 1 на 5-у добу цей показник був таким, як і на 1-у добу спостереження, а у групі 2 він знижувався у 60 ммоль/л розчині NaCl на 20% і у 70 ммоль/л розчині NaCl – до рівня контролю. У групі 1 активність АСТ і АЛТ через добу після введення C60 зростала відповідно в 1,9 і 1,8 раза, вміст ЛФ не змінювався. Через 5 діб активність усіх аналітів у цій групі відповідала рівню контролю. У групі 2 всі досліджені біохімічні показники не відрізнялися від контролю.

Таким чином, внутрішньочеревне введення C60 в обох концентраціях впливає на в'язко-еластичні властивості мембрани еритроцитів, збільшуючи їх чутливість до гіпотонії. При використанні C60 у концентрації 34,7 мкмоль/л виявляється його помірний короточасний гепатотоксичний ефект.

Висловлюємо подяку проф. Ю.І. Прилуцькому (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Україна) за надані водні колоїдні розчини фулерену C60.

One of the actual tasks in modern nanobiotechnology is a targeted use of biocompatible nano-sized materials. The prospects of fullerene application in medicine are associated with their high antioxidant activity. The activation of free radical processes plays a strong negative role in damaging biological objects after exposure to low temperatures. Therefore the use of fullerenes at the stages of bioobject cryopreservation may be promising. Taking into account the properties of fullerenes we may envisage their coming into a recipient's body with a transplant. However, the data on fullerene toxicity is now controversial.

The research aim was to study the effect of intraperitoneal administration of aqueous colloidal solution of C60 fullerene on visco-elastic properties of erythrocyte membranes, as well as on biochemical markers of hepatotoxicity in rats.

We injected C60 in 1 mg/kg dose at the concentrations of 34.7 μmol/l (group 1) and 173 μmol/l (group 2). An osmotic fragility of erythrocytes in hypotonic NaCl solutions (40–100 mmol/l) was studied in 1 and 5 days. The concentrations of aspartate aminotransferase (AsT), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP) were examined in blood serum.

When studying the erythrocyte sensitivity to hypotony in a day after administering C60 an increased hemolysis level by 30–60% in 70 mmol/l and 60 mmol/l NaCl solutions was noted in both groups. To day 5 in the group 1 this index was similar to day 1 of observation, but in group 2 it reduced in 60 mmol/l NaCl and 70 mmol/l NaCl solutions by 20% and down to the control level, respectively. In group 1 the AsT and ALT activity in a day after C60 administration increased in 1.9 and 1.8 times, respectively, the AP content remained unchanged. After 5 days the activity of analysed enzymes in this group corresponded to the control level. In group 2 all the studied biochemical indices did not differ from the control.

Thus, an intraperitoneal administration of C60 in both concentrations affects the visco-elastic properties of erythrocyte membranes, by increasing their sensitivity to hypotony. When using C60 in 34.7 μmol/l concentration there was revealed its moderate short-term hepatotoxic effect.

We thank Prof. Prylutsky Yu.I. (Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine) for providing aqueous colloidal solutions of C60 fullerene.



Вплив температур зберігання на життєздатність клітин *Escherichia coli* M-17

Т.В. Дорофєєва¹, О.В. Кудокоцева²

¹КЗОЗ Харківська обласна клінічна лікарня №1

²Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Storage Temperatures on *Escherichia coli* M-17 Cell Viability

