

Лиофилизация дрожжевых грибов рода *Saccharomyces*

А.В. КАНТЕРОВА

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Freeze-Drying of *Saccharomyces* Yeast Fungi

A.V. KANTEROVA

Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Для хранения дрожжевых грибов в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов используются методы лиофилизации, криоконсервирования и субкультивирования на агаризованных средах под слоем вазелинового масла.

Известно, что микроорганизмы наиболее устойчивы к замораживанию и высушиванию в стационарной фазе роста, однако, по литературным данным, крупноклеточные дрожжи рода *Saccharomyces* плохо переносят лиофилизацию, поэтому сублимационное высушивание дрожжевых культур *Saccharomyces cerevisiae* БИМ Y-56, БИМ Y-177, БИМ Y-178 и БИМ Y-182 проводили как в стационарной фазе роста, так и на стадии спорообразования. Клетки в стационарной фазе роста получали после 3-х суток культивирования на сусло-агаре. Для получения спорующей культуры первоначально штаммы сахаромисетов выращивали в течение 2-х суток при температуре 25–26°C на среде следующего состава, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 3,0; агар – 20,0 и сусло (15% сухих веществ) – 1 л. Выросшие 2-х суточные культуры дрожжей пересевали на косяки со средой, используемой для индукции аскоспорообразования (среда Городковой), г/л: глюкоза – 1,0; пептон – 10,0; NaCl – 5,0; агар – 20,0; вода – 1 л. Затем сахаромисеты выращивали при температуре 25°C в течение 38 суток до активного образования аскоспор. Наблюдалось образование спор у 60–80% клеток. Лиофилизацию культур производили на сублимационной установке “MODULYO-4K” английской фирмы Edwards. Первичная сушка проходила при температуре –55°C и глубине вакуума 6×10^{-2} mbar в течение 4-х часов; досушивание на гребенке аппарата вторичной сушки при комнатной температуре под вакуумом 8×10^{-2} mbar – 18 часов. В качестве протектора использовали сахарозо-желатиновую среду (10%-й раствор сахарозы с 1,5% желатин и 0,1% агар-агара). Количество живых клеток дрожжей определяли методом предельных разведений в 1 мл суспензии перед и после лиофилизации, а также через 1 и 2 года, 5 и 8 лет хранения культур.

Установлено, что количество жизнеспособных клеток у всех штаммов сахаромисетов, лиофилизированных на стадии спорообразования, было значительно выше по сравнению с культурами, находившимися в стационарной фазе роста, независимо от сроков хранения как через сутки после сублимационного высушивания, так и после 8 лет хранения.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности лиофилизации дрожжей рода *Saccharomyces* в стадии спорообразования. Консервирование их в таком состоянии обеспечивает высокую степень выживаемости и не изменяет физиологические и биохимические свойства культур.

The methods of freeze-drying, cryopreservation and subculturing on agarised media under paraffin oil layer are used to store the yeast fungi in Collection of non-pathogenic microorganisms of Belarus.

Microorganisms are known to be the most resistant to freezing and drying in a stationary growth phase, but as reported, the magnocellular *Saccharomyces* yeast endure poorly the freeze-drying, therefore a freeze-drying of *Saccharomyces cerevisiae* BIM Y-56, BIM Y-177, BIM Y-178 and BIM Y-182 yeast cultures was carried-out both in a stationary growth and spore formation phases. Cells under stationary growth phase were derived after 3 days of culturing on wort agar. To obtain a sporulating culture the *Saccharomyces* strains were initially cultured within 2 days at 25–26°C with medium of following composition, g/l: 10.0 glucose; 5.0 peptone; 3.0 yeast extract; 20.0 agar and 1 l wort (15% dry substances). The grown 2 days' yeast cultures were re-cultured to slopes with the medium, used for ascospore formation induction (Gorodkova's medium), g/l: 1.0 glucose; 10.0 peptone; 5.0 NaCl; 20.0 agar; 1 l water. Afterwards the *Saccharomyces* were cultured at 25°C for 38 days up to an active formation of ascospores. Spore formation was observed in 60–80% cells. Cultures were frozen-dried with “MODULYO-4K” sublimation device (Edwards, Great Britain). Primary drying was realised at –55°C and 6×10^{-2} mbar vacuum depth for 4 hrs; final drying was done with second-dary drying device rack at room temperature under 8×10^{-2} mbar vacuum for 18 hrs. Sucrose-gelatine medium (10% sucrose solution with 1.5% gelatine and 0.1% agar-agar) was used as a protectant. Number of viable yeast cells was determined using the method of limiting dilutions in 1 ml suspension prior to and after freeze-drying, as well as 1 and 2, 5 and 8 years after culture storage.

The number of viable cells in whole *Saccharomyces* strains, frozen-dried at the spore formation stage, was established as significantly higher than in the cultures, being under stationary growth phase, independently on storage terms both following 1 day of freeze-drying and after 8 years' storage.

The data obtained testified to the expediency of *Saccharomyces* yeast freeze-drying at the spore formation stage. Their preservation under this state provides a high survival degree and does not change physiological and biochemical properties of cultures.

Жизнеспособность криоконсервированных бифидобактерий в зависимости от суспензионной среды

А.В. СИДОРЕНКО¹, Г.И. НОВИК¹, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

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

Viability of Cryopreserved Bifidus Bacteria in Dependence on Suspension Media

A.V. SIDORENKO¹, G.I. NOVIK¹, I.P. VYSEKANTSEV²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

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

В связи с широким использованием бактерий рода *Bifidobacterium* в пищевой промышленности, медицине и ветеринарии, а также научных исследованиях разработка эффективного метода хранения производственных и коллекционных культур бифидобактерий имеет большое практическое значение.

В настоящее время одним из наиболее перспективных и надежных способов длительного хранения микроорганизмов является криоконсервация. При разработке технологических параметров криоконсервации важен подбор суспензионных сред, обеспечивающих сохранность максимального количества жизнеспособных клеток после замораживания.

Цель работы – изучение выживаемости бифидобактерий после криоконсервации в зависимости от суспензионной среды.

Криоконсервации подвергали 18–20-часовые культуры бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 791, *B. longum* B379M и *B. adolescentis* 94 БИМ, выращенные при 37°C в среде MRS-C. В качестве суспензионных сред испытывали физиологический раствор (ФР), 1%-ю пептонную воду (ПВ) и стерильную среду MRS-C. Замораживали образцы по быстрому (погружение в жидкий азот) и медленному (1°C/мин) режимам охлаждения. Исследование выживаемости бифидобактерий после криоконсервации с быстрым охлаждением показало статистически значимое снижение жизнеспособности клеток, суспендированных в ФР и ПВ, в то время как жизнеспособность клеток, замороженных в среде MRS-C, существенно не изменялась. После замораживания с медленной скоростью охлаждения наблюдались достоверное снижение количества жизнеспособных клеток, криоконсервированных в ФР, и 90–100%-я выживаемость клеток, суспендированных в ПВ и среде MRS-C. Развитие периодических культур бифидобактерий, замороженных в ФР и ПВ, характеризовалось удлинением лаг-фазы и снижением скорости роста на начальных этапах развития популяции. Показатели накопления биомассы и активности кислотообразования через 24 ч культивирования, полученные для криоконсервированных клеток, достоверно не отличались от величин интактных клеток, независимо от суспензионной среды и скорости охлаждения. При изучении активности развития бифидобактерий в молоке и питательной среде с pH 5,0 установлено, что развитие культур, замороженных в ФР и ПВ, характеризовалось существенным снижением скорости роста, в то время как замедления роста бифидобактерий, криоконсервированных в MRS-C, не отмечалось.

Таким образом, наиболее выраженным защитным действием при криоконсервации бифидобактерий обладала среда MRS-C. Пептонная вода проявляла хорошие протекторные свойства при замораживании с медленным охлаждением и была менее эффективной защитной средой при быстром охлаждении образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № Б07К-024.

Due to wide use of bacteria *Bifidobacterium* species in food industry, medicine and veterinary and scientific researches, the development of effective storage method of productional and collection cultures of bifidus bacteria has a practical importance.

Now one of the most perspective and safe methods of long-term storage of microorganisms is cryopreservation. When developing the technological parameters of cryopreservation the selection of suspension media is important, providing survival of maximal number of viable cells after freezing.

The research aim was to study the survival of bifidus bacteria after cryopreservation depending on suspension medium.

The *Bifidobacterium bifidum* 791, *B. longum* B379M and *B. adolescentis* 94 BIM bifidus bacteria of 18–20 hrs' cultures, grown at 37°C in MRS-C medium were cryopreserved. As suspension media the physiologic solution (PS), 1% peptone water (PW) and MRS-C sterile medium were investigated. The samples were frozen by rapid (plunging into liquid nitrogen) and slow (1°C/min) cooling regimens. Investigation of bifidus bacteria survival after cryopreservation with rapid cooling has shown the significant decrease viability of cells suspended in PS and PW, while viability of cells, frozen in MRS-C medium, did not change significantly. After freezing with slow cooling rate the significant decrease of cell viability amount, cryopreserved in PS and 90–100% survival of cells suspended in PW and MRS-C medium has been observed. Development of periodical cultures of bifidus bacteria, frozen in PS and PW, was characterized by extension of lag phase and decrease of growth rate at initial stages of population development. The indices of biomass accumulation and acid formation activity in 24 culturing hrs, obtained for cryopreserved cells did not significantly change from the values of intact cells and did not depend on suspension medium and cooling rate. When studying the activity of bifidus bacteria developing in milk and nutrient media with pH 5.0 it has been established that the development of cultures, frozen in PS and PW was characterized by significant decrease of growth rate, while growth decrease of bifidus bacteria, cryopreserved in MRS-C was not noted.

