

Перспективы использования криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток и макропористых губок на основе криогелей агарозы и альгината для тканевой инженерии

Ю.А. ПЕТРЕНКО¹, Л.Г. ДАМШКАЛН², В.И. ЛОЗИНСКИЙ², А.Ю. ПЕТРЕНКО¹

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

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва

Perspectives in Using Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells and Agarose Cryogel- and Alginate-Based Macroporous Sponges for Tissue Engineering

YU.A. PETRENKO¹, L.G. DAMSHKALN², V.I. LOZINSKY², A.YU. PETRENKO¹

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

²A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds
of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Тканевая инженерия – быстро развивающееся направление биотехнологии, основанное на использовании комплекса клеток и биоматериалов различной природы для создания *in vitro* функционирующих тканей для последующей трансплантации. В качестве “клеточной” составляющей наиболее перспективными являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), способные к направленной дифференцировке в различные типы клеток. В качестве носителей МСК целесообразно использовать пористые губки на основе полимеров.

В данной работе оценена возможность использования новых макропористых губок на основе криогелей агарозы и альгината в качестве носителей МСК, предварительно подвергнутых криоконсервированию.

В работе использовали криоконсервированные МСК костного мозга человека 4–6-го пассажа. Иммунофенотип клеток определяли с использованием проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD Biosciences). Макропористые губки (МГ) на основе криогелей агарозы или альгината изготавливали согласно методике, разработанной Лозинским В.И. и соавт. (Пат. РФ № 2220987). При этом МГ содержали различные концентрации (0,125, 0,25 и 0,5%) желатина. МСК помещали в МГ с использованием различных подходов и культивировали в течение 1–4 недель. Метаболическую и пролиферативную активность МСК в трехмерных носителях определяли с использованием Alamar Blue (AB) теста.

Иммунофенотипический анализ показал, что клетки обладают специфическим для МСК фенотипом (CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻). При заселении МСК в МГ на основе криогеля альгината было установлено, что содержание желатина в составе МГ существенно влияет на метаболическую и пролиферативную активность клеток при культивировании. Наиболее высокими показателями пролиферативной активности обладали МСК в губках с ковалентно присоединенным желатином. Клетки, культивированные в криогелевых губках на основе агарозы с ковалентно присоединенным желатином, также обладали высокой адгезивной и пролиферативной активностью. Гистологические исследования не выявили существенных различий в распределении клеток внутри МГ, состоящих из агарозы и альгината.

Таким образом, криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки и макропористые криогелевые губки на основе альгината и агарозы являются перспективными компонентами для разработки биоинженерных конструкций соединительной ткани.

Tissue engineering is an actual and rapidly developing direction in biotechnology, based on using cell and biomaterial complex of different origin to create the *in vitro* functioning tissues for following transplantation. The multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs), capable of a directed differentiation into different cell types are the most perspective ones as “cell” component. Porous sponges on different polymer base may be used as the carriers for MSCs.

The possibility to use the new macroporous sponges on agarose and alginate cryogel base as 3D MSCs carriers, preliminarily subjected to cryopreservation, has been estimated in this research.

Human bone marrow cryopreserved MSCs of 4–6 passages have been used in the research. Cell immune phenotype was determined with flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences). Macroporous sponges (MS) on agarose and alginate cryogel base were produced according to the methods, designed by Lozinsky V.I. (RF Pat. N 220987). At the same time MS comprised different gelatin concentrations (0.125, 0.25, 0.5%). MSCs were placed into MS with applying different approaches and cultured for 1–4 weeks.

Metabolic and proliferative activities of MSCs in 3D carriers were determined with Alamar Blue (AB) test.

The immune phenotype analysis has demonstrated cells to have the phenotype, specific for MSCs (CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺ and CD34⁻, CD45⁻). When inoculating MSCs into MS on alginate cryogel base, the gelatin content as a part of MS was established as significantly affecting the metabolic and proliferative cell activities during culturing. MSCs in sponges with covalently associated gelatin had the highest indices of proliferative activity. Cells, cultured in agarose-based cryogel sponges with covalently associated gelatin, had a high adhesive and proliferative activities as well. No significant differences in cell distribution inside MS, consisting of agarose and alginate, were revealed during histological studied.

Thus, cryopreserved mesenchymal stromal cells and alginate- and agarose-based macroporous cryogel sponges are the perspective component to design bioengineered constructions of connective tissue.

Научный и практический потенциал линий эмбриональных стволовых клеток человека

С.Л. КИСЕЛЕВ¹, М.А. ЛАГАРЬКОВА²

¹Институт стволовых клеток человека, г. Москва

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Scientific and Practical Potential of Human Embryonic Stem Cell Lines

S.L. KISELEV¹, M.A. LAGARKOVA²

¹Institute of Human Stem Cells, Moscow, Russia

²N.I. Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Стабильные линии эмбриональных стволовых клеток получают из внутренней клеточной массы бластоцисты, которые в норме дают начало всем тканям будущего эмбриона. Определенные условия культивирования позволяют неограниченно долго сохранять эти клетки в плюрипотентном состоянии, а добавление ростовых факторов приводит к дифференцировкам в определенном направлении. Наличие этих составляющих позволяет иметь постоянный стабильный и стандартизованный источник клеток для исследований ранних этапов эмбрионального развития или получения клеток для их практического использования.

Stable lines of embryonic stem cells are derived from an internal cell mass of blastocyst, that normally gives rise for all tissues of future embryo. The certain culturing conditions enable an unlimited long-term storage of these cells in a pluripotent state and the adding of growth factors results in the certain lineage. The presence of these components allows having a constant, stable and standardized cell source either for research of early stages of embryo development or cell procurement for practical usage.

Типы реакций стволовых клеток крови и исходы острых воспалительных процессов на примере инфаркта миокарда

Н.И. ЯБЛУЧАНСКИЙ

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Types of Blood Stem Cell Reactions and Outcomes of Acute Inflammatory Processes in Terms of Myocardial Infarction

N.I. YABLUCHANSKY

V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

В обеспечении жизнедеятельности организма ключевую роль играют стволовые клетки. Это обусловило распространение технологии культивирования и трансплантации аутологичных стволовых клеток при многих патологических состояниях и показаниях: от опухолевых заболеваний крови до управления восстановительными процессами разной природы.

Одним из примеров эффективности трансплантации аутологичных стволовых клеток – острый инфаркт миокарда. Однако существует два важных момента. Во-первых, аутологичные стволовые клетки – естественные участники всех процессов в зоне инфаркта от первых клеточных реакций до формирования завершеного послеинфарктного рубца с последующим поддержанием его самообновления. Во-вторых, известные осложнения при заживлении зоны инфаркта связаны с нарушениями кинетики и динамики аутологичных стволовых клеток.

Существуют два крайних варианта нарушения кинетики и динамики аутологичных стволовых клеток в осложненном заживлении зоны инфаркта миокарда с множеством переходных вариантов. Оба они связаны с нарушениями стресса по гипо- и гиперреактивному вариантам.

Следствием гипореактивного дистресса является замедление кинетики и динамики аутологичных стволовых клеток с медленным развитием некротических процессов и, как результат, более поздним началом и медленным формированием на месте некротизирующегося миокарда соединительной ткани. Как результат, развиваются осложнения от острых разрывов до хронической аневризмы сердца.

Следствие гиперреактивного дистресса – ускорение кинетики и динамики аутологичных стволовых клеток с крайне быстрым развитием некротических процессов и отставанием от них с медленным формированием на месте некротизирующегося миокарда соединительной ткани. Результат тот же.

Таким образом, аутологичные стволовые клетки – естественные участники восстановительных процессов, с кинетикой и динамикой которых связан как положительный, так и возможный отрицательный исход последних. Трансплантация аутологичных стволовых клеток должна соотноситься с особенностями и фазовым развитием процесса, по поводу которого она выполняется.

Stem cells play a key role in providing vital activity of an organism. This stipulated the extension of technology for autologous stem cell culturing and transplantation under many pathological states and indications: from tumoral blood diseases to the control for regenerative processes of different origin.

One of the examples of autologous stem cell efficient transplantation is an acute myocardial infarction. However, there are two important moments. First, the autologous stem cells are the natural participants in all processes in the infarction area from the first cell responses to the formation of completed post-infarction scar with following maintenance of its self-renewal. Secondly, the known complications during infarction area healing are associated with disorders in kinetics and dynamics of autologous stem cells.

There are two utmost variants of disorder in kinetics and dynamics of autologous stem cells at a complicated healing of myocardial infarction area with numerous transitive variants. They both are associated to stress disorders by hypo- and hyperreactive variants.

The result of hyporeactive distress is a slowing down of kinetics and dynamics of autologous stem cells with a slow development of necrotic processes, resulting in later beginning and a slow formation of connective tissue at necrotizing myocardium place. As a result, the complications from acute ruptures to chronic cardiac aneurysm are in progress.