T.V. Dorofeyeva¹, O.V. Kudokotseva²

¹Kharkiv Regional Clinical Hospital N1, Kharkov, Ukraine

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

У сучасному біотехнологічному виробництві усе частіше використовують консервованій посівний матеріал, який важливо стандартизувати і зберігати в необхідній кількості. Було досліджено вплив температурних режимів зберігання на життєздатність пробіотичного штаму *Escherichia coli* M-17. Для цього клітини *E. coli* M-17 суспендували в рідкому живильному середовищі М9 та поміщали в блоки гелів альгінату натрію та к-карагінану і спостерігали за зразками протягом 6 місяців та 1 року. Зразки зберігали за температур 4, –20, –80, –196°C. При температурі 4°C значущого зниження життєздатності бактерій не відмічено. Впродовж 6-ти місяців кількість життєздатних клітин знижувалася на 0,75 lg числа КУО/мл, а впродовж 12-ти місяців – на 1,47 lg числа КУО/мл у порівнянні з контролем. Під час зберігання при –20°C кількість життєздатних клітин поступово зменшувалась та після 12-ти місяців знизилась у 1,8 раза. Після зберігання клітин у середовищі М9 при –80°C протягом 12-ти місяців кількість життєздатних клітин залишалася на тому ж рівні. Під час зберігання клітин у середовищі М9 при –196°C їх життєздатність також залишалася на початковому рівні протягом 12-ти місяців. Під час зберігання *E. coli* M-17 в альгінатному гелі впродовж 12-ти місяців при 4°C життєздатність бактерій знижувалася і через рік складала (9,37 ± 0,06) lg числа КУО/мл, що в 2,1 раза менше, ніж у контролі. При охолодженні клітин у гелі альгінату натрію при –20°C та подальшому зберіганні за цієї температури впродовж 12-ти місяців кількість життєздатних клітин знижувалася в 2,6 раза. При зберіганні клітин в альгінатному гелі при температурах –80 і –196°C впродовж 12-ти місяців не встановлено значущого зниження їх життєздатності. Зберігання клітин *E. coli* M-17 у 1% к-карагінані показало, що при 4°C після 6 і 12-ти місяців показники життєздатності знижувалися в 1,4 і 2,0 раза відповідно, при –20°C кількість життєздатних бактерій складала 58,9 і 26,8% відповідно по відношенню до контролю. Заморожування і зберігання клітин у 1% к-карагінані при –80 та –196°C забезпечувало збереження бактерій на вихідному рівні впродовж 6 і 12-ти місяців.

Таким чином, при зберіганні впродовж року за температури –80, –196°C кількість вільних та іммобілізованих у гелях клітин *E. coli* M-17 не змінюється. При 4°C краще зберігаються клітини, суспендовані в середовищі М9. Найменші значення життєздатності клітин спостерігали після їх зберігання при –20°C.

Contemporary biotechnological industry widely utilizes the banked seeding material, which should be standardized and stored in sufficient amount. We investigated the effect of storage temperature regimens on the viability of probiotic *Escherichia coli* strain M-17. For this purpose the *E. coli* M-17 cells were suspended in liquid nutrient M9 medium and placed into the sodium alginate and k-carrageenan gel blocks. Observation terms were 6 months and 1 year. The samples were stored at 4, –20, –80, –196°C. No significant decrease in bacterial viability was observed at 4°C. Within 6 and 12 months a number of viable cells decreased by 0.75 and 1.47 lg CFU/ml, respectively, as compared to the control. During storage at –20°C a number of viable cells gradually reduced and after 12 months decreased in 1.8 times. After storing the cells in M9 medium at –80°C within 12 months a number of viable cells remained at the same level. When storing the cells in M9 medium at –196°C their viability also remained at an initial level within 12 months. During 12-month-storage of *E. coli* M-17 in alginate gel at 4°C the bacterial viability decreased and a year later was (9.37 ± 0.06) lg CFU/ml, that was in 2.1 times lower, than in the control. Cooling of cells in sodium alginate gel at –20°C and following storage at the same temperature within 12 months resulted in a 2.6 times reduction of viable cells number. During cell storage in alginate gel at –80 and –196°C during 12 months no significant decrease in the viability was revealed. The *E. coli* M-17 cell storage in 1% k-carrageenan demonstrated a decrease in viability indices in 1.4 and 2.0 times after 6 and 12 months at 4°C, respectively, and at –20°C the number of viable bacteria was 58.9 and 26.8% of the control, respectively. Cell freezing and storage in 1% k-carrageenan at –80 and –196°C provided the bacteria preservation at an initial level during 6 and 12 months.

Thus, one-year storage at –80 and –196°C did not result in significant changes of number of free and immobilized in gel *E. coli* M-17 cells. Storage at 4°C represented higher survival of the cells suspended in M9 medium. The lowest values of cell viability were observed after storage at –20°C.



Создание трехмерного трансплантата поверхностных слоев клеток роговицы

A.C. Kavelina¹, A.G. Popandopulo¹, O.S. Prokopyuk², M.V. Savchuk¹

¹Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, г. Донецк

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

Creation of 3d Graft of Corneal Surface Layers

A.S. Kavelina¹, A.G. Popandopulo¹, O.S. Prokopyuk², M.V. Savchuk¹

¹V.K. Husak Institute of Urgent and Reconstructive Surgery, Donetsk, Ukraine

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

В клинической медицине возрастает интерес к использованию тканевых биогенных стимуляторов, в частности, к амниону. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* доказали, что мембрана может быть успешно использована в качестве субстрата для культивирования эпителиальных стволовых клеток роговицы человека и их последующего применения в лечении тяжелой патологии поверхности глаза. Цель работы – создание трехмерного трансплантата слоев клеток роговицы на амниотической оболочке (АО) путем поэтапного культивирования лимбальных стволовых клеток (ЛСК) и клеток плоского эпителия (КПЭ) роговицы человека на стромальной стороне и базальной мембране.