Thus, the most expressed protection at cryopreservation of bifidus bacteria had the MRS-C medium. Peptone water manifested protective properties during freezing with slow cooling and was less effective protective medium at rapid cooling of the samples.

The work has been carried out with financial support of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant №B07024.

Криоконсервация пробиотических микроорганизмов

Г.И. НОВИК, А.В. СИДОРЕНКО

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Cryopreservation of Probiotic Microorganisms

NOVIK G.I., SIDORENKO A.V.

Institute of Microbiology of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus

В настоящее время криоконсервирование широко используют для хранения микроорганизмов – объектов биотехнологий, т.к. данный метод обеспечивает сохранение генетической стабильности и основных физиолого-биохимических свойств культур.

Молочно-кислые и бифидобактерии являются биотехнологически важными организмами, применяемыми при производстве пробиотических препаратов и продуктов функционального питания.

Цель работы – разработка научно обоснованной методологии криоконсервации пробиотических штаммов бактерий на основе изучения зависимости выживаемости и морфофункциональных свойств культур от условий замораживания-отогрева.

Обоснована целесообразность применения криоконсервации в жидком азоте для длительного сохранения жизнеспособности и биологических свойств молочно-кислых и бифидобактерий. Показано, что хранение при температуре жидкого азота обеспечивает высокую выживаемость (80–99%), сохранение основных морфофункциональных свойств и стабильного потенциала роста бактерий. Установлено, что оптимальным режимом замораживания для жидких культур является медленное охлаждение (4°C/мин), для концентрированных суспензий – быстрое охлаждение (400°C/мин). Показана возможность криоконсервации пробиотических бактерий при сверхбыстром охлаждении без применения криопротекторов в средах, традиционно используемых для культивирования данных микроорганизмов.

Результаты исследований могут быть использованы для хранения коллекционных и производственных культур.

Now cryopreservation is widely used for microorganisms' storage the biotechnology objects, because this method provides the preservation of genetic stability and general physiological and biochemical properties of cultures.

The lactic-acid and bifidus bacteria are biotechnologically important organisms used during production of probiotic preparations and functional foods.

The research aim was to develop the scientifically based methodology of cryopreservation of probiotic bacteria strains on the basis of study of survival and morphofunctional cultures' properties dependence on freeze-thawing conditions. The applicability of cryopreservation in liquid nitrogen for the long-term viability preservation and biological properties of lactic-acid and bifidus bacteria has been established. It has been shown that the storage at liquid nitrogen temperature provides a high survival (80–90%), the preservation of basic morphofunctional properties and standing potential of bacteria growth. It has been established, that optimal freezing regimen for liquid cultures is slow cooling (4°C/min), for concentrated suspensions the rapid cooling (400°C/min). The capacity of probiotic bacteria cryopreservation under ultra-rapid cooling without application of cryoprotectants in the media traditionally used for the culturing of these microorganisms has been shown.

The research results can be used for the storage of collection and production cultures of lactic-acid and bifidus bacteria.

Криосохранение гермоплазмы малины в Казахстане

И.Ю. КОВАЛЬЧУК, Т.Т. ТУРДИЕВ

Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

Cryopreservation of Raspberry Hermoplasma at Kazakhstan

I.YU. KOVALCHUK, T.T. TURDIEV

Institute of Biology and Biotechnology of Plants, Almaty, Kazakhstan

Малина является одной из самых витаминосодержащих ягодных культур. В Казахстане гермоплазма малины сохраняется, главным образом, в полевых условиях. Однако при содержании полевых генных банков возникают серьезные проблемы: природные бедствия, вредители и болезни, а также высокая стоимость поддержания коллекций в поле. Криосохранение в жидком азоте – возможность сохранять гермоплазму в течение длительного времени на минимальном пространстве с минимальными затратами. В настоящее время для криосохранения апексов *in vitro* малины наиболее подходящими являются методы витрификации и инкапсуляции-дегидратации. Для этих методов оптимизировали протоколы криоконсервирования. Изучали влияние продолжительности холодовой акклиматизации, действие криопротекторов и состава восстановительных питательных сред на жизнеспособность меристем после криосохранения.

Установлено, что оптимальной является 3-недельная акклиматизация переменной температурой при -1°C 16 ч, затем при 22°C – 8 ч. Для метода витрификации эффективна выдержка меристем 1–2 суток на среде для прекультивирования с 0,3 М сахарозой, содержанием агара 3,5 г/л и джелрайта 1,75 г/л. Обработка меристем криопротектором PVS2 в жидкой среде MC с 0,4 М сахарозой осуществляется в течение 20 мин в холодильнике, размораживание – в контейнере с водой при 25°C 1 мин с последующей посадкой на восстановительную среду.

Для метода инкапсуляции-дегидратации эффективно поместить меристемы в альгинатные шарики (инкапсуляция меристем 3%-м альгинатом в жидкой среде MC со 100 мМ хлоридом кальция). Постоянное перемешивание меристем в альгинатных шариках в среде MC с 0,75 М сахарозой производится автоматическим шейкером в течение 18 ч. Подсушивание альгинатных шариков с меристемой длится 4 ч, гидратация в 1,2 М сахарозе – 5 мин. Размораживание осуществляется в контейнере с водой при 25°C в течение 1 мин с последующей посадкой на восстановительную среду.

Проведено сравнение эффективности методов витрификации и инкапсуляции-дегидратации для криоконсервирования апикальных меристем малины. Для одних сортов эффективен метод витрификации, который обеспечивает высокий уровень жизнеспособности меристем малины, так регенерация побегов из меристем после замораживания и оттаивания сорта Анар и гибрида 12/4 составляла 75 и 86,7% соответственно. Для других сортов эффективнее метод инкапсуляции-дегидратации. В зависимости от сорта сохраняют жизнеспособность и регенерируют побеги после замораживания в жидком азоте от 32,4 до 100% меристем.

Raspberry is one of the most vitamin-containing small-fruit crops. Hermoplasma of raspberry is mainly preserved in field conditions in Kazakhstan. However, under maintaining the field genetic banks the serious problems result from nature distresses, pests and diseases, as well as from high cost of keeping up the collections in field. The cryopreservation in liquid nitrogen is the capacity to preserve hermoplasma during long time on minimal area with minimal costs. Now the most suitable are the vitrification and encapsulation-dehydration methods for *in vitro* cryopreservation of raspberry apexes. The cryopreservation protocols of these methods were optimized. The effect of cold acclimatization term, activity of cryoprotectants and composition of reducing nutrient media on viability of meristems after cryopreservation were studied.

It has been established that the optimal is 3 weeks' acclimatization with variable temperature at -1°C for 16 hrs, then at 22°C for 8 hrs. For the vitrification method the maintaining of meristems for 1–2 days on medium for preculturing with 0.3 M sucrose, 3.5 g/l agar content and 1.75g/l gelrite is effective. The meristems with PVS2 cryoprotectant in MC liquid medium with 0.4 M sucrose for 20 min in freezing chamber were treated and thawing was done in container with water at 25°C for 1 min with following placing in recover medium. For the encapsulation-dehydration it is effectively to place the meristems in alginate beads (encapsulation of meristems with 3% alginate in MC liquid medium with 100mM calcium chloride). The regular mixing of meristems in alginate beads in MC medium with 0.75 M sucrose by automated shaker for 18 hrs. Drying of alginate beads with meristem for 4 hrs. Hydration in 1.2 M sucrose for 5 min. Thawing in container with water at 25°C for 1 min with following placing into recovery medium.

The comparison of efficiency of vitrification and encapsulation-dehydration methods for cryopreservation of apical meristems of raspberry has been carried out. For some varieties the vitrification method is effective, providing high level of viability of raspberry meristems, herewith regeneration of scions from meristems after freezing and thawing of Anar variety and 12/4 hybrid consists 75 and 86.7%, accordingly. For other varieties the encapsulation-dehydration method is more effective. Depending on the variety of the scions preserve viability and regenerate after freezing in liquid nitrogen from 32.4 up to 100% of meristems.

Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул этиленгликоля и 1,2-бутандиола

Н.А. ЧЕРНОБАЙ, И.Ф. КОВАЛЕНКО, С.В. КОШИЙ, Т.Ф. ПЕТРЕНКО,
И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Л.Ф. РОЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Permeability of SPEV Cell Membranes for Molecules of Ethylene Glycol and 1,2-Butanediol

N.A. CHERNOBAY, I.F. KOVALENKO, S.V. KOSCHIY, T.F. PETRENKO,
I.P. VYSEKANTSEV, L.F. ROZANOV

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

С использованием метода волюмометрии и модифицированной физико-математической модели Кедем-Качальского определены коэффициенты проницаемости плазматических мембран клеток СПЭВ для молекул воды и криопротекторов ряда диолов: этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-бутандиола (1,2-БД) при температурах 35, 18 и 7°C. В диапазоне температур 35–7°C значения коэффициентов проницаемости для ЭГ изменяются от $(4,15 \pm 1,31) \times 10^{-7}$ до $(0,72 \pm 0,23) \times 10^{-7}$ м/с, а для 1,2-БД – от $(6,64 \pm 1,1) \times 10^{-7}$ до $(0,77 \pm 0,17) \times 10^{-7}$ м/с. Значения энергий активации процесса переноса молекул ЭГ и 1,2-БД через мембраны клеток СПЭВ составляют соответственно 45,07 и 55,35 кДж/моль. Способность диолов проникать в клетки СПЭВ не коррелирует с размером их молекул, но увеличивается с увеличением коэффициента распределения в системе “масло-вода”. В присутствии блокатора ртутного сульфгидрильного реагента водных каналов рСМВс проницаемость мембран клеток СПЭВ для ЭГ уменьшается, а для 1,2-БД не изменяется, что согласуется с гипотезой о проникновении ЭГ в отличие от 1,2-БД не только через липидную фазу, но и через водные каналы. По-видимому, это определяет менее выраженную зависимость коэффициента проницаемости ЭГ от температуры. Коэффициенты проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул воды уменьшаются как при понижении температуры, так и при использовании блокатора водных каналов.

With volumetry method and modified physical-mathematical Kedem-Kachalskiy's model the coefficients of SPEV cell plasma membranes permeability for water molecules and cryoprotectants of diols series: ethylene glycol (EG) and 1,2-butanediol (1,2-BD) at 35, 18 and 7°C have been determined. Over the 35–7°C temperature range the permeability coefficient values for EG change from $(4.15 \pm 1.31) \times 10^{-7}$ down to $(0.72 \pm 0.23) \times 10^{-7}$ m/s, and for 1,2-BD from $(6.64 \pm 1.1) \times 10^{-7}$ down to $(0.77 \pm 0.17) \times 10^{-7}$ m/s. The values of energy activation for transfer process on EG and 1,2-BD molecules through the SPEV cell membranes made 45.07 and 55.35 kJ/mol, correspondingly. Diol ability to penetrate into the SPEV cells does not correlate with their molecule size, but increases with a rise of distribution coefficient in “oil-water” system. In presence of hydrargyric sulphydric reagent of water canal blocker (pCMBs) the permeability of SPEV cell membranes for EG decreases, but for 1,2-BD does not change, that agrees with hypothesis of EG penetrating VS to 1,2-BD not only through lipid phase, but water channels too. This likely determines the less expressed dependence of EG permeability coefficient on temperature. The coefficients of SPEV cell membrane permeability for water molecules decrease not only at temperature reducing, but also when water channel blocker is applied.

Транспорт криопротекторов ряда диолов через мембраны эритроцитов животных

Г.В. КОВАЛЕНКО, И.Ф. КОВАЛЕНКО, Т.П. ЛИННИК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Transport of Diol Series Cryoprotectants Through Animal Erythrocyte Membranes

G.V. KOVALENKO, I.F. KOVALENKO, T.P. LINNIK

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

Для научно обоснованного подхода к разработке методов криоконсервирования биологических объектов необходимо знать ряд биофизических параметров клеток: объем, площадь поверхности, количество осмотически активной воды, проницаемость мембран клеток для криопротекторов. В работе изучена проницаемость мембран нативных и проинкубированных с ртутным сульфгидрильным реагентом (pCMBs) эритроцитов крысы и кролика для ряда диолов (7 соединений) в зависимости от их структурной изомерии. Выбор криопротекторов обусловлен широким применением диолов в практике криобиологии для криоконсервирования биологических объектов разного уровня организации.

Методом малоуглового рассеивания света с длиной волны 1000 нм определены коэффициенты проницаемости мембран нативных эритроцитов крысы и кролика для диолов при температурах 25 и 37°C, а также эритроцитов, модифицированных инкубацией с ртутным сульфгидрильным реагентом (pCMBs) – блокаторм белковых водных каналов (белок полосы 3) при 25°C. Рассчитаны энергии активации переноса молекул диолов через мембраны нативных эритроцитов крысы и кролика в диапазоне температур 25–37°C и через мембраны проинкубированных эритроцитов с pCMBs при 25°C.

Установлено, что проницаемость изученных веществ через мембрану эритроцитов крысы выше, чем кролика, что обусловлено более высокой текучестью мембран эритроцитов крысы.

Полученные данные свидетельствуют, что механизм проницаемости диолов через мембраны эритроцитов крысы и кролика имеет сложный характер. Пассивная диффузия криопротекторов в эритроциты крысы и кролика осуществляется двумя альтернативными путями – через гидрофильные водные каналы (данные ингибирования проницаемости с блокаторм pCMBs) и непосредственно через липидный бислой (значимая зависимость коэффициентов проницаемости веществ от их “гидрофобности” и высокие значения энергии активации после инкубирования эритроцитов с pCMBs). 1,2-бутандиол – наиболее гидрофобное соединение в ряду диолов проникает в эритроциты преимущественно через липидный бислой и только незначительное количество (не более 16–18%) способно к диффузии через гидрофильные белковые поры. Не выявлена достоверная корреляция проницаемости мембран эритроцитов крысы и кролика для изученных диолов от геометрических параметров их молекул.

For scientifically substantiated approach in designing the methods for biological object cryopreservation it is necessary to know some biophysical cell parameters: volume, surface area, amount of osmotically active water, cell membrane permeability for cryoprotectants. Membrane permeability of rat's and rabbit's active erythrocytes and those, incubated with mercuric sulfhydryl reagent (pCMBs), for diol series (7 compounds) depending on their structural isomerism, has been studied in the research. Cryoprotectant choice is stipulated by a wide diol application in cryobiological practice for cryopreservation of biological objects with different organisation level.

The membrane permeability coefficients of rat and rabbit's native erythrocytes for diols at 25 and 37°C, as well as the erythrocytes, modified with incubation of mercuric sulfhydryl reagent (pCMBs): blocker of protein aqueous channels (band 3 protein) at 25°C, have been determined using the method of small-angle light scattering with 1,000 nm wavelength. Activation energies of diol molecule transfer through the rat and rabbit's native erythrocyte membranes within 25–37°C range and through those of erythrocytes, incubated with pCMBs at 25°C, have been calculated.

Permeability of studied substances through rat's erythrocyte membrane is higher than in rabbit's ones, that is stipulated by a higher fluidity of rat's erythrocyte membranes.

The data obtained testify to the fact that the mechanism of diol permeability through rat's and rabbit's erythrocyte membranes is of complex nature. Passive cryoprotectant diffusion into rat's and rabbit's erythrocytes is realised by two alternative ways: through hydrophilic aqueous channels (data of permeability inhibition with pCMBs blockers) and directly through lipid bilayer (significant dependency of substance permeability coefficients on their “hydrophobicity” and high values of activation energy after erythrocyte incubation with pCMBs). The most hydrophobic compound in diol series: 1,2-butanediol penetrates into erythrocytes mostly via lipid bilayer and only small number (not higher than 16–18%) is capable to diffuse through hydrophilic protein pores. No statistically significant correlation of rat's and rabbit's erythrocyte membrane permeability for studied diols on geometric parameters of their molecules has been revealed.

Криосохранение гермоплазмы яблони в Казахстане

С.В. КУШНАРЕНКО, Н.В. РОМОДАНОВА

Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

Cryopreservation of Apple-Tree Germ Plasma in Kazakhstan

S.V. KUSHNARENKO, N.V. ROMODANOVA

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

На территории Казахстана расположен один из центров происхождения культурной яблони [Вавилов, 1931]. Дикорастущие яблони, образующие естественные плодовые леса на склонах Заилийского и Джунгарского Алатау, отличаются исключительным разнообразием форм и обладают ценным комплексом хозяйственно-биологических признаков. В Казахстане произрастают три диких вида яблони: *Malus sieversii* (Leeb.) M. Roem. (Сиверса), *M. kirghisorum* Al. Et An. Theod. и *M. niedzwetzkyana* Dieck. (Недзвецкого), представляющих большую ценность для селекции, особенно при выведении засухо- и морозоустойчивых, устойчивых к заболеваниям и высоковитаминных сортов [Джангалиев и др., 2001]. К сожалению, в результате усиливающегося антропогенного воздействия происходит катастрофическое сокращение ареалов дикорастущих яблонь. Два из трех видов: яблоня Сиверса и яблоня Недзвецкого занесены в Красную книгу Казахстана.

В связи с этим нами начата разработка методов криоконсервации гермоплазмы яблони.