Hyperreactive distress results in acceleration of kinetics and dynamics of autologous stem cells with extremely rapid development of necrotic processes and delaying with a slow formation of connective tissue at necrotizing myocardium place. The result is the same.

Thus, the autologous stem cells are the natural participants in recovery processes, with kinetics and dynamics of which are associated both positive and possibly negative outcome of the latter. The autologous stem cell transplantation should correlate with the peculiarities and phase development of the process, which is targeted to.

Роль фактора росту Flt-3 у регуляції проліферативної активності AC133⁺ клітин кордової крові

Н.М. БІЛКО¹, С.В. ВАСИЛОВСЬКА¹, Д.І. БІЛКО¹, І.А. ВОТЯКОВА²

¹Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету "Києво-Могилянська академія"

²Медичний Центр тканинної і клітинної терапії "Ембріотек", м. Київ

Role of Flt-3 Growth Factor in Regulating Proliferative Activity of AC133⁺ Cord Blood Cells

N.M. BILKO¹, S.V. VASILOVSKA¹, D.I. BILKO¹, I.A. VOTYAKOVA²

¹Center of Molecular and Cellular Research at National University
of "Kyiv-Mohyla Academy", Kyiv, Ukraine

²Medical Center of Tissue and Cell Therapy "Embryotech", Kyiv, Ukraine

AC133⁺ (CD133) є маркером поліпотентних стовбурових клітин, який характеризує найбільш примітивні популяції негемопоетичних клітин. З іншого боку, ці клітини вважаються попередниками гемопоетичних клітин і визначаються серед AC133⁺ клітин за даними різних авторів від 20 до 60 % випадків. В останні роки обговорюються перспективи клінічного застосування AC133⁺ клітин замість CD34⁺ клітин, адже саме їм притаманна здатність до довготривалої підтримки гемопоезу *in vitro*. Мета роботи – дослідження клоногенного потенціалу клітин фракції AC133⁺ кордової крові в системі *in vitro* та визначення впливу інкубації з фактором росту Flt-3 на їх функціональні властивості.

Аналіз результатів культивування клітин AC133⁺ популяції свідчив про наявність у них клоногенних властивостей. У напіврідкому агарі вдалося отримати колонії, які склалися з недиференційованих клітин. Сума їх на 14-ту добу культивування становила $31,4 \pm 8,18$, тоді як для кластерів цей показник дорівнював $17,76 \pm 3,82$. Застосування етапу інкубації з Flt-3 протягом 12 годин з подальшим культивуванням клітин призводило до формування колоній з ознаками гемопоетичних клітин. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУОк) в агаровому середовищі дорівнювала $66,69 \pm 19,07$, що у 2 рази перевищує цей показник у культурах без інкубації ($p < 0,01$). Продовження терміну інкубації до 16 годин дозволило значно підвищити клоногенну активність клітин фракції AC133⁺ до $212,5 \pm 24,95$, що приблизно в 3,2 рази перевищує даний показник при інкубації протягом 12 годин ($p < 0,001$) і приблизно в 6,8 рази вище за дані у контрольному варіанті ($p < 0,001$). Таке збільшення кількості колоній під впливом Flt-3 може свідчити про включення у проліферацію і диференціювання ранніх клітин-попередників, що знаходяться у стані спокою у початковому стані.

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що використання додаткового етапу преінкубації клітин AC133⁺ фракції з ростовим фактором Flt-3 доцільне для подальшого примноження ранніх клітин-попередників у культурі клітин *in vitro* та сприяє їх просуванню шляхом диференціювання у напрямку гемопоезу.

The AC133⁺ (CD133) are the marker for polypotent stem cells, characterising the most primitive populations of non-hemopoietic cells. From another side, these cells are considered as hemopoietic cell precursors, being determined among AC133⁺ cells from 20 to 60% cases, as reported by different authors. There have been recently discussed the perspectives of clinical application of AC133⁺ cells instead of CD34⁺, because of the capability for long-term hemopoiesis maintenance *in vitro*, being inherent namely to them. The research was aimed to investigate the clonogenic potential of AC133⁺ fraction of cord blood cells *in vitro* and to determine the effect of incubation with Flt-3 growth factor on their functional properties.

The analysis of culturing results of AC133⁺ population cells testified to the presence in them of clonogenic properties. In a semi-liquid agar we managed to obtain the colonies, comprising non-differentiated cells. Their total number to the 14th culturing day was 31.4 ± 8.18 , meanwhile for clusters this index was 17.76 ± 3.82 . The application of incubation stage with Flt-3 within 12 hours with following cell culturing resulted to the formation of colonies with hemopoietic cell signs. The number colony-forming units (CFU) in agar medium was 66.69 ± 19.07 , that exceeded this index in incubation-free cultures ($p < 0.01$). The prolongation of incubation term up to 16 hrs enabled to significantly increase a clonogenic activity of AC133⁺ fraction cells up to 212.5 ± 24.95 , that exceeded this index at incubation within 12 hrs approximately in 3.2 times ($p < 0.001$) and was nearly in 6.8 times higher than the data in the control variant ($p < 0.001$). This augmentation in colony number under Flt-3 effect may testify to the inclusion of early progenitor cells, being initially in a quiescent state, into proliferation and differentiation.

The obtained experimental data testify to the expediency of applying additional preincubation stage of AC133⁺ fraction cells with Flt-3 growth factor for further augmentation of early cell-precursors in tissue culture *in vitro*, and contribution to their progress via differentiation towards hemopoiesis.

Комбинаторные стратегии в терапии рака: потенцирующая криоабляция

Дж.Г. БАУСТ¹, А.А. ГЕЙДЖ², А. РОБИЛОТТО^{1,3}, Дж.М. БАУСТ^{1,3}

¹Институт биомедицинских технологий, г. Бингхемтон, США

²Государственный Университет Нью-Йорка, г. Буффало, США

³Отделение онкологических служб, ООО "Служба сохранения клеток", г. Овего, США

Combinatorial Strategies in Cancer Therapy: Potentiating Cryoablation

J.G. BAUST¹, A.A. GAGE², A. ROBILOTTO^{1,3}, J.M. BAUST^{1,3}

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

²Department of Surgery, State University of New York, Buffalo, NY

³Division of Oncologic Services, Cell Preservation Services, Inc., Owego, NY

Криохирургические процедуры, проводимые в клинике, основаны на общепризнанных научных принципах и используют устройства с набором зондов, усовершенствованные технологии визуализации, которые способствуют разрушению аденокарциномы простаты. За последние 40 лет криоаблятивные технологии для лечения заболеваний простаты успешно развиваются вместе с применением различных устройств и приборов: криоиглы, уретральный нагреватель, внутриоперационный ультразвук, кроме того, расширяются знания о механизмах воздействия низких температур на раковые клетки.

Современные криоаблятивные подходы в терапии рака простаты основаны на периферическом размещении криоиглы с дополнительными центральными зондами, а также визуализацией процесса замораживания при помощи внутриоперационного ультразвукового и температурного мониторинга. Такая стратегия зонального замораживания обеспечивает почти гомогенную температуру (-40°C) в сердцевине опухоли с фокусом на тонком (2–4 мм) крае зоны замораживания.

Важное открытие 1998 г. указало на предполагаемую роль управляемой генами клеточной смерти (апоптоза) в состоянии замерзающего кольца ткани. На данный момент установлены 3 типа клеточной смерти после повреждений, вызванных замораживанием: разрыв клеток в сердцевине опухоли из-за образования льда, некроз (первичный и вторичный) по всей опухоли и апоптоз (в основном по краям опухоли). Положение о передовой криохирургической практике Американской Урологической Ассоциации 2008 г. по лечению локализованного рака простаты указывает следующее: "клетки рака простаты, подверженные многочисленным молекулярно-направленным стрессорным факторам (цитотоксические агенты), более подвержены действию низких температур, которые в правильно подобранных комбинациях могут быть абсолютно летальными даже при -1°C .

Данный доклад будет сконцентрирован на недавних исследовательских разработках, касающихся использования комбинаторных криоаблятивных терапевтических подходов, эффективных даже при повышенных до -1°C температурах абляции, и на том, как данные подходы влияют на андроген-чувствительный и нечувствительный рак простаты.

Clinically-based cryosurgical procedures, grounded on well-recognized scientific principles along with the use of multiprobe devices and advanced imaging techniques, support physician-managed destruction of prostate adenocarcinoma. Prostate cryoablative techniques have beneficially evolved over the past forty years with the development of successive generations of devices including cryoneedles, the advent of a urethral warmer, intraoperative ultrasound and an expanded knowledge of the mechanisms by which cancer cells are challenged by low temperatures.

The most modern cryoablative approaches to prostate cancer therapy rely on the cryoneedle placement circumferentially with additional central probes with the freezing process imaged by intraoperative ultrasound and temperature monitoring. This strategy of *zonal freezing* assures a near homogeneous tumor core temperature (-40°C) leaving the procedural focus on the thin (2–4 mm) freeze zone rim.