Для исследования использовали криозамороженный амнион и первичные культуры, выделенные из энуклеированной роговицы человека [Попандопуло А.Г., 2014]. Размороженную мембрану аккуратно расправляли на стерильной фольге и разрезали на небольшие кусочки размером 1x1см². В 8-луночное плато помещали по четыре образца базальной мембраной вверх и четыре – стромальной стороной. Наносили на поверхности амниона по 10 тыс. ЛСК в 200 мкл питательной среды [Гринь В.К., 2011]. После достижения конфлюэнтного лимбального монослоя на поверхности АО, наносили суспензию КПЭ роговицы и культивировали в течение 3-х дней. Для идентификации [Turksen K., 2012.] культивированных клеток роговицы использовали иммуногистохимию (P63, цитокератин 19, цитокератин 3/12, виментин, α-SMA, кератин сульфат, Ki 67, CD 34, CD 45, CD 117, ALDH3A1).

Результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о повышенном потенциале пролиферации и дифференциации субпопуляции ЛСК роговицы человека. Специфические маркеры, характерные для этого вида клеток, не экспрессируются в клетках плоского эпителия. Поэтапное культивирование клеток роговицы человека на АО в течение 3–7 дней позволило сформировать на его поверхности полноценные конфлюэнтные монослои с прочными состоятельными межклеточными взаимодействиями. Полупрозрачная мембрана обладает прочностью и практичностью. Можно предположить, что ее морфологические характеристики благоприятно влияют на способность усиливать рост и дифференциацию ЛСК. Культивирование поверхностных слоев клеток роговицы на стромальной стороне и базальной мембране амниона существенно не отличалось.

Clinical medicine represents an increasing interest to the application of tissue biogenic stimulators, in particular, to the amnion. *In vitro* and *in vivo* investigations have shown that the membrane can be successfully used as a substrate for culturing epithelial stem cells of human cornea and their subsequent application when treating severe ocular surface pathologies. The research aim was to create three-dimensional graft of cornea cell layers on amniotic membrane (AM) by stepwise culturing of limbal stem cells (LSC) and squamous epithelial cells (SEC) of human cornea on a stromal side and basal membrane.

The research was performed in cryopreserved amnion and primary cultures derived from an enucleated human cornea [Papadopoulou A.G., 2014]. Frozen-thawed membrane was gently spread on a sterile foil and cut into small pieces of 1x1 cm² size. In each 8-well plate we placed four samples by a basal side upwards and the four pieces by stromal side. The amnion surface was covered with 10 thousand of LSCs in 200 μl of nutritive medium [Grin V.K., 2011]. After achieving the confluent limbal monolayer on AM surface the suspension of corneal SEC was introduced and then cultured for 3 days. Cultured corneal cells were identified immunohistochemically [Turksen K., 2012.] (P63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, vimentin, α-SMA, keratin sulfate, Ki 67, CD 34, CD 45, CD 117, ALDH3A1).

The results of *in vitro* studies showed an increased potential for proliferation and differentiation of human corneal LSC subpopulation. Specific markers which are characteristic for this type of cells were not expressed in the cells of the squamous epithelium. The stepwise culturing of human corneal cells on AM within 3–7 days allowed the formation on its surface of full confluent monolayers with strong cell-to-cell bonds. Semitransparent membrane was durable and efficient. Its morphological characteristics can be assumed as favorably affecting the ability to enhance the growth and differentiation of the LCS. Culturing of the corneal surface layers on stromal cells and the amnion basal membrane did not significantly differ.



Применение криоконсервированных плодовых оболочек для лечения нейротрофических язв

A.A. Roenko, V.Yu. Prokopyuk, O.V. Falko, N.A. Shevchenko, V.V. Volina, O.S. Prokopyuk
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Cryopreserved Amniotic Membranes In Therapy of Neurotrophic Ulcers

A.A. Roenko, V.Yu. Prokopyuk, O.V. Falko, N.A. Shevchenko, V.V. Volina, O.S. Prokopyuk
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

В настоящее время нейротрофические язвы диагностируют у 2% лиц трудоспособного возраста. Разработано множество препаратов для лечения данной патологии, однако применение большей части из них не дает быстрого заживления очага и приводит к развитию побочных эффектов [Tricco A.C., 2015]. Целью работы было определение эффективности применения криоконсервированных фрагментов хориальной (ХО) и амниотической (АО) оболочек при моделированных нейротрофических язвах конечности.