Для отобранных элитных форм, а также ценных гибридов и сортов яблони оптимизированы методы криосохранения апикальных меристем. Проведено сравнение эффективности трех методов: витрификации, инкапсуляции-дегидратации и медленного программируемого замораживания. Установлено, что наиболее подходящим и экономичным методом криосохранения апикальных меристем яблони является метод витрификации, включающий в себя несколько этапов, которые были нами оптимизированы. Апикальные меристемы (0,8–1,0 мм) выделяли из асептических растений, культивируемых на среде Мурасиге-Скуга (МС) с 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты и прошедших холодное закаливание в течение 3 недель. Изолированные меристемы культивировали на среде МС с 0,3 М сахарозой в течение 2 суток в условиях холодного закаливания, обрабатывали криопротектором PVS2 (80 мин при 0°C) и погружали в жидкий азот. Оттаивание меристем проводили в водяной бане: 1 мин при 45°C и 1 мин при 22°C. Регенерацию растений из криосохраненных меристем проводили на среде МС с 0,5 мг/л БАП.

Установлено, что одним из наиболее важных этапов криоконсервации меристем является холодное закаливание асептических побегов. Показано, что использование переменных в течение суток температур (8 ч при 22°C и освещении $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 16 ч при -1°C в темноте) по сравнению с постоянной температурой (4°C) повышало жизнеспособность криосохраненных меристем и регенерацию побегов с 45,8–52,5 до 58,1–79,5% у всех исследованных генотипов.

Для сохранения биоразнообразия диких яблонь проведен сбор семян из естественных мест их произрастания и проводится разработка методов их криоконсервации.

In the territory of Kazakhstan there is located one of the centres of origin of cultural apple-tree [Vavilov, 1931]. Wild apple-trees forming natural fruit forests on the flanks of Zailiysky and Dzhungarsky Alatau, are distinguished by the exclusive variety of forms and possess the valuable complex of economic-biological features. In Kazakhstan three wild apple-tree varieties grow: *Malus sieversii* (Leeb.), M. Roem (Sivers), *M. kirghisorum* Al. Et An. Theod. and *M. niedzwetzkyana* Dieck (Nedzvetski), representing a great value for the selection, especially at the raising of drought- and frost-resistant, resistant to the diseases and highly vitamin varieties (Dzangaliev et al., 2001). Unfortunately, in the result of strengthening anthropogenic effect there is catastrophic reduction of habitats of wild apple-trees. Two of three varieties: Sivers and Nedzvetski apple-trees are included into the Kazakhstan Red Book.

In this connection we started the development of the cryopreservation methods for apple-tree germ plasma.

For the selected elite forms as well as valuable hybrids and varieties of the apple-tree the methods of cryopreservation of apical meristems have been optimized. There were compared the efficiencies of three methods: vitrification, incapsulation-dehydration and slow programmable freezing. It has been established that the most appropriate and efficient cryopreservation method of apple-tree apical meristems is vitrification, including several stages which were optimized by us. Apical meristems (0.8–1.0 mm) were isolated from aseptic plants cultured in the medium Murashige-Skoog (MS) with 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP) and 0.01 mg/l indolebutyric acid (IBC) and underwent cold-hardening for 3 weeks. Isolated meristems were cultured in the MS medium with 0.3 sucrose for 2 days under cold-hardening, treated with PVS2 protectant (80 min at 0°C) and submerged into liquid nitrogen. The meristems were thawed on water bath: 1 min at 45°C and 1 min at 22°C. Regeneration of the plants from cryopreserved meristems was done on the MS medium with 0.5 mg/l BAP.

It has been established, that one of the most important cryopreservation stage for meristems is cold-hardening of aseptic sprouts. It was shown that use of variable within 24hrs temperatures (8 hrs at 22°C and illumination of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 16 hrs at -1°C in dark) if compared with the constant temperature (4°C) increased the viability of cryopreserved meristems and regeneration of sprouts from 45.8–52.5% up to 58.1–79.5% in the studied gene types.

For biodiversity preservation of wild apple-trees the seeds from natural places of their growing were gathered and the methods of their cryopreservation are developed.

Криоконсервирование плаценты различной степени зрелости

О.С. ПРОКОПЮК¹, А.Ю. ПЕТРЕНКО¹, В.Ю. ПРОКОПЮК², В.В. ЧИЖЕВСКИЙ¹

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

²Харьковский национальный медицинский университет

Cryopreservation of Placenta with Different Maturity Degree

O.S. PROKOPYUK¹, A.YU. PETRENKO¹, V.YU. PROKOPYUK², V.V. CHIZHEVSKY¹

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²*Kharkov National Medical University, Ukraine*

Плацента является основной структурой, обеспечивающей гестационный процесс, орган- и системогенез плода, а также его витальность во внутриутробном и перинатальном периодах. В ходе эмбриогенеза плацента существенно видоизменяется как структурно, так и функционально.

Цель данной работы – определение криочувствительности плацентарных фрагментов и клеток в различные периоды эмбриогенеза.

Исследовали фрагменты и изолированные клетки хориона 7–10 недель, а также фрагменты и гетерогенную популяцию клеток плаценты 38 недель гестации.

Фрагменты хориона размером 0,5×0,5 см и плаценты размером 1,0×1,0×0,3 см снимали с материнской поверхности, криоконсервировали с ПЭО-400 и ДМСО по двух- и трехэтапной программам. Было определено, что максимальную морфофункциональную сохранность криоконсервированные фрагменты плаценты имеют при двухэтапном замораживании в присутствии 7%-го ДМСО, для криоконсервирования хориальных фрагментов можно использовать ДМСО и композиционный состав ДМСО и ПЭО-400.

Клетки хориона и плаценты выделяли ферментативным или неферментативным методом криоконсервировали по двух- и трехэтапной программам замораживания в криозащитной среде, содержащей в качестве криопротектора ДМСО, что позволило сохранить структурные и функциональные характеристики клеток хориона и плаценты человека, в том числе способность синтезировать стадиоспецифические соединения, гормоны и факторы роста. Для криоконсервирования клеток зрелой плаценты предпочтительна двухэтапная программа замораживания.

Таким образом, криочувствительность и криорезистентность плацентарных клеток зависят от степени выраженности межклеточных взаимодействий и гестационного возраста, что определяет программу криоконсервирования. Показана возможность эффективного криоконсервирования плаценты на различных этапах гистогенеза.

Placenta is an essential structure, providing gestation process, organ and system genesis of fetus, as well as its vitality in pre- and perinatal periods. During embryogenesis placenta significantly changes both in structural and functional ways.

The research was aimed to determine the placenta fragment and cell cryosensitivity in different periods of embryogenesis.

Chorion fragments and isolated cells of 7–10 weeks, as well as the fragments and heterogeneous population of placenta cells of 38 gestation weeks have been investigated.

Chorion and placenta fragments of 0.5×0.5 and 1.0×1.0×0.3 cm, correspondingly, were removed from a mother surface, then cryopreserved with PEO-400 and DMSO by two- and three-step programs. It has been determined, that the cryopreserved placenta fragments have the maximum morphofunctional integrity under two-step freezing in 7% DMSO presence, for chorion fragment cryopreservation it is possible to use DMSO and DMSO and PEO-400 composition.

Chorion and placenta cells were isolated either by enzymatic or non-enzymatic methods, cryopreserved by the two- and three-step freezing programs in cryoprotective medium, containing DMSO as cryoprotectant, that enabled to preserve structural and functional characteristics of human chorion and placenta cells, including the capability to synthesize the stage-specific compounds, hormones and growth factors. Two-step freezing program is preferable for mature placenta cell cryopreservation.

Thus, the placenta cell cryosensitivity and cryoresistance depend on manifestation degree of intercellular interaction and gestation age, that determines the cryopreservation program. The possibility of an efficient placenta cryopreservation at different histogenesis stages has been demonstrated.