A key discovery in 1998 identified the putative role of gene regulated cell death (apoptosis) in the management of the freeze rim. Accordingly, we now recognize three modes of cell death following a freezing insult: ice-dependent cell rupture in the tumor core, necrosis (primary and secondary) throughout the tumor and apoptosis primarily in the tumor margin. The AUA 2008 Best Practice Policy Statement on Cryosurgery for the Treatment of Localized prostate Cancer recognizes that "prostate cancer cells experiencing multiple molecular-targeted stressors (cytotoxic agents) succumb more readily to low temperature exposure and that with the adoption of appropriately paired combinations, even freezing at -1°C can be totally lethal.

This presentation will focus on recent research developments that support the use of combinatorial cryoablative therapeutic strategies that may raise the ablative temperature to near -1°C and these strategies affects on androgen-sensitive and -insensitive prostate cancers.

Реакція структурних компонентів малих слинних залоз твердого піднебіння на введення кріоконсервованої плаценти

О.В. ВІЛЬХОВА, В.І. ШЕПІТЬКО

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Response of Structural Components of Minor Salivary Glands of Hard Palate to Cryopreserved Placenta Application

O.V. VIL'KOVA, V.I. SHEPIT'KO

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

У даний час важливе місце в медицині займає розробка нових методів протизапальної та імуностимулюючої терапії органів порожнини рота. Світова фундаментальна та прикладна медицина зацікавилась потенційними можливостями клітинної та тканинної трансплантації в лікуванні захворювань, які традиційна фармакологія побороти не в змозі.

Дослідження залозистої частини слизової оболонки твердого піднебіння проводили на 30 статевозрілих щурах лінії "Вістар" з одноразовим введенням кріоконсервованої плаценти. Евтаназію тварин проводили на 2, 7, 10, 14, 21 та 30-у добу експерименту. Тканинний матеріал поміщали в ЕПОН-812. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім.

Встановлено, що підшкірне введення кріоконсервованої плаценти на ранніх строках експерименту викликає зміни з боку мікроциркуляторного русла у вигляді розширення артеріол та венул, просвіт яких був заповнений еритроцитами, виявлялось крайове стояння лейкоцитів. Спостерігались незначний набряк періацинарної сполучної тканини, збільшення кількості лімфоцитів, макрофагів і тучних клітин, більшість з яких були дегранульовані. У кінцевих відділах малих слинних залоз твердого піднебіння відмічались секреторні екзокриноцити як і з збереженою будовою, так і гіпертрофовані клітини, просвіти кінцевих відділів яких були відсутні. Вивідна протока була розширена і заповнена оптично щільним неоднорідним секретом. На пізніх строках експерименту морфологічна картина залозистої частини слизової оболонки твердого піднебіння відповідала контрольній групі. З боку мікроциркуляторного русла розлади не виявлялися. При дослідженні кінцевих відділів спостерігалось відновлення просвітів. Визначено повне відновлення структури екзокриноцитів. Вивідна протока була заповнена оптично світлим секретом.

Таким чином, підшкірне введення кріоконсервованої плаценти не викликало патологічних змін з боку стромальних та паренхіматозних компонентів малих слинних залоз твердого піднебіння. На 14-ту добу експерименту морфологічний стан залозистої частини слизової оболонки твердого піднебіння відповідав контролю. Відмічалось покращення кровопостачання.

Nowadays the designing of new methods of anti-inflammatory and immune stimulating therapy of oral cavity organs holds an important place in medicine. The world fundamental and applied medicine are interested in potential possibilities for cell and tissue transplantation in treating the diseases, where traditional pharmacology is powerless.

Glandular part of hard palate mucous membrane was studied in 30 mature Wistar rats with a single introduction of cryopreserved placenta. Animals were euthanased to the 2nd, 7th, 10th, 14th, 21st and 30th days of experiment. The tissue material was placed into EPON-812. The semi-thin sections were stained with toluidine blue.

A subcutaneous transplantation of cryopreserved placenta at early experimental terms was established as changing the microcirculatory channel in the form of extension of arterioles and venules, which lumen was filled with erythrocytes, a marginal standing of leukocyte was revealed. There were observed a slight oedema of periacinar connective tissue, increase in number of lymphocytes, macrophages and mast cells, most of them were degranulated. In the terminal parts of hard palate minor salivary gland we noted the secretory exocrinocytes both with preserved structure and hypertrophied cells, which terminal part lumens were absent. An excretory duct was extended and filled with optically compact heterogeneous secretion. At the later experimental terms the morphological picture of glandular part of hard palate mucous membrane was consistent to the control group. No disorders in micro-circulatory channel were found out. The lumen renewal was observed when studying the terminal parts. A complete recovery of exocrinocyte structure was determined. The excretory duct was filled with optically light secretion.

Thus, a subcutaneous introduction of cryopreserved placenta caused no pathological changes in stromal and parenchymatous components of minor salivary glands and hard palate. To the 14th experimental day the morphofunctional state of glandular part of hard palate mucous membrane corresponded to the control. The improvement in blood supply was noted.

Динаміка змін лімфоцитів та плазмоцитів в структурі селезінки при використанні кріоконсервованої плаценти

В.В. КАЦАЙ, В.І. ШЕПІТЬКО

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Dynamics of Changes in Lymphocytes and Plasmocytes in Spleen Structure When Using Cryopreserved Placenta

V.V. KATSAY, V.I. SHEPIT'KO

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Великий вміст різноманітних біологічно активних речовин в тканинах плаценти сприяє активації захисних сил організму і відновленню нормального функціонального стану органів лімфоїдної системи. Визначення динаміки змін клітинного складу селезінки допоможе оцінити механізм відповіді органів лімфоїдної системи на введення кріоконсервованої плаценти, оцінити швидкість відповіді на надходження антигенів, функціонального відновлення і повернення нормальної готовності органу до адекватного функціонування.

Мета експериментального дослідження – вивчення морфологічних змін в структурі селезінки при одноразовому підшкірному введенні кріоконсервованої плаценти.

Досліджували 30 статевозрілих шурів-самців лінії "Вістар". Тваринам було проведено одноразове підшкірне введення кріоконсервованої плаценти. Евтаназію експериментальної групи тварин виконували після 2, 5, 7, 10, 14 та 30-ї доби експерименту. Після евтаназії тварин тканинний матеріал поміщали в ЕПОН-812, виготовляли напівтонкі зрізи, які забарвлювали толуїдиновим синім.

На 2-у добу спостереження після введення кріоконсервованої плаценти була визначена активація міграції лімфоцитів через стінки гемомікросудин до паренхіми селезінки, що є морфологічним проявом переміщення імунокомпетентних клітин з лімфатичної до кровеносної систем і забезпечує нормальний перебіг відповіді імунної системи на антигенну стимуляцію. На 7-у добу зберігалась тенденція до зменшення кількості малих лімфоцитів до мінімальних значень. Кількість середніх лімфоцитів продовжувала збільшуватись, що відображало процес активації антигензалежної проліферації і диференціювання імуноцитів. Кількість макрофагів також збільшувалась і поступово наближалась до значень в контрольній групі. Кількість плазмоцитів вірогідно зменшилась порівняно з попереднім терміном спостереження. На 14-у добу виявлено збереження тенденції до відновлення нормальної кількості малих лімфоцитів. Для плазматичних клітин зберігалась тенденція до зниження кількості, вірогідної різниці з попереднім терміном спостереження нами не визначено. Кількість мітотичних фігур відповідала інтактним показникам. На 21-у добу спостереження нами визначено збільшення кількості малих лімфоцитів. Кількість макрофагів знизилась. Кількість плазматичних клітин і фагоцитів зменшилась до нормальних значень. Нормалізацією практично всіх досліджуваних показників характеризувалась 30 доба спостереження.

A high content of different biologically active substances in placenta tissues contributes to the activation of organism body defenses and renewal of normal functional state in lymphoid organs. The determination of dynamics of changes in spleen cell composition will help to estimate the response mechanism of lymphoid organs to cryopreserved placenta introduction, to evaluate the response rate to antigen incoming, functional renewal and return to a normal readiness of organ to an adequate functioning.

The research aim was to study the morphological changes in spleen structure at a single subcutaneous introduction of cryopreserved placenta.

We investigated 30 mature Wistar male rats. Animals received a single subcutaneous introduction of cryopreserved placenta. Animals were euthanased to the 2nd, 5th, 7th, 10th, 14th and 30th experimental days. The tissue material after euthanasia was placed into EPON-812. The semi-thin sections were prepared and stained with toluidine blue.