Объектом исследования были криоконсервированные по ранее разработанной методике фрагменты плодовых оболочек. Нейротрофические язвы моделировали у мышей путем внутрикожного введения 0,1 мл 9%-й уксусной кислоты с последующей термокоагуляцией нервно-сосудистого пучка в зоне отхождения бедренных и подвздошных сосудов. На всю площадь язвы на 24 ч нанесли АО и ХО, а в группе сравнения – мазь «Солкосерил». Повязки накладывали четырехкратно с перерывом 48 ч. Оценивали среднюю площадь (СП) язвы, функциональный тест «ошибка ног», морфологические изменения структуры ткани в зоне повреждения.

На момент начала лечения СП язвы составляла 64 мм², конечность выглядела отечной и цианотичной, животное на нее не опиралось. Морфологическое исследование показало образование раневого дефекта, заполненного некротическими массами, густо инфильтрированными нейтрофильными лейкоцитами. В глубине дефекта выявлялись остатки соединительнотканых волокон дермы и мышечных волокон собственной мышцы кожи. К 11-му дню после начала применения ХО и АО СП язвы составляла 28 мм², а количество неполноценных шагов – 15 и 25% соответственно. Язва полностью очищалась и полноценная грануляционная ткань с вертикальными сосудами заполняла язвенный дефект. У нелеченных животных и после применения мази «Солкосерил» СП язвы составляла 36–38 мм², животные делали 30 и 36% ошибок ног. Окружающая зону дефекта ткань была достаточно зрелая, грануляционная с умеренным содержанием макрофагов и лимфоцитов. Поверхность дефекта была покрыта струпом. Выявлялась умеренная краевая эпителизация дефекта. К 25-у дню после начала применения ХО и АО полностью заживали язвы, восстанавливалась функциональная способность конечности. Морфологически отмечалась полная эпителизация язв. На месте грануляционной ткани была зрелая и полностью сформированная новообразованная соединительная ткань. У нелеченных животных и после применения мази «Солкосерил» СП язвы составляла 15 и 10% соответственно, животные делали 10% неправильных шагов. Морфологически наступало значительное уменьшение размеров раневых дефектов за счет выраженной краевой эпителизации.

Nowadays the neurotrophic ulcers are diagnosed in 2% of working age people. There has been designed a variety of drugs for this pathology therapy, but the use of most of them does not provide rapid healing of the lesion focus and results in side effects development [Tricco A.C., 2015]. The research aim was to determine the efficiency of applying the cryopreserved chorionic (CM) and amniotic (AM) membrane fragments in therapy of experimental neurotrophic ulcers of limb.

The research objects were the amniotic membrane fragments, cryopreserved by previously developed technique. Neurotrophic ulcers were simulated in mice by intradermal injection of 0.1 ml 9% acetic acid followed by thermocoagulation of neurovascular bundle in the area of origin of femoral and iliac vessels. The AM and CM were applied onto the entire area of the ulcer for 24 hours, and the comparison group was treated with Solcoseryl ointment. The dressings were applied four times each 48 hrs. An average area (AA) of ulcer, functional 'foot error' test, morphological changes in tissue structure within an injured area were estimated.

At the start of therapy the ulcer AA was 64 mm², the limb looked oedematous and cyanotic, the animal could not lean on it. Morphological examination showed the formation of a wound defect, filled with necrotic masses, densely infiltrated with neutrophilic leukocytes. In the depth of the defect we revealed the remnants of dermal connective tissue fibers and muscular fibers of intrinsic skin muscle. To day 11 after first application of the CM and AM the ulcer AA was 28 mm², and the amount of incomplete steps was 15 and 25%, respectively. The ulcer was completely clean and the lesion was filled with normal granulation tissue with vertical vessels. In non-treated animals and in those after applying Solcoseryl ointment the ulcer AA was 36–38 mm², the animals made 30 and 36% of foot errors. The tissue, surrounding the lesion area was quite mature, had granulation with moderate content of macrophages and lymphocytes. The lesion surface was covered with a scab. A moderate marginal epithelization of the defect was revealed. To day 25 after the first CM and AM application the ulcers were completely healed, a functional ability of the limb was recovered. A complete epithelialization of ulcers was showed morphologically. The granulation tissue was substituted with mature and normal newly formed connective tissue. In non-treated animals and in those after applying Solcoseryl ointment the ulcer AA was 15 and 10%, respectively, the animals made 10% step failures. A significant reduction in size of wounds occurred due to a pronounced marginal epithelization as shown morphologically.