Вплив розмірів контейнера на результат кріоконсервування суспензії *Saccharomyces cerevisiae*

О.В. САКУН¹, І.П.ВИСЕКАНЦЕВ², А.Ю. СІРЕНКО², Є.О. ГОРДІЄНКО²

¹Національний технічний університет "ХПІ", м. Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Containers' Sizes on Cryopreservation Outcome for *Saccharomyces cerevisiae* Suspension

O.V. SAKUN¹, I.P. VYSEKANTSEV², A.YU. SIRENKO², YE.O. GORDIYENKO²

¹"KhPI" National Technical University, Kharkov

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

Неоднорідність температурних полів та швидкостей охолодження в контейнері порівняно великого розміру з точки зору двохфакторної теорії кріопошкодження клітин неминуче приводить до зменшення збереженості біооб'єкта при збільшенні розміру зразка і швидкості охолодження. Швидкість охолодження клітини на етапі кристалізації суспензії змінюється в декілька разів в залежності від її розташування у зразку. Швидкість охолодження біля внутрішньої стінки контейнера, як правило, перевищує швидкість охолодження, що фіксується термопарою, розташованою на зовнішній стінці. У міру віддалення клітин від стінки контейнера швидкість охолодження збільшується у декілька разів, що, можливо, пов'язано зі зменшенням теплоємності льоду у порівнянні з рідкою фазою і поліпшенням умов тепловіддачі зі збільшенням кількості льоду у зразку. Швидкість охолодження зразка, що повністю затвердів, у відповідності з отриманими експериментальними даними мало відрізняється від швидкості охолодження, що реєструється термометром опору, розташованим на зовнішній стінці контейнера. Розкид вимірних параметрів заморожування збільшується при підвищенні швидкості охолодження та розміру зразка. Отримані експериментальні дані свідчать про необхідність перегляду існуючих уявлень щодо оптимального режиму охолодження клітинних суспензій у наступних напрямках. Необхідно з'ясувати, як збереженість однієї і тієї самої клітинної суспензії залежить від розміру зразка, що заморожується, та швидкості охолодження. Виникає потреба в уточненні самого поняття оптимальної швидкості охолодження зразка порівняно великого об'єму, а також у розробці нових, більш точних вимог до визначення оптимальних умов низькотемпературної консервації клітинних суспензій. Для забезпечення теоретичного розгляду процесів охолодження у контейнерах різного розміру отримані в роботі експериментальні термограми на етапі кристалізації суспензії *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині апроксимовані аналітичною функцією. Порівняння експериментально отриманих термограм з розрахованими аналітично показує, що останні цілком задовільно апроксимують експериментальні дані.

Heterogeneity of temperature fields and cooling rates in a container of quite a big size from the point of view of two-factor theory of cryodamage leads inevitably in the reduced preservation of biological object at the growing size of the sample and cooling rate. The one for a cell at the stage of suspension crystallization changes several times depending on its location in the sample. The cooling rate near the container's inner wall as a rule exceeds that fixed by thermocouple, located at an outer wall. With the removing the cells from the container's wall the cooling rate increases several times, that is probably related to the reduction of ice specific heat if compared with a liquid phase and improvement of heat transfer with ice increased amount in a sample. Sample cooling rate, completely hardened, in accordance to experimentally obtained data, is slightly different from the cooling rate, which is recorded with resistance thermometer, located on outer wall of the container. Scattering of the freezing parameters measured increases with a rise in of cooling rate and a sample size. The obtained experimental data testify to the necessity of revising the existing notions as for optimal regimen of cooling of cell suspensions in the directions as follows. It is necessary to find out how preservation of the same cell suspension depends on the size of the sample to be frozen, as well as on cooling rate. There is appeared the need in elucidation of the notion of optimal rate of a sample cooling of quite a big volume itself, as well as in development of new more distinct requirements to determining and representation of optimal conditions of low-temperature preservation of cell suspensions. For providing the theoretical review of the cooling process in the containers of different sizes the obtained in the paper experimental thermograms at crystallization stage of suspension *Saccharomyces cerevisia* in physiological solution are approximated function. Comparison of experimentally obtained thermograms with those calculated analytically has shown that the latter are quite well approximated the experimental data.

Розподіл швидкості охолодження у циліндричних контейнерах різного розміру на етапі кристалізації суспензії *Saccharomyces cerevisiae*

В.В. МАРУШЕНКО¹, І.П. ВИСЕКАНЦЕВ², Є.О. ГОРДІЄНКО²

¹ Національний технічний університет "ХПІ", м. Харків

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

Cooling Rate Distribution in Cylinder Containers of Different Diameter at Crystallisation Stage of *Saccharomyces cerevisiae* Suspension

V.V. MARUSCHENKO¹, I.P. VYSEKANTSEV², E.O. GORDIENKO²

¹ National Technical University "Kharkov Polytechnic Institute", Ukraine

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

Одним з наріжних каменів сучасної теорії пошкодження клітинних суспензій при їх низькотемпературній консервації є двохфакторна теорія. Вона пояснює той факт, що збереженість усіх клітинних суспензій "кулоподібно" залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації. Але реально протягом заморожування клітинної суспензії у контейнері, що має порівняно великий розмір, поле швидкостей охолодження є неоднорідним. В різних точках зразка швидкість охолодження на етапі кристалізації є неоднаковою і змінюється у деяких межах. При цьому збереженість будь-якої клітини залежить від її положення у зразку: чим більшим є розкид швидкостей охолодження, тим меншою є збереженість клітин у зразку в цілому, оскільки при цьому більша частина клітин заморожується зі швидкістю, що відрізняється від оптимального значення. Слід також звернути увагу на те, що при заморожуванні біооб'єкта з використанням програмного заморожувача, як правило, вимірювач температури, по відхиленню показань якого від заданої програми здійснюється керування процесом охолодження, розташовується або на осі симетрії контейнера, або на зовнішній його поверхні. У обох випадках програма охолодження відхиляється від задалегідь заданої. Отже, при криоконсервуванні зразків порівняно великого розміру всі режимні параметри заморожування змінюються в залежності від розташування клітини у зразку. При цьому неможливо реалізувати оптимальні умови заморожування для всіх клітин одночасно. У зв'язку з цим виникає проблема оптимізації умов заморожування біологічних об'єктів, які мають порівняно великі розміри, з урахуванням розкиду режимних параметрів охолодження для окремих клітин у зразку. Неоднорідність температурних полів та швидкостей охолодження в контейнері порівняно великого розміру з точки зору двохфакторної теорії криопошкодження клітин неминуче приводить до зменшення збереженості біооб'єкта по мірі збільшення розміру зразка і швидкості охолодження. У роботі встановлено аналітичний вираз, який апроксимує поле температур суспензії *Saccharomyces cerevisiae* у фізіологічному розчині на етапі кристалізації в циліндричному контейнері в залежності від його діаметра і швидкості охолодження зовнішньої поверхні контейнера. Показано, що значна частина клітин перед початком кристалізації позаклітинного розчину досить довгий проміжок часу експонується при температурі кристалізації. Тому при розробці методу низькотемпературного консервування доцільно завчасно визначити резистентність клітин до гіпотермічного зберігання у відповідному криозахисному середовищі.

One of the headstones in present theory of cell suspension damaging under the low temperature preservation is the two-factor theory. It explains the fact that the preservation of all cell suspensions depends in a "dome-like" way on the cooling rate at crystallisation stage. However actually, during cell suspension freezing in the container with relatively big size the range of cooling rates is heterogeneous. The cooling rate at crystallisation stage in the sample's different points is unequal and changes in some limits. At the same time the preservation of any cell depends on its location in the sample: the higher cooling rate dispersion is, the lower is cell preservation in the whole sample, since the majority of cells is frozen with the rate, different from the optimal value. Of note is also the fact, that under bioobject's freezing with a programmed freezer, the thermometer, by which indices' deviation from the fixed program the cooling processes is controlled, is generally placed either on the container's symmetry axis or on its external surface. In both cases the cooling program deviates from the preliminary fixed one. So, when cryopreserving the samples of relatively big size, the all operating freezing parameters are changed depending on the cell location in a sample. At the same time a simultaneous realisation of the optimal freezing conditions for all cells is impossible. Due to this fact the problem arises to optimise the freezing conditions for biological objects, having relatively big sizes, with taking into account the dispersion of cooling operating parameters for some cells in the sample. The heterogeneity of temperature ranges and cooling rates in the container with relatively big size from the point of view of two-factor theory of cell cryodamage inevitably results in bioobject's integrity decrease with an increase in sample's size and cooling rate. An analytical expression, approximating the temperature range of *Saccharomyces cerevisiae* suspension in physiological solution at crystallization stage in a cylinder container depending on its diameter and cooling rate of container's external surface, has been established in the research. The most of cells before beginning of extracellular solution crystallization was shown as exposed for quite a long time at crystallization temperature. Therefore when designing the method of low temperature preservation of expediency is a preliminary determination of cell resistance to hypothermic storage in the corresponding cryoprotective solution.

Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* для води та кріопротекторів

О.В. САКУН¹, І.Ф. КОВАЛЕНКО², А.Ю. СІРЕНКО², І.П. ВИСЕКАНЦЕВ², О.І. ГОРДІЄНКО²

¹Національний технічний університет "ХПІ", м. Харків

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Temperature Effect on Penetration Coefficients of Membranes of Yeast Cells *Saccharomyces cerevisiae* For Water and Cryoprotectants

O.V. SAKUN¹, I.F. KOVALENKO², A.YU. SIRENKO², I.P. VYSEKANTSEV², O.I. GORDIENKO²

¹"KhPI" National Technical University, Kharkov

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

Вибіркова проникність клітинних мембран відіграє важливу роль при кріоконсервуванні клітин. Від проникності клітинних мембран для води залежить швидкість зневоднення або обводнення клітин. Відома двофакторна теорія кріопошкодження, сформульована й обґрунтована Мейзуром, передбачає існування оптимальної швидкості охолодження клітин, яка пов'язана з проникністю клітин для молекул води. Важливим для кріобіології окремим видом проникності клітинних мембран є їх проникність для кріопротекторів. Від значення проникності для кріопротектора залежать умови еквілібрації клітин з кріопротектором до початку охолодження, умови відмивання клітин від кріопротектора після розморожування. Проникність клітинних мембран для кріопротекторів визначає механізм дії кріопротектора (внутрішньоклітинної або позаклітинної дії). Таким чином, визначення таких біофізичних параметрів клітинних мембран, як коефіцієнт фільтрації та коефіцієнти проникності для кріопротекторів, є невід'ємною складовою при розробці оптимальних режимів кріоконсервування клітинних суспензій. В роботі визначені коефіцієнти фільтрації та коефіцієнти проникності для найпоширеніших кріопротекторів (гліцерину, 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду) плазматичних мембран дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* при температурах 25 та 10°C. Визначено енергії активації проникання молекул води та кріопротекторів через мембрани цих клітин. На підставі отриманих результатів обговорюються механізми проникання молекул води та кріопротекторів через мембрани клітин *Saccharomyces cerevisiae* та оптимальні режими кріоконсервування цих клітин.