To the 2nd observation day after cryopreserved placenta introduction, we have determined the activation of lymphocyte migration through hemomicrovessel walls to the spleen parenchyma, being a morphological manifestation of immune competent cell moving from lymphatic system to the blood one and providing a normal proceeding of immune system response to antigen stimulation. To the 7th day the tendency of small lymphocyte amount decrease down to the minimum values was kept. The number of average lymphocytes continued the increasing, that manifested the activation process of antigen-dependent proliferation and immunocyte differentiation. The number of macrophages increased as well and gradually achieved the control group's values. The number of plasmocytes statistically and significantly decreased compared to the previous observation term. To the 14th day the kept tendency for the recovery of small lymphocyte normal amount was revealed. The tendency for the amount reduction was kept for plasmatic cells, we did not determine a statistically significant difference with previous observation term. The number of mitotic figures corresponded to the intact indices. To the 21st observation day we have determined the augmentation of small lymphocyte amount. The macrophage number decreased. The number of plasmatic cells and phagocytes decreased down to the normal values. The 30th observation day was characterised with the normalisation of quite all studied indices.

Криоконсервирование как фактор оптимизации терапевтического потенциала клеток фетальной печени при лечении аутоиммунной гемолитической анемии

М.А. СИРОУС, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Е.Д. ЛУЦЕНКО, К.А. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation as the Factor to Optimise Fetal Liver Cell Therapeutic Potential in Autoimmune Hemolytic Anemia Treatment

M.A. SIROUS, A.N. GOLTSEV, E.D. LUTSENKO, K.A. GOLTSEV

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

Целесообразность применения клеток фетальной печени (КФП) как компонента комплексных программ терапии различных патологических состояний организма обоснована идентификацией в них широкого спектра биологически активных субстанций от клеток стволового компартмента различного уровня дифференцировки до медиаторов химической природы. Криоконсервирование является обязательным компонентом общего технологического процесса их применения в клинической практике, которое, однако, не может считаться индифферентным для многих видов биообъектов. Степень влияния криоконсервирования определяется не только особенностями и спектром физико-химических факторов, но и исходным состоянием биообъекта.

Цель данной работы – сравнительная оценка терапевтического потенциала криоконсервированных КФП разных сроков гестации в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА).

АИГА индуцировали у мышей C57Bl/6J однократным внутрибрюшинным введением сингенных эритроцитов, прогретых до 49,5°C. Противозэритроцитарные аутоантитела идентифицировали с помощью прямой реакции Кумбса на 13-е сутки после введения эритроцитов. В этот же срок оценивали гематологические показатели, состояние органов лимфогемопоэтического комплекса, адгезивную способность клеток перитонеальной полости и субпопуляционный состав Т-клеток селезенки.

Криоконсервированные или нативные (контроль) КФП 14 и 19 суток гестации (КФП-14 и КФП-19) мышей CBA/CaLac вводили мышам-реципиентам C57Bl/6J в дозе 1×10^6 /мышь однократно внутривенно через несколько часов после индукции АИГА.

У всех мышей после введения сингенных термообработанных эритроцитов вырабатывались аутоантитела как основной признак развития АИГА. Установлены различия корректирующего эффекта КФП в зависимости от их исходного состояния. Среди нативных КФП преимущество имели КФП-14. Однако после криоконсервирования КФП-19 приобретали лечебный эффект, подобный нативным КФП-14.

Таким образом, в работе показана возможность применения КФП для лечения гемолитических анемий иммунного генеза в виде АИГА. Криоконсервирование практически не модифицировало эффект КФП ранних сроков гестации, но придавало более высокий терапевтический потенциал КФП-19, которые в нативном виде проявляли его минимально.

Expediency of fetal liver cells (FLCs) application as a component of combined therapeutic programs for different pathological states of an organism is stipulated by identification in them of a wide range of biologically active substances from cells of stem compartment of different differentiation level to the mediators of chemical origin. Cryopreservation is a mandatory component of general technological process of their application in clinical practice, which however can not be considered as indifferent for many bioobjects. The degree of cryopreservation influence is determined not only by the peculiarities and range of physical and chemical factors, but initial bioobject state as well. This research was aimed to comparatively estimate a therapeutic potential of cryopreserved FLCs of different gestation terms in experimental model of autoimmune hemolytic anemia (AIHA).

AIHA was induced in C57Bl/6J mice by a single intraperitoneal introduction of syngeneic erythrocytes, heated up to 49.5°C. Anti-erythrocyte antibodies were identified with a direct Coomb's test to the 13th day after erythrocyte introduction. Hematological indices, state of lymphohemopoietic complex organs, adhesive ability of peritoneal cavity cells and subpopulation composition of spleen T-cells were assessed within the same term.

Either cryopreserved or native (control) FLCs of 14 and 19 gestation days (FLCs-14 and FLCs-19) of CBA/CaLac mice were once intravenously introduced to C57Bl/6J mice-recipients in 1×10^6 /mouse dose some hours after AIHA induction.

The antibodies as the main sign of AIHA development were produced in all mice after syngenic heat-treated erythrocyte administration. The differences in FLCs correcting effect, depending on their initial state, have been established. FLCs-14 had advantage among the native FLCs. However after cryopreservation FLCs-19 get a therapeutic effect similar to native FLCs-14.

Thus, the possibility of FLCs application to treat hemolytic anemia of immune genesis in the AIHA form, has been demonstrated in the research. Cryopreservation did not practically modify the effect of FLCs of early gestation terms, but added higher therapeutic potential to FLCs-19, which manifested it minimally in a native state.

Морфофункціональна характеристика зорового нерва при введенні кріоконсервованої плаценти

О.С. ЯКУШКО, В.І. ШЕПІТЬКО

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Morphofunctional Characteristics of Optic Nerve at Cryopreserved Placenta Introduction

O.S. YAKUSHKO, V.I. SHEPIT'KO

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Трансплантація фетальних, ембріональних і плацентарних тканин є перспективним напрямком сучасної медицини. Особливий інтерес викликають препарати, виготовлені з тканин плаценти – багатокомпонентного біостимулятора, імуномодулятора та ендокринного органа, який належить до незамінного механізму життєзабезпечення плода необхідними елементами та поживними речовинами. Тканинні препарати завдяки програмованому кріоконсервуванню зберігають біологічні властивості тканин та містять велику кількість біологічно активних речовин. Значна увага приділяється застосуванню препаратів кріоконсервованої плаценти в офтальмологічній практиці.

Мета дослідження – вивчення впливу введення кріоконсервованої плаценти на стан зорового нерва.

На 20 статевозрілих щурах лінії „Вістар” було проведено одноразове підшкірне введення кріоконсервованої плаценти. Евтаназію тварин виконували на 2, 7, 10 та 14-у добу експерименту. Після евтаназії тварин тканинний матеріал поміщали в ЕПОН – 812. Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім та вивчали у світловому мікроскопі.

При дослідженні напівтонких зрізів тканин зорового нерва встановлено, що периневрій зорового нерва – це щільна волокниста тканинна, багата на фібробласти, жирові клітини та макрофаги, кількість яких на 2–7-у добу експерименту збільшилась на 10% у порівнянні з контрольною групою. Тучні клітини були частково дегранульовані.

Товщина ендоневрію на 2–7-у добу була збільшена незначно у порівнянні з контрольною групою тварин за рахунок виходу рідкої частини крові у сполучну тканину. Виявлялось збільшення кровонаповнення судин ендоневрію у вигляді незначного розширення артеріол та венул. У сполучній тканині спостерігалось збільшення кількості лімфоцитів, макрофагів, тучних клітин, частина з яких була дегранульована. На напівтонких зрізах нервові волокна мали округлу форму, вкриті мієліновою оболонкою, утвореною олігодендроцитами, патологічних змін не виявлено.

Встановлено, що 10–14 доба експерименту характеризувалась поступовим зменшенням набряку сполучної тканини ендоневрію зорового нерва. Спостерігалась тенденція до зменшення кількості лімфоцитів, тучних клітин, макрофагів. Кількість плазмочитів збільшилась на 20% у порівнянні з контрольною групою.

Таким чином, підшкірне введення кріоконсервованої плаценти призводило до збільшення кровонаповнення та перфузії судин мікроциркуляторного русла та не викликало патологічних змін з боку структурних компонентів зорового нерва.

Transplantation of fetal, embryonic and placental tissues is a perspective trend in current medicine. Of especial interest are the preparations, produced from placenta tissues: multicomponent biostimulator, immune modulator and endocrine organ, belonging to the essential mechanism of fetus life support with necessary elements and nutritive substances. Due to the programmed cryopreservation tissue preparations preserve biological properties of tissues and comprise a huge number of biologically active substances. A significant attention is paid to applying cryopreserved placenta preparations in ophthalmologic practice.

The research aim was to study the effect of cryopreserved placenta introduction on the ocular nerve state.

Single subcutaneous introduction of cryopreserved placenta was realised in 20 mature Wistar rats. Animals were euthanized to the 2nd, 7th, 10th and 14th days of experiment. After animal euthanasia the tissue material was placed into EPON-812. Semifine sections were stained with toluidine blue and studied with light microscope.

When studying the semifine sections of optical nerve tissue, the optical nerve perineurium was established as a tight fibrous tissue, rich with fibroblasts, fat cells and macrophages, which number to the 2nd–7th experimental days increased by 10% compared to the control group. Mast cells were partially degranulated.

The endoneurium thickness to the 2nd–7th days was slightly increased, compared to the control group of animals due to the liquid blood part release into connective tissue. The augmentation in blood filling of endoneurium vessels as a slight extension of arterioles and venules was revealed. Rise in a number of lymphocytes, macrophages and partially degranulated mast cells was noted in connective tissue. In semifine sections nerve fibres were of roundish shape, covered with myelin sheath, formed by oligodendrocytes, no pathological changes were found-out.

The 10th–14th experimental days were established as characterised by a gradual oedema reduction in connective tissue of ocular nerve endoneurium. The tendency to a decrease in a number of lymphocytes, mast cells, macrophages was observed. Plasmocyte number augmented by 20% compared to the control group.

Thus, a subcutaneous introduction of cryopreserved placenta resulted in an increase of blood filling and vessel perfusion of microcirculatory channel and caused no pathological changes from the structural components of ocular nerve.

Пептидний склад екстрактів шкіри в залежності від її фізіологічного стану

I.A. САЛІЄНКО, О.О. БОГАТИРЬОВА, С.Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б.П. САНДОМИРСЬКИЙ
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Peptide Composition of Skin Extracts Depending on Its Physiological State

I.A. SALIENKO, O.O. BOGATYREVA, S.E. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Регуляторні пептиди приймають активну участь в регуляції як фізіологічної, так і репаративної регенерації. В повній мірі це відноситься до шкіри. Метою роботи було вивчити вплив травм різного виду та введення екстрактів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) і екстрактів селезінки свиней (ЕСС) на пептидний склад водно-солевих екстрактів шкіри щурів.

Перед нанесенням травм шкіру епілювали в зоні стегна. Три паралельні різані рани завглибшки 2 мм, завдовжки 10 мм наносили з інтервалом 5 мм. Термічні і холодові травми наносили мідним аплікатором діаметром 10 мм з температурою 100 і -196°C . Експозиція 35 і 60 с відповідно. Опромінення ультрафіолетом проводили еритемною лампою з відстані 10 см на протязі 10 хв. ЕШНП та ЕСС з концентрацією пептидів 100 мкг/мл вводили по 1 мл в черевну порожнину 1 раз на добу. Екстракти нативної шкіри після нанесення травм і введення ЕШНП та ЕСС отримували інкубуванням фрагментів шкіри в фізіологічному розчині протягом 60 хв. Для визначення молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах використовували високо-ефективну гель-проникаючу хроматографію.

З хроматограм екстрактів нативної шкіри щурів після введення ЕШНП і ЕСС та після нанесення відповідних травм видно, що вони відрізняються молекулярно-масовим розподілом пептидів. Найбільша кількість піків спостерігається на хроматограмах екстрактів шкіри після холодової травми та ультрафіолетового опіку, а найменша – при опіковій травмі. Такий характер молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах може свідчити про різні механізми та ступінь пошкодження тканинних структур, а отже і про різні механізми специфічної відповіді на травму, які проявляються в продукції пептидів, необхідних в кожному випадку для регуляції процесів запалення та регенерації.

При дослідженні процесу загоєння холодових ран було встановлено, що при введенні ЕШНП або ЕСС статистично достовірно ($p < 0,05$) збільшується швидкість та покращується якість загоєння ран, а також в більш ранні строки відбувається нормалізація пептидного складу екстрактів в порівнянні з контролем. Така дія екстрактів може бути пов'язана з наявністю в них регуляторних пептидів.

Одержані дані свідчать, що пептидний склад тканинних екстрактів залежить від фізіологічного стану шкіри. Уведення екстракту шкіри та селезінки змінює пептидний склад екстракту шкіри щурів, прискорює процес загоєння холодових травм. При цьому в більш ранні строки нормалізується молекулярно-масовий спектр речовин пептидної природи в екстрактах травмованої шкіри.

Regulatory peptides take an active part in regulating both physiological and reparative regenerations. This fully applies to the skin. The research aim was to study the effect of different injuries and introduction of newborn piglet's skin extracts (NPSE) and that of pig spleen (PSE) on a peptide composition of rat's skin aqueous-saline extracts.

Skin was epilated in femur area before injuring. Three parallel incised wounds of 2 and 10 mm in depth and length, correspondingly, were made with 5 mm interval. Heat and cold injuries were made by 10 mm copper applicator with 100 and -196°C temperatures. Exposures were 35 and 60 sec, correspondingly. UV irradiation was performed with sunlamp at 10 cm distance for 10 min. The NPSE and PSE (by 1 ml) with 100 mg/ml peptide concentration were intraperitoneally introduced once per day. Native skin extracts after injuring and NPSE and PSE introduction were procured by 60 min incubation of skin fragments in physiological solution.

The high efficient gel-penetrating chromatography was used to determine the molecular and mass distribution of substances of peptide origin in the extracts.

The chromatograms of rat's native skin extracts after NPSE and PSE introduction and corresponding injuries show difference in molecular and mass peptide distribution. The highest number of peaks is observed in skin extract chromatograms after cold trauma and UV burn, and the lowest one at burn trauma. This character of molecular and mass distribution of substances of peptide origin in the extracts may testify to different mechanisms and damage extent of tissue structures, and various mechanisms of specific response on trauma as well, manifesting in production of peptides, necessary in each case to regulate inflammatory and regenerative processes.

When investigating healing process of cold wounds there was established that during NPSE and PSE introduction the rate and quality of wound healing statistically and significantly increased ($p < 0,05$), as well as the peptide composition of extracts normalized in earlier terms, compared to the control. This extract effect may be associated to the presence of regulatory peptides in them.

The data obtained testify to the fact, that the peptide composition of tissue extracts depends on physiological state of skin. Skin and spleen extract introduction changes a peptide composition of rat's skin extract, accelerates healing process of cold injury. At the same time in earlier terms there is the normalization of molecular and mass range of substances of peptide origin in the injured skin extracts.

Вивчення дії одноразового підшкірного введення кріоконсервованої плаценти на зміни в структурі сітківки ока

О.О. СТЕЦУК, В.І. ШЕПІТЬКО

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Studying Effect of Single Subcutaneous Introduction of Cryopreserved Placenta on Changes in Ocular Retina Structure

О.О. STETSUK, V.I. SHEPIT'KO

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine

Трансплантація кріоконсервованих клітин і тканин ембріофетоплацентарного комплексу – новий сучасний метод лікування різних патологічних станів людини. Кріотехнології дозволяють досить просто одержувати потрібні препарати і довгостроково зберігати їхню життєздатність.

Як відомо, плацента є могутнім джерелом системних білкових і стероїдних гормонів, цитомединів, імунних факторів і АТФ, які мають могутню фізіологічну дію. Самі ж клітини плаценти в процесі біологічного розпаду, після трансплантації, можуть давати внутрішньоклітинні білки, що стимулюють активність імунної системи організму реципієнта.

Мета експериментального дослідження – вивчення морфологічних змін в структурі сітківки при одноразовому підшкірному введенні кріоконсервованої плаценти на різних сроках експерименту.

Досліджували 40 статевозрілих щурів-самців лінії "Вістар". Тваринам було проведено одноразове підшкірне введення кріоконсервованої плаценти. Евтаназію експериментальної групи тварин виконували після 2, 5, 7, 10, 14 та 30-ї доби експерименту. Після евтаназії тварин тканинний матеріал поміщали в ЕПОН-812, забарлювали толуїдиновим синім. Напівтонкі зрізи вивчали в світловому мікроскопі "Carl Zeiss". Мікрофотографування здійснювали на цифровому мікроскопі фірми "Olympus" C 3040-ADU з адаптованими до відповідних досліджень програмами. Статистичну обробку морфометричних даних виконували за допомогою програми Excel.

При вивченні напівтонких зрізів на 2-у добу в мікроциркуляторному руслі сітківки спостерігалось збільшення притоку крові до органу у вигляді розширення просвіту кровоносних капілярів, посткапілярних венул і венул, які були заповнені форменими елементами крові. Виявлявся вихід незначної кількості лімфоцитів і макрофагів в перикапілярний простір. Кількість макрофагів і лімфоцитів збільшилась приблизно на 11% в порівнянні з показниками контрольної групи. Наявні явища незначного периваскулярного набряку на 7 добу зберігаються явища функціонального навантаження з боку мікроциркуляторного русла сітківки. З 14–21 доби кількість лімфоцитів і макрофагів зменшилась в порівнянні з попередніми спостереженнями, але значно збільшилась кількість плазмочитів в перикапілярному просторі сітківки. Повним відновленням всіх показників у порівнянні з інтактною групою тварин характеризувалась 30 доба.

Transplantation of cryopreserved cells and tissues of embryofetoplacental complex is a new actual therapeutic method for treating different human pathological states. Cryotechnologies enable quite a simple procurement of necessary preparations and a long-term storage of their viability.

Placenta is known as a powerful source of systemic protein and steroid hormones, cytomedines, immune factors and ATP with a high physiological effect. Under biological decay after transplantation the placenta cells themselves may release the intracellular proteins, stimulating an immune system activity of a recipient's organism.