Selective penetration of cell membranes plays an important role during cell cryopreservation. The rate of dehydration or hydration of cells depends on the penetration of cell membranes for water. The well-known two-factor theory of cryodamage, represented and substantiated by P. Mazur, foresees the existence of optimal cooling rate for cells, which is associated with cell penetration for water molecules. The important for cryobiology separate type of penetration of cell membranes is their permeability to cryoprotectants. On the penetration value to cryoprotectants there are dependent the conditions of cell equilibration with cryoprotectant prior to cooling, the one of cell washing-out from cryoprotectant after thawing. Permeability of cell membranes to cryoprotectants determines the effect mechanism of cryoprotectant (intracellular or extracellular effect). Thus, examining of these biophysical parameters of cell membranes such as filtration coefficient and those concerning penetration to cryoprotectants is an integral component during the development of optimal cryopreservation protocols for cell suspensions. In the paper there are emphasized the filtration coefficients and those of permeability for the most used cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol and dimethyl sulfoxide) of plasma membranes of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* at 25 and 10°C. The activation energies of water molecule and cryoprotectant penetration via membranes of these cells were found. On the basis of the obtained results there are discussed the mechanisms of water molecule penetration and cryoprotectants via membranes of cells *Saccharomyces cerevisiae* and optimal regimens of cryopreservation for these cells.

Использование метанола для криоконсервирования спермиев различных видов рыб

С.П. БОРЫШПОЛЕЦ¹, В.В. ДЗЮБА²

¹Институт аквакультуры и гидробиологии Университета Южной Богемии, Чешская Республика

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

Use of Methanol For Cryopreservation of Sperm of Different Fish Species

S.P. BORYSHPOLETS¹, V.V. DZYUBA²

¹Institute of Aquaculture and Hydrobiology of Southern Bohemia University, Czech Republic

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

В связи с ухудшающейся экологической обстановкой и увеличением количества исчезающих видов рыб использование методов криоконсервирования спермы рыб при проведении природоохранных мероприятий и селекционных работ является актуальной задачей рыбодоводства. Метанол, как проникающий криопротектор, в настоящее время применяется для криоконсервирования спермиев рыб. Учитывая межвидовые различия физиологических параметров спермиев, определяющих успех оплодотворения *in vitro* у рыб, необходимо сравнительное изучение криопротекторных свойств метанола.

Работа была проведена на базе Института аквакультуры и гидробиологии Университета Южной Богемии, г. Водняне, Чешская Республика. Для исследования использовали сперму, полученную от половозрелых производителей стерляди *Acipenser rythenus*, европейского окуня *Perca fluviatilis* и карпа *Cyprinus carpio* с помощью методов гормональных стимуляций, криоконсервирования спермы и искусственного осеменения, описанных в литературе.

В экспериментах исследовали параметры: режимы криоконсервирования, подвижность и оплодотворяющая способность спермиев.

Выбор видов рыб для сравнительного изучения влияния метанола был обусловлен межвидовыми различиями в структуре спермиев и биологическими характеристиками яиц после овуляции.

Для спермиев стерляди, характеризующихся наличием акросомы, метанол оказывал наиболее выраженный криозащитный эффект. У этого вида рыб концентрация метанола менее 10% в криозащитной среде снижала оплодотворяющую способность, но не влияла на подвижность спермиев.

Для спермиев окуня метанол в концентрации 4–10% является эффективным криопротектором и его использование перспективно для получения потомства из криоконсервированной спермы.

Для криоконсервирования спермы карпа метанол не является оптимальным криопротектором, поскольку лишь при использовании медленных режимов криоконсервирования можно избежать криоповреждения основной части спермиев.

Мы предполагаем, что применение метанола целесообразно при криоконсервировании спермиев стерляди и окуня, но не карпа.

Работа проведена благодаря участию в проектах USB RIFCH MSM 6007665809, IAA608030801 и QH82119 (Чешская Республика), обменному гранту НАН Украины и АН Чешской Республики 2008–2009 г.

Due to the aggravating ecological situation and rise in the number of endangered fish species the use of cryopreservation for fish sperm when performing nature conservation measures and the works on selection is an actual task of fish breeding. Methanol as penetrating cryoprotectant nowadays is applied for cryopreservation of fish sperm. Taking into account interspecies differences of physiological parameters of sperm, determining the successful *in vitro* fertilization in fishes the comparative studying of cryoprotective properties of methanol is necessary.

The researches have been performed at the base of the Institute of Aquaculture and Hydrobiology of Southern Bohemia University, Vodnany, Czech Republic. For the examination there was used the sperm obtained from mature starlet *Acipenser rythenus*, European perch *Perca fluviatilis* and carp *Cyprinus carpio* using the method of hormonal stimulations, cryopreservation of sperm and artificial insemination described in the literature.

In the experiments the following parameters have been studied: cryopreservation regimens, motility and fertilizing ability of sperm.

The choice of fish species for comparative investigation of methanol effect was stipulated with interspecies differences in sperm structure and biological characteristics of eggs after ovulation.

For starlet sperm, characterizing with the presence of acrosome, the methanol rendered the most manifested cryoprotective effect. In this species the methanol concentration under 10% in cryoprotective medium reduced fertilizing ability, but did not affect the sperm motility.

For perch sperm methanol under concentration of 4–10% is an effective cryoprotectant and its use is perspective for obtaining the posterity from cryopreserved sperm.

For carp sperm cryopreservation methanol is not optimal cryoprotectants, since only when using slow cryopreservation regimens one may avoid the cryodamage of major part of sperm.

We suppose that the application of methanol is expedient during cryopreservation of starlet and perch sperm, but not for carp.

Фазовые переходы и стеклование в криозащитных средах и эмбрионах вьюна *Misgurnus fossilis* L.

К.Б. МИКСОН, А.В. ЗИНЧЕНКО, Е.Н. БОБРОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Phase Transitions and Vitrification in Cryoprotective Media and Embryos of Loach *Misgurnus fossilis* L.

K.B. MIKSON, A.V. ZINCHENKO, E.N. BOBROVA

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

Сохранение исчезающих видов рыб и создание криобанков – важнейшие проблемы криобиологии. Однако до настоящего времени проблема криоконсервирования эмбрионов рыб изучена недостаточно. Это обусловлено как большим размером, сложностью мембранных систем, так и низкой проницаемостью эмбриональных оболочек. Поэтому разработка методов криоконсервирования стеклованием эмбрионов является перспективной. Цель данной работы – исследование фазовых переходов, стеклования криозащитных сред на основе сахарозы для эмбрионов вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) для дальнейшей разработки витрифицирующих сред.

Эксперименты проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном и изготовленном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины для исследования фазовых переходов в области температур от -196 до 0°C . Образцы массой 1 г охлаждали вне калориметрического блока погружением в жидкий азот со средней скоростью $3,3(3)^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Затем образцы помещали в предварительно охлажденный калориметрический блок и нагревали со скоростью $8,3 \times 10^{-3}^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Такой методологический подход позволяет выявить процессы, которые могут развиваться в этих системах при охлаждении, но тормозятся кинетическими факторами.

При нагреве раствора от температуры жидкого азота на термограммах регистрируется скачок теплопоглощения, соответствующий переходу вещества из твердоаморфного (стеклообразного) в жидкое переохлажденное состояние. Величина скачка указывает на количество стеклообразной фазы в системе после охлаждения ниже температуры стеклования (t_g). Мы использовали термин “расстеклование” для описания процесса обратного стеклованию. При дальнейшем повышении температуры наблюдается процесс кристаллизации, который сопровождается выделением тепла. При температуре, характерной для данной системы, начинается плавление закристаллизованной смеси. На термограммах этот процесс регистрируется пиком теплопоглощения.

Таким образом, на основании параметров t_g и величины скачка теплопоглощения было установлено, что среда, содержащая 30% сахарозы, 3% ПЭО-1500, 10% этиленгликоля и 20% 1,2-пропандиола, витрифицируется. Это подтверждает правильность ранее сделанной визуальной оценки витрификации этой среды.

Preservation of endangered fish species and establishing cryobanks are the vital problems in cryobiology. However the problem of fish embryo cryopreservation has remained poorly studied by now. This is stipulated by both big size, membrane system complication and low permeability of embryonic membranes. Therefore the designing of cryopreservation methods by embryo vitrification is perspective.