The experimental research was aimed to study the morphological changes in retinal structure under a single subcutaneous introduction of cryopreserved placenta at different experimental terms.

We have studied 40 mature Wistar male rats. The animals received a single subcutaneous introduction of cryopreserved placenta. The animals of experimental group were euthanized after the 2nd, 5th, 7th, 10th, 14th and 30th day of experiment. After animal euthanasia, the tissue material was placed into EPON-812 and stained with toluidine-blue. Semithin sections were studied under "Carl Zeiss" light microscope. The microphotographing was realised with digital microscope "Olympus" C 3040-ADU with the softwares, adapted for the corresponding research. Morphometric data were statistically processed with Excel software.

When studying the semi-thin sections, an increase in blood flow to the organ as the extension of blood capillary lumen, post-capillary venules and those, filled with formed blood elements, was observed in a microcirculatory retinal channel to the 2nd day. A release of a small amount of lymphocytes and macrophages into a pericapillary space, was revealed. The amount of macrophages and lymphocytes augmented approximately by 11%, compared to the control group's indices. The phenomena of slight perivascular oedema were present. To the 7th day there are preserved the phenomena of functional charge from retinal microcirculatory channel. From the 14th–21st day the lymphocyte and macrophage number decreased compared to the previous observation, but there was a significant augmentation of plasmocyte number in retinal pericapillary space. The 30th day was characterized by a complete renewal of all indices compared to the intact animal group.

Некоторые аспекты эффективности роллерного культивирования

А.Г. ПОПАНДОПУЛО, А.В. ОБЕРЕМКО, В.М. ОКСИМЕЦ, А.А. ШТУТИН

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

Some Aspects of Roller Culturing Efficiency

A.G. POPANDOPULO, A.V. OBEREMKO, V.M. OKSIMETS, A.A. SHTUTIN

*V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine*

При исследовании влияния роллерного культивирования на формирование объёмных 3D-структур, обладающих природной архитектоникой костной ткани, была проведена серия экспериментов. Культуру стромальных стволовых клеток (ССК) получали из костного мозга путём механической дезагрегации, центрифугирования с последующим высеиванием в культуральные флаконы 75 см² (“Costar”, США). Первично выделенную культуру ССК вели на ростовой среде DMEM/F12 1:1 (“Sigma”, США) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (“Биолот”, Россия), глутамина (“Биолот”, Россия), L-аскорбиновой кислоты (“Sigma”, США) и основного фактора роста фибробластов (“Sigma”, США). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37°C, содержание углекислого газа 5% и влажность 95%). Среду меняли каждые 3-е суток. При достижении 70–80% монослоя клетки пассировали раствором 0,25%-го трипсин/версена (1:5).

В экспериментах использовали блоки ксено- или аллоколлагена и гидроксиапатита, содержащие костные сульфатированные гликозаминогликаны. Пористый биоматериал “Остеоматрикс” (“Конектбиофарм”, Россия), применяемый для заполнения объёма полости или костного дефекта, в стерильных условиях разрезали скальпелем на две равные части, заливали культуральной средой и помещали в термостат при температуре 37°C. Через 2 ч добавляли по 1 млн ССК, предварительно снятых с культуральных флаконов и меченных мембранным прижизненным красителем PKH67 Green Fluorescent Linker Kit (“Sigma”, США). Клетки культивировали в силиконовой посуде, во избежание адгезии к стеклянной поверхности, при 37°C и содержании углекислого газа 5%, одна половина – в роллерной установке, другая – в чашке Петри диаметром 100 мм.

Пролиферацию клеток оценивали визуально при помощи флуоресцентной микроскопии на микроскопе “Labogux” (“Leica”, Германия). На 15-е сутки культивирования проводили МТТ-анализ (МТТ-Cell Proliferation Assay), основанный на измерении оптической плотности раствора при отложении кристаллов формазана в митохондриях клеток. Преобразование жёлтой соли тетразолия, МТТ в нерастворимые в воде тёмно-синие кристаллы формазана возможно только в живых клетках в присутствии митохондриального фермента – сукцинат-дегидрогеназы. Оптическую плотность жидкости измеряли спектрофотометрически на микропланшетном фотометре для многофункционального анализа “Synergy HT” (“Bio-Tek”, США), определяя поглощение как функцию от концентрации преобразованного красителя, количество которого прямо пропорционально зависит от количества метаболически активных клеток в культуре.

Результаты исследований показали, что количество и жизнеспособность клеток без использования роллерного культивирования были в 5 раз больше.

The series of experiments were carried-out when studying the effect of roller culturing on formation of volumetric 3D-structures, having a natural architecture of bone tissue. The culture of stromal stem cells (SSCs) was derived from bone marrow via mechanical disaggregation and centrifugation with following inoculation in 75 cm² cultural flasks (Costar, USA). Primarily isolated SSCs culture was plated on DMEM/F12 1:1 growth medium (Sigma, USA) with adding 20% fetal calf serum (Biolog, Russia), glutamine (Biolog, Russia), L-ascorbic acid (Sigma, USA) and fibroblast growth main factor (Sigma, USA). Cells were cultured in CO₂-incubator (37°C, 5% CO₂ content and 95% humidity). Medium was changed each 3 days. When achieving 70–80% monolayer the cells were passed with 0.25% trypsin/versene solution (1:5).

The blocks of either xeno- or allocollagen and hydroxyapatite, containing bone sulphated glycosaminoglycans, have been used in the experiments. Porous biomaterial “Osteomatrix” (Konektbiofarm, Russia), applied for filling the cavity volume or bone defect under sterile conditions, was cut with scalpel in two equal parts, embedded with cultural medium and placed into thermostat at 37°C. Two hours later we added 1 ml SSCs, preliminarily removed from cultural flasks and labeled with membrane supravital dye PKH67 Green Fluorescent Linker Kit (Sigma, USA). Cells were cultured in silicone dish to avoid the adhesion to glass surface at 37°C and 5% CO₂ content, one part in a roller device, another in 100 mm Petri dish.

Cell proliferation was visually assessed by means of fluorescent microscopy with Laborux microscope (Leica, Germany). The MTT analysis (MTT-Cell Proliferation Assay), based on measuring optical density of solution at formazan crystal deposit in mitochondrial cells, was carried-out to the 15th culturing days. Transformation of tetrasolium yellow salt, MTT into water-insoluble dark blue formazan crystals is only possible in living cells at the presence of mitochondrial enzyme: succinate-dehydrogenase. Optical density of liquid was spectrophotometrically measured with microplotting photometer for multifunctional analysis Synergy HT (Bio-Tek, USA), by determining absorption as the function of concentration of transformed dye, which amount depended in a direct proportion on the amount of metabolically active cells in the culture.

Research results have demonstrated the cell amount and viability to be 5 time higher when roller culturing is not used.

Теоретический анализ лечебного действия биоэкстрактов при аутоиммунном тиреоидите

Е.А. Гордиенко, Д.П. Гладких

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Theoretic Analysis of Therapeutic Effect of Bioextracts at Autoimmune Thyroiditis

E.A. GORDIENKO, D.P. GLADKIKH

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

Аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) болеет 1–4% населения земного шара. В Украине после аварии на Чернобыльской АЭС частота АИТ особенно велика, поэтому изучение этиологии и патогенеза этого заболевания является особо приоритетным для отечественной науки.

На основе современных представлений о функционировании иммунной системы нами построена теоретическая модель АИТ в виде уравнений баланса иммунокомпетентных клеток (включая макрофаги), аутоантигенов, комплементарных им антител и фолликулов щитовидной железы (ЩЖ). Характерной особенностью этих уравнений баланса для Т-лимфоцитов-помощников и плазматических клеток является то, что они содержат запаздывающие временные аргументы. Анализ модели показывает, что имеется два устойчивых стационарных решения уравнений баланса, первое из которых соответствует отсутствию патологии, а второе – устойчивое не изменяющееся со временем состояние – можно рассматривать как хроническую форму заболевания. Во втором состоянии количество разрушающихся иммунной системой фолликулов уравновешивается их пролиферацией. Чтобы излечить АИТ, необходимо уменьшить интенсивность процессинга, экспрессии и презентации аутоантигенов макрофагами и ускорить пролиферацию фолликулов ЩЖ. Эти эффекты можно достичь введением в организм экстракта фетоплацентарного комплекса. Данная субстанция содержит ростовые и другие биологически активные факторы, ускоряющие пролиферацию регенерирующих тканей. Указанный экстракт по отношению к организму реципиента является набором антигенов. Поскольку эти антигены являются непатогенными и не размножаются, они со временем выводятся из организма, не причиняя ему вреда, но в период их пребывания в организме оказывают отвлекающее действие на иммунную систему. При подходящей дозе экстракта антигены, которые содержатся в нем, конкурируя с молекулами тиреоглобулина, блокируют рецепторы макрофагов. В итоге стационарное состояние системы сдвигается в сторону нормы и тем самым способствует излечению АИТ. Существование и подбор оптимальной дозы для каждого экстракта определяется тем, что слишком маленькая доза не обеспечивает достаточную для излечения от АИТ блокировку макрофагов, а слишком большая доза чрезмерно “напрягает” иммунную систему и тем самым повышает риск побочного инфекционного заражения в процессе лечения.