The research was targeted to study the phase transitions, vitrification and sucrose-based cryoprotective media for *Misgurnus fossilis* L. loach embryos to design vitrifying media in future.

Experiments were performed in differentiated scanning calorimeter (DSC), designed and manufactured at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine to investigate the phase transitions within the temperature range from -196 to 0°C . The samples of 1g were cooled out of the calorimetric block by immersing into liquid nitrogen with $3.3(3)^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ average cooling rate. Afterwards the samples were placed into preliminarily cooled calorimetric block and heated with $8.3 \times 10^{-3}^{\circ}\text{C}/\text{sec}$. This methodological approach enables revealing the processes, which may develop in these systems at cooling, but which are inhibited by kinetic factors.

When heating solution from liquid nitrogen temperature, the heat absorption jump, corresponding to the substance transfer from solid-amorphous (vitriform) state into liquid overcooled one, is registered in thermograms. The jump value indicates to the number of vitriform phase in system after cooling being lower than vitrification temperature (t_g). We used “devitrification” term to describe the process, reversible to vitrification. During following temperature increase, the crystallization process, accompanied by heat release, is observed. The melting of crystallized mixture begins at the temperature, typical for this medium. In thermograms this process is registered with heat-absorption peak.

Thus, basing on the parameters t_g and heat absorption jump value, the medium, containing 30% sucrose, 3% PEO-1500, 10% ethylene glycol and 20% 1,2-propane diol, was established to be vitrified. This confirms the correctness of previous visual estimation of this medium vitrification.

Криоконсервирование бактерий рода *Enterococcus*

М.Н. КАЛАШНИКОВА¹, Е.Г. ПЕРЕТЯТКО²

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

²Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков

Cryopreservation of *Enterococcus* bacteria

M.N. KALASHNIKOVA¹, E.G. PERETYATKO²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Microbiology and Immunology named after I.I. Mechnikov

of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Бактерии рода *Enterococcus* часто являются этиологическим фактором внутрибольничных и гнойно-септических инфекций. Для решения вопросов диагностики, этиотропной терапии и специфической профилактики этих заболеваний необходимо создание коллекций клинических изолятов энтерококков. В существующих коллекциях наиболее часто используются хранение под минеральным маслом с периодическими пересевами и лиофилизация. Технологии криоконсервирования бактерий этого рода в настоящее время не разработаны.

Цель исследования – изучение влияния режимов и состава среды консервирования на сохранность бактерий рода *Enterococcus*. Объектами исследования служили эталонный штамм *Enterococcus faecalis* ATCC №29213 и 2 клинических изолята *Enterococcus faecium* №167 и №113. В качестве сред консервирования использовали дистиллированную воду, физиологический раствор NaCl и сахарный бульон. Замораживание проводили по трем режимам: режим 1 – быстрое погружение образцов в жидкий азот; режим 2 – охлаждение со скоростью 1°C/мин от 18 до –40°C с последующим погружением в жидкий азот; режим 3 – охлаждение со скоростью 2-3°C/мин от 18 до –28°C, выдерживание при этой температуре в течение 15 мин и последующее погружение в жидкий азот. Жизнеспособность бактерий оценивали чашечным методом Коха, биохимические свойства изучали с помощью набора EN-COCCUStest. Каталазную и гемолитическую активность, подвижность, резистентность бактерий к теллуриту калия определяли общепринятыми методами.

При изучении влияния режимов охлаждения и состава среды консервирования на жизнеспособность бактерий было установлено, что сохранность бактерий *E. faecalis* на исходном уровне обеспечивало замораживание по режиму 3 в сахарном бульоне; бактерий *E. faecium* №167 – замораживание по режимам 1 и 2 в дистиллированной воде и сахарном бульоне; бактерий *E. faecium* № 113 – замораживание по всем трем режимам в дистиллированной воде, по режимам 2 и 3 – в физиологическом растворе, по режиму 1 – в сахарном бульоне. В остальных условиях эксперимента жизнеспособность всех трех видов бактерий была ниже исходной. Замораживание по разным режимам и в разных средах консервирования не влияло на исходные биохимические и биологические свойства бактерий.

В результате проведенных экспериментов показана возможность эффективного криоконсервирования бактерий рода *Enterococcus*. Криоконсервирование обеспечивает сохранность исходных генетически детерминированных биохимических и биологических свойств бактерий этого рода.

Enterococcus bacteria are frequently etiological factor of hospital and pyo-septic infections. For solving the tasks of diagnostics, etiotropic therapy and specific prophylaxis of these diseases it is necessary to establish the collections of clinical isolates of enterococci. In the existing collections the storage under mineral oil with periodical replating and lyophilization are the most frequently used. Cryo-preservation protocols for the bacteria of these species for this moment have not been developed.

The research aim of this study was investigation of the effect of regimens and composition of cryopreservation medium on the integrity of *Enterococcus* bacteria. The research objects were reference strain *Enterococcus faecalis* ATCC N29213 and 2 clinical isolates *Enterococcus faecium* N167 and N113. As the cryopreservation media there were used distilled water, physiological solution NaCl and sugar broth. Freezing was performed according to three regimens: regimen 1 comprised rapid plunging of the samples into liquid nitrogen; regimen 2 consisted in cooling with the rate of 1°C/min from 18 to –40°C with following plunging into liquid nitrogen; regimen 3 included the cooling with the rate of 2–3°C/min from 18 to –28°C, maintenance at this temperature for 15 min and following plunging into liquid nitrogen. Bacteria viability was estimated with Koch plate method, biochemical properties were studied using the kit EN-COCCUStest. Catalase and hemolytical activity, motility, resistance of bacteria to potassium tellurite was found with traditional methods.

When examining the effect of cooling regimens and the cryopreservation media compositions on viability of bacteria there has been established that the integrity of *E. faecalis* bacteria at initial level was provided with freezing according to regimen 3 in sugar broth; freezing on regimens 1 and 2 in distilled water and sugar broth for bacteria *E. faecium* N167; *E. faecium* N113 for the one on all three regimens in distilled water, according to regimens 2 and 3 in physiological solution, on regimen 1 in sugar broth. In the rest experimental conditions the viability of three bacteria types was lower versus initial one. Freezing on different regimens and various cryopreservation media did not affect initial biochemical and biological properties of bacteria.

In the result of performed experiments there was shown the possibility of effective cryopreservation of *Enterococcus* bacteria. Cryopreservation provides the integrity of initial genetically determined biochemical and biological properties of bacteria of this genus.

Стратегия и методы длительного хранения генофонда растений

Н.Г. ТИХОНОВА, Г.И. ФИЛИПЕНКО, В.Г. ВЕРЖУК, А.С. ЖЕСТКОВ
ГНУ ГНЦ РФ ВИР им. Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург

Strategy and Methods of Long-Term Storage of Gene Fond of Plants

N.G. TIKHONOVA, G.I. FILIPENKO, V.G. VERZHUK, A.S. ZHESTKOV
N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, St.-Petersburgh, Russia

Около 100000 видов растений находятся под угрозой исчезновения. Стратегия сохранения биологического разнообразия на Земле сегодня включает два основных направления: сохранение *in situ* (в естественных биоценозах) и сохранение разнообразия *ex situ*: в зоопарках, заповедниках, полевых коллекциях, ботанических садах, создание генбанков животных, растений, микроорганизмов и т.д. Около 6 миллионов образцов хранятся в национальных, региональных и международных генбанках. В настоящее время основным способом сохранения генофонда растительных ресурсов мира *ex situ* является длительное низкотемпературное хранение семян.

Однако не все растения можно сохранить данным способом. При сохранении вегетативно размножаемых культур (корнеплодов и клубнеплодов, декоративных растений, плодовых культур), сохранении видов, имеющих рекальцитрантные семена, не выносящих подсушивания (в основном это тропические растения, например, какао, кокосовая пальма), сохранении специализированных тканей применяются методы криоконсервирования.

Классические протоколы криоконсервации растительных объектов включают ряд этапов:

- предварительная подготовка (может включать заcalку, обработку криопротекторами, подсушивание);
- замораживание (медленное замораживание, витрификация, инкапсуляция);
- хранение в жидком азоте;
- размораживание, отмывка от криопротекторов;
- регенерация растений, контроль выживаемости.

Следует отметить, что сами рекальцитрантные семена плохо переносят криоконсервацию. Обычно хранят в жидком азоте выделенные зародыши, каллусы, верхушки растений, полученных *in vitro* [H.F. Chin, 1988]. При криоконсервации вегетативно размножаемых культур используют верхушечные и пазушные почки, пыльцу, а также материал, полученный *in vitro*: культуры клеток, тканей и т.д. Важно поместить в жидкий азот образцы, не несущие инфекции [Benson, 1999].

В мировых криобанках сохраняется около 150-200 различных видов растений. Наибольшие криоколлекции: NSSL (Fort Collins, Colorado, USA) – 2100 образцов яблоки; CIP (Lima, Peru) – около 500 образцов картофеля; Tissue Culture BC Inc (Canada) – 5000 образцов 14 видов; IPK (Германия) – 1017 образцов картофеля, чеснока и мяты. Введение нового вида хранения требует больших денежных вложений.