There is 1-4% of global population, suffering from autoimmune thyroiditis (AIT). In Ukraine the AIT frequency is especially high after Chernobyl accident, therefore the studying of AIT etiology and pathogenesis is of especial priority for national science.

Basing on the current notions about immune system functioning we have built the AIT theoretic model as the balance equations of immune competent cell (macrophage, inclusive), autoantigens, complemented to them antibodies and follicles of thyroid gland (TG). The feature of these balance equations for T-lymphocytes-helpers and plasmatic cells is the presented in them delayed time arguments. The model analysis demonstrates that there are two resistant stationary solutions of balance equations, first of which corresponds to the pathology absences and the second one, being resistant, unchanging with time state may be considered as chronic disease form. In the second state the number of follicles, being destroyed by immune system is balanced by their proliferation. In order to cure AIT it is necessary to reduce the intensity of processing, expression and presentation of autoantigens by macrophage and to accelerate the TG follicle proliferation. These effects may be achieved by introducing the fetoplacental complex extract into an organism. This substance contains growth and other biologically active factors, accelerating proliferation of regenerating tissue. The mentioned extract in respect to a recipient's organism is the antigen set. Since these antigens are non-pathogenic and do not propagate, they are harmlessly removed from an organism eventually, but cause a revulsive effect on immune system. At an appropriate extract dose, the contained in it antigens, by competing with thyroglobulin molecules, block the macrophage receptors. As a result the system stationary state is shifted towards the norm, thereby contributing to AIT cure. The existing and selection of the optimal dose for each extract are determined by the fact that a too low dose does not provide a sufficient macrophage blockage to cure AIT, but too high dose strongly “loads” the immune system, thereby increasing the risk of side infectious contamination during treatment.

Эффективность клеточной терапии в реабилитации больных с синдромом “motor-neglect” вследствие перенесенного мозгового супратенториального инсульта

Л.А. ШЕВЧЕНКО¹, В.И. ГРИШЕНКО², А.Ю. ПЕТРЕНКО², О.С. ПРОКОПЮК²

¹Запорожский государственный медицинский университет

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

Cell Therapy Efficiency in Rehabilitation of Patients with “Motor-Neglect” Syndrome Due to Endured Cerebral Supratentorial Insult

L.A. SHEVCHENKO¹, V.I. GRISCHENKO², A.YU. PETRENKO², O.S. PROKOPYUK²

¹Zaporozhye State Medical University, Ukraine

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

В связи с ростом заболеваемости мозговым инсультом и выраженностью постинсультной неврологической патологии лечение последствий этого заболевания является приоритетным и актуальным.

Тяжелые неврологические расстройства в виде речевого и двигательного дефицита, имеющие стойкий характер, у определенного числа лиц малокурабельны, что обусловлено множеством факторов, в том числе и формированием “neglect-syndroms” (синдромов пренебрежения). Указанные синдромы инициируют выраженные негативные эффекты в течение реабилитационного периода у постинсультных больных, что значительно затрудняет восстановление указанных неврологических расстройств.

Классические методы лечения больных с мозговым супратенториальным инсультом и наличием “neglect-syndroms” не приводят к ожидаемому терапевтическому эффекту либо сопровождаются его минимальной выраженностью.

В комплексном лечении больных с синдромом “motor-neglect” (синдромом пренебрежения движений) вследствие перенесенного мозгового супратенториального инсульта были использованы препараты клеточной терапии: криоцелл-гемоклетки и криоцелл-криocerebrum, сочетавшиеся с нейро-, ангиопротективными, холинэргическими средствами и антиоксидантами.

При проведении указанной терапии получен более высокий терапевтический эффект, который коррелировал со значительной нормализацией биоэлектрической активности мозга по данным электроэнцефалографического картирования.

Выявленная терапевтическая эффективность у лиц с малокурабельным течением инсульта вследствие “motor-neglect” позволяет предположить, что указанные биообъекты позитивно воздействуют на патофизиологические процессы, формирующие данные синдромы, вследствие наличия в них высокоактивных нейропептидов, ростовых факторов, адаптогенов, нейротрансмиттеров, представленных в биологически сбалансированном состоянии.

Данная проблема требует дальнейшего изучения с целью исследования патофизиологических аспектов формирования синдромов пренебрежения и патогенетически детерминированных методов их терапии.

Due to an increase in cerebral insult disease rate and manifested post-insult neurological pathology, the treatment of this disease’s consequences has been actual and of a high priority.

Severe neurological disorders as speech and motor deficiencies with persistent character in certain patients are of low curability, that is stipulated by many factors, including “neglect-syndromes” formation as well. The mentioned syndromes initiate the manifested negative effects within the rehabilitation period in post-insult patients, that significantly complicates recovering of mentioned neurological disorders.

The standard therapeutic methods for patients with cerebral supratentorial insult and the “neglect-syndromes” presence result in no expected therapeutic effect or are accompanied with its minimum manifestation.

In a combined treatment of patients with the “motor-neglect” syndrome due to the endured cerebral supratentorial insult there were used the preparations of cell therapy such as: cryocell-hemocells and cryocell-cryocerebrum, combined with the neuro- and angioprotective, cholinergic means and antioxidants.

During the mentioned therapy performance there was obtained a higher therapeutic effect, correlating to a significant normalisation of brain bioelectric activity according to the electroencephalographic mapping data.

The revealed therapeutic efficiency in persons with low curable insult course due to the “motor-neglect” syndrome enables suggesting the mentioned bioobjects as positively affecting the pathophysiological processes, forming these syndromes because of the presence in them of high-active neuropeptides, growth factors, adaptogens, neurotransmitters, represented in a biologically balanced state.

This problem requires further study for investigating the pathophysiological aspects of “neglect-syndromes” and pathogenically determined methods for their therapy.

Простой и экономичный метод криоконсервации экспериментальных клеточных объектов

Л.Т. ВОЛОВА, В.В. РОССИНСКАЯ, Т.В. ЯЦЕНКО, В.В. БОЛТОВСКАЯ
Самарский государственный медицинский университет

Simple and Cost-Effective Method for Experimental Cell Object Cryopreservation

L.T. VOLOVA, V.V. ROSSINSKAYA, T.V. YATSENKO, V.V. BOLTOVSKAYA
Samara State Medical University, Russia

Цель работы – отработка и внедрение простого и экономичного способа криоконсервации клеточных культур.

Исследования проводили на клеточных культурах дермальных фибробластов и фибробластоподобных клеток из стромы гиалинового хряща человека и животных. Материалом для получения клеток служили: крайняя плоть мальчиков 3–14 лет, полученная при операции циркумцизии; абортный материал; кожа новорожденных крысят; суставной гиалиновый хрящ взрослых кроликов. Криоконсервацию выполняли в жидком азоте в сосуде Дьюара (полезный объем 6 л) с 6 цилиндрами. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) марки “хч” в концентрации 5 % от общего объема замораживаемой суспензии. Сравнивали два варианта среды для замораживания клеток: с содержанием сыворотки эмбрионов коров 20% (1 серия) и 70% (2 серия). Клетки замораживали в экспоненциальной и стационарной фазе роста. Культуру клеток криоконсервировали в два этапа: криопробирки помещали в морозильную камеру (–70°C) на 24 ч, затем погружали в жидкий азот для длительного хранения. Исследования проводили в течение 2 лет, при этом первые 6 месяцев культуры размораживали раз в месяц, затем раз в 2 месяца. Всего проведено 254 эксперимента. Состояние культур до и после криоконсервации оценивали при помощи морфологических и морфометрических методов.

Изучение морфофункциональных характеристик клеток после размораживания показало, что при криоконсервации в жидком азоте и использовании в качестве протектора ДМСО лучшие результаты во всех исследованных культурах достигаются во 2-й серии экспериментов (содержание сыворотки в среде для замораживания 70%). В этом случае количество жизнеспособных клеток остается постоянным и составляет 86,7±4,9% в течение всего срока эксперимента. В 1-й серии с содержанием сыворотки 20 % этот показатель сохранялся высоким в течение первых 4 месяцев, после чего интенсивно снижался и к концу второго года составил 48,4±2,1 %. Клетки всех исследованных культур после размораживания сохраняли форму, размеры, ядерно-цитоплазмные отношения, скорость удвоения и плотность монослоя.

Таким образом, использованный нами метод не требует специальной дорогостоящей аппаратуры, эффективен для криоконсервации различных видов культур клеток.

Our research aim was to master and introduce a simple and cost-effective way for cell culture cryopreservation.

Research was carried-out in cell cultures of dermal fibroblasts and fibroblast-like cells from human and animal hyaline cartilage stroma. Cells were procured from the following materials: preputium of 3–15 years' old boys, obtained after circumcision operation; abortive material; newborn rat's skin; joint hyaline cartilage of mature rabbits. Cryopreservation was performed in liquid nitrogen in Dewar vessel (6 l net volume) with 6 cylinders. “Chemically pure” graded dimethyl sulfoxide (DMSO) in 5% concentration of total volume of frozen suspension was used as cryoprotectant. We compared two variants of medium for cell freezing: with 20 and 70% bovine embryo serum (1 and 2 series, correspondingly). Cells were cryopreserved in both exponential and stationary growth phases. Cell culture was cryopreserved in two steps: cryovials were placed in a freezing chamber (–70°C) for 24 hrs, then immersed into liquid nitrogen for a long-term storage. Research was realized within 2 years, herewith the cultures were thawed once per month within the first 6 months, then once per 2 months. There were carried-out 254 experiments in total. Culture state prior to and after cryopreservation was morphologically and morphometrically assessed.

Study of cell morphofunctional characteristics after thawing has demonstrated that under cryopreservation in liquid nitrogen and with DMSO as cryoprotectant the highest results in the whole studied cultures were obtained in the 2nd experimental series (70% serum content in freezing medium). In this case the amount of viable cells remains constant and makes 86.7±4.9% within all experimental term. In the 1st series (20% serum content) this index remained high within the first 4 months, then intensively reduced and was 48.4±2.1% to the second year termination. Cells in all studied cultures after thawing preserved the shape, size, nuclear and cytoplasm ratios, doubling rate and monolayer density.

Thus, the method we used does not require a special expensive equipment, being efficient for different cell culture cryopreservation.

О роли моноцитарно-фагоцитарной системы в реализации противовирусной активности препарата “Гемокорд”

Е.В. БРОВКО, Е.С. ОНАСЕНКО, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

About Monocyte-Phagocyte System Role in Realising Antiviral Activity of “Hemocord” Preparation

E.V. BROVKO, E.S. ONASENKO, A.N. GOLTSEV

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

Проблема профилактики инфекционных заболеваний приобретает особую остроту в связи с отсутствием действенной системы специфической профилактики известных инфекций, в том числе и гриппа. Высокая частота многих вирусных заболеваний обусловлена выработкой резистентности микроорганизмов к лекарственным веществам и нарушением защитных механизмов макроорганизма вследствие влияния множественных внешних и внутренних факторов риска. Известно, что в первой фазе иммунного ответа на внедрение вирусного агента происходит активация моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС). Основная функция МФС заключается в экспрессии иммунореактивности: представление антигена лимфоцитам и секреция интерлейкина-1 и интерлейкина-12, которые играют ключевую роль в активации Т-лимфоцитов. При определенных обстоятельствах моноциты могут также опосредовать иммунорегуляторные функции, в частности супрессорную клеточную активность. Таким образом, неоспорима роль МФС в обеспечении противовирусной защиты макроорганизма. Ранее было установлено выраженное противовирусное действие препарата “Гемокорд”. Одним из возможных путей реализации данного свойства может явиться активация клеток МФС. Поэтому целью работы было изучение поведения клеток МФС при инфицировании вирусом гриппа в различное время после применения препарата “Гемокорд” на модели вирусной гриппозной инфекции.

Были изучены количественное содержание клеток МФС перитонеальной полости мышей и их фагоцитарная активность. Показано ингибирующее действие вируса на содержание, структурно-функциональный статус различных клеток МФС и фагоцитарное число (ФЧ) в различные сроки после заражения вирусом гриппа, что, в конечном итоге, может быть одной из причин 100% гибели животных к 10 суткам после заражения.

При введении препарата “Гемокорд” в интактный организм наблюдалась 100% выживаемость животных, однако отмечалось варьирование показателей МФС в виде некоторой ингибиции фагоцитарной активности моноцитов и явной стимуляции функциональной активности макрофагов с повышением ФЧ данных клеток на 14 сутки и спустя 6 мес после введения препарата. Заражение животных вирусом гриппа спустя 6 мес после предварительного введения “Гемокорда” обеспечивало 90% выживаемость мышей к 10 суткам. При оценке состояния клеток МФС у этих животных выявлены стимуляция макрофагального звена МФС и достоверное увеличение ФЧ клеток данной системы.

Таким образом, обнаружено стимулирующее действие препарата “Гемокорд” на функциональную активность клеток МФС как интактных животных, так и животных, зараженных вирусом гриппа, спустя 6 мес после предварительного введения препарата.

The problem of infectious disease prevention gains a special importance due to the absence of any efficient system of specific prevention for the known infections, including gripe. High frequency of many viral diseases is stipulated by the production of microorganisms' resistance to medicinal substances and a disorder in macroorganism's protective mechanisms due to the effect of numerous external and internal risk factors. The activation of monocyte-phagocyte system (MPS) is known to occur in the first phase of immune response to viral agent introduction. The MPS main function consists in the immune reactivity expression: the antigen presentation to lymphocytes and secretion of interleukine-1 and interleukine-12, playing a key-role in T-lymphocyte activation. Monocytes may also mediate the immune regulatory functions, in particular, suppressive cell activity under the certain circumstances. Thus, the MPS role in providing macroorganism's antiviral activity is indisputable. Previously a manifested antiviral effect of “Hemocord” preparation has been established. The MPS cell activation may be one of the possible ways for this property realisation. Therefore the research was aimed to study the MPS cell behaviour within different terms after “Hemocord” application in the viral gripe model.

The quantitative content of MPS cells of murine peritoneal cavity and their phagocyte activity have been under study. There has been shown an inhibiting effect of the virus to the content, structural and functional statuses of different MPS cells and phagocyte number (PN) within different terms after gripe infection, that finally may be one of the reasons of 100% animal death to the 10th day after infection.

The 100% animal survival was observed when introducing “Hemocord” into an intact organism, however there was noted the varying in MPS indices as some inhibition of monocyte phagocyte activity and evident stimulation of macrophage functional activity with an increase in these cells' PN to the 14th day and 6 months after preparation introduction. Animal infection with gripe 6 months after “Hemocord” preliminary introduction provided 90% murine survival to the 10th day. The stimulation of MPS macrophage link and a statistically significant increase in cell PN of this system have been revealed under MPS cell state estimation in these animals.

Thus, we have found out a stimulating effect of “Hemocord” preparation to a functional activity of MPS cells of both intact animals and gripe-infected ones 6 months later a preliminary introduction of preparation.

Действие криоэкстрактов из тканей эмбрионов кур на иммунную систему мышей

В.Г. КУЗНЕЦОВА, Г.Ф. ЖЕГУНОВ

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Effect of Cryoextracts From Chicken Embryos on Murine Immune System

V.G. KUZNETSOVA, G.F. ZHEGUNOV

Kharkov Zooveterinary Academy, Ukraine

Проблема профилактики и борьбы с болезнями животных, ослабляющих иммунный статус организма, имеет большое значение. Поэтому в ветеринарной практике актуально получение и изучение новых иммуностимуляторов.

В отдельных научных работах отмечается, что иммуностимулирующим действием обладают препараты из эмбрионов птиц. Цель работы – получение разных экстрактов (в том числе и криоэкстрактов) из тканей эмбрионов кур и изучение их иммуностимулирующей активности.

Иммуностимулирующую активность экстрактов изучали на мышах с экспериментальной лейкопенией. Эффективность экстрактов оценивали путем подсчета количества лейкоцитов крови в камере Горяева и на мазках, приготовленных по Романовскому.

Установлено, что все исследуемые эмбриональные экстракты обладают иммуностимулирующей активностью. Внутримышечное введение исследуемых экстрактов после развития лейкопении вызывает быстрое и стойкое восстановление количества лейкоцитов. Причем криоэкстракты обладают более выраженным и пролонгированным действием.

Таким образом, биологически активные вещества эмбриональных экстрактов тканей кур оказывают положительное влияние на функционирование иммунной системы мышей, в частности эффективно восстанавливают лейкоциты при лечении экспериментальной лейкопении.

Task of preventing and fighting with the animal diseases, weakening the immune status of an organism, is of great value. Therefore in veterinary practice the obtaining and studying of new immune stimulators is actual.

In some scientific reports it is noted that immune stimulating effect is inherent to the preparations from birds' embryos. The research aim was to obtain different extracts (including cryoextracts) from the tissues of chicken embryos and studying of their immune stimulating activity.

Immune stimulating activity of extracts was studied in mice with experimental leucopenia. Efficiency of extracts was assessed by calculation of the number of blood leukocytes in Goryaev's chamber and on the smears prepared according to Romanovsky.

It has been established that all the studied embryonic extracts possess immune stimulating activity. Intramuscular introduction of the studied extracts after development of leucopenia causes rapid and stable recovery of the number of leukocytes. Herewith the cryoextracts have more manifested and prolonged effect.

Thus, biologically active substances of embryonic extracts positively affect the functioning of immune system of mice, in particular, effectively recover leukocytes when treating experimental leucopenia.