About 100,000 plant varieties are endangered ones. The strategy of preserving biological variety on the Earth comprises today two main directions: preservation *in situ* (in natural biocenosis) and the one of variety *ex situ*: in the zoos, wildlife reserves, filed collections, botanical gardens, establishment of gene banks of animals, plants, microorganisms etc. About 6 millions of samples are stored in national, regional and international gene banks. Nowadays the main way for preserving gene fond of world plant resources *ex situ* is long-term low temperature storage of seeds.

However not all plants may be preserved with this method. During preservation of clonal cultures (root and tuber crops, ornamental plants, horticultural crops), preservation of varieties having recalcitrant seeds not surviving the drying (mainly they are tropic plants, e.g., cacao, coconut palm), preservation of specified tissues the cryopreservation methods are applied.

Classic protocols of cryopreservation of plant objects include some stages:

- preliminary preparation (may include hardening, treatment with cryoprotectants, drying);
- freezing (slow freezing, vitrification, incapsulation);
- storage in liquid nitrogen;
- thawing, washing-out of cryoprotectants;
- regeneration of plants, control of survival.

It should be noted that recalcitrant seeds endure cryopreservation badly. Usually the isolated germs, calluses, plant apices, obtained *in vitro* are stored [H.F. Chin, 1988]. During cryopreservation of clonal cultures there are used apical and axillary buds, as well as pollen and the material obtained *in vitro*, that is, cell and tissue cultures etc.. It is important to place into liquid nitrogen the samples free of infections [Benson, 1999].

In the world cryobanks about 15-200 various plant species are under storage. The largest cryocollections are as follows: NSSL (Fort Collins, Colorado, USA) comprises 2,100 apple varieties; CIP (Lima, Peru) contains about 500 potato species; Tissue Culture BC Inc (Canada) covers 5,000 samples of 14 species; IPK (Germany) comprises 1,017 varieties of potato, garlic, mint. Use of new type of storage requires big investments.

Влияние экстракта плаценты человека и криопротекторов на сохранность мембраны фибробластов человека

Л.Г. АБРАФИКОВА, Е.Д. РОЗАНОВА, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, О.А. НАРДИД
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Human Placenta Extract and Cryoprotectants on Human Fibroblast Membrane Integrity

L.G. ABRAFIKOVA, E.D. ROZANOVA, I.P. VYSEKANTSEV, O.A. NARDID
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Водно-солевой экстракт плаценты человека (ЭПЧ) характеризуется высоким содержанием биологически активных веществ, которые могут оказывать стабилизирующее действие на мембраны различных клеток, повышать их осмотическую устойчивость. Обязательными условиями для использования криопротекторов при криоконсервировании различных клеток являются проверка их токсичности, подбор концентраций, обеспечивающих криозащитный эффект и процесс введения их в клеточную суспензию.

Изучена сохранность фибробластов, полученных из кожных биоптатов человека, после введения 50% растворов криопротекторов ДМСО, 1,2-пропандиола и глицерина до конечной их концентрации 10%. Установлено, что все криопротекторы при таком способе их введения вызывают повреждения клеток. Наименьшее количество разрушенных клеток наблюдали после добавления ДМСО, наибольшее – глицерина.

Влияние ЭПЧ на фибробласты человека оценивали по двум показателям – по образованию формазана и по определению осмотической устойчивости. При экспозиции фибробластов в течение двух часов с ЭПЧ в клетках в 1,5 раза возрастало количество формазана, который образуется из хлорида-тетразолия. Это свидетельствует о повышении активности ферментных систем клеток, связанных с митохондриальными и микросомальными (цитозольными) электронно-транспортными системами.

Установлено, что с фибробластами преимущественно связываются белки, входящие в состав ЭПЧ. После экспозиции фибробластов с ЭПЧ при последующем внесении 50%-го раствора ДМСО до конечной концентрации 10% количество разрушенных клеток уменьшалось с 33 до 14%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспозиция фибробластов с ЭПЧ повышает их осмотическую устойчивость по отношению к ДМСО и активизирует обменные процессы в клетках. Это позволяет рекомендовать применение экстрактов плаценты в протоколах криоконсервирования различных клеточных суспензий.

Aqueous-saline human placenta extract (HPE) is characterized with a high content of biologically active substances, capable of rendering stabilizing effect on membranes of various cells, increasing their osmotic resistance. The mandatory conditions of the use of cryoprotectants during cryopreservation of different cells are the testing for their toxicity, selecting of the concentrations, providing the cryoprotective effect and the process of introducing them into cell suspension.

There was studied the integrity of fibroblasts derived from human skin biotates after the introduction of 50% cryoprotective solutions of DMSO, 1,2-propane diol and glycerol up to final concentration 10%. It has been established that all cryoprotectants during such a way of introduction cause cell damages. The lowest amount of destroyed cells was observed after adding DMSO, the highest was found with glycerol.

Effect of HPE on human fibroblasts was assessed using two parameters: formation of formazane and osmotic resistance. During exposure of fibroblasts for 2 hrs with HPE in cells in 1.5 times enhanced the amount of formazane, which is formed from tetrasolium chloride. This testifies to a rise in activity of enzyme systems of cells, related to mitochondrial and microsomal (cytosole) electron-transport systems.

It has been found out that in the majority the proteins being the components of HPE are bound with fibroblasts. After exposure of fibroblasts with HPE with following introduction of 50% DMSO under final concentration of 10% the number of destroyed cells decreased from 33 to 14%.

The obtained results testify that the exposure of fibroblasts with HPE increases their osmotic resistance in respect of DMSO and activates the exchange processes in cells. This enables the recommending of the use of placenta extracts in the cryopreservation protocols for different cell suspensions.

Исследование влияния режимов замораживания и конечных температур хранения на белки сыворотки кордовой крови

Э.О. НАРДИД, Е.Д. РОЗАНОВА, А.В. ЗИНЧЕНКО, Л.В. ЦЫМБАЛ, О.А. НАРДИД, Е.И. НАУМЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Effect of Freezing Regimens and Final Storage Temperatures on Cord Blood Serum Proteins

E.O. NARDID, E.D. ROZANOVA, A.V. ZINCHENKO, L.V. TSYMBAL, O.A. NARDID, E.I. NAUMENKO
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine*

Сыворотка кордовой крови (СКК), а также препараты, получаемые на ее основе, все шире используются при лечении ряда патологических состояний. При этом повышается эффективность лечения заболеваний, вызванных снижением функции различных систем организма, в том числе иммунной и гормональной. Низкотемпературное консервирование может стать одним из наиболее надежных способов длительного и полноценного хранения СКК. Однако использование этого подхода требует обоснованного выбора определенных режимов охлаждения и конечных температур хранения.

Цель работы – изучение влияния режимов замораживания и конечных температур хранения на конформацию и агрегационные свойства белков СКК методами ЭПР, микрокалориметрии и гель-хроматографии.

Методом ЭПР спиновых зондов показано, что режимы замораживания со скоростью 1–2°C/мин до –20 или –80°C являются неблагоприятными и вызывают нарушение конформации биомакромолекул, имеющее характер “разрыхления” поверхностных полипептидных цепей. Микрокалориметрические исследования СКК подтверждают такие нарушения конформации. Установлено, что после подобных режимов замораживания первая стадия тепловой денатурации альбумина, являющаяся доминантной и соответствующей плавлению участков белка, не связанных с жирными кислотами, происходит при более низкой температуре. Кроме того, проведенные исследования свидетельствуют, что после замораживания СКК с низкими скоростями наблюдается увеличение содержания высокомолекулярных и уменьшение низкомолекулярных фракций белков, что объясняется агрегацией биомакромолекул сыворотки. Основной вклад в этот процесс вносят сывороточный альбумин и иммуноглобулины. Установлено, что быстрое замораживание (со скоростью 300–400°C/мин) оказывает более щадящие воздействия на сывороточные белки. Такое замораживание не оказывает влияния на результаты гель-хроматографии, на кривые теплопоглощения СКК и на вид электрофореграмм.

Полученные данные позволяют высказать предположения о механизмах криоагрегации белков сыворотки.

Serum of cord blood (SCB) and preparations derived from it are used widely during treatment of pathologic conditions. Herewith the efficiency of diseases' treatment triggered by reducing the function of different systems of organism including immunologic and hormonal, increases. The low-temperature storage may be one of the most valid methods of long-term and integral storage of SCB. However, the application of this approach requires the reasonable selection of certain regimens of cooling and final temperature storage.

The research aim was to study the regimens of freezing and final temperature storage effect on conformation and aggregative properties of SCB proteins by EPR, microcalorimetry and gel-chromatography.

It has been shown by EPR method of spin probes that freezing regimens with 1–2°C/min rate down to –20°C or up to –80°C are unfavourable and trigger the disorder of biomacromolecules conformation, having a character of “decondensation” of superficial polypeptide chains. Microcalorimetric studies of SCB confirm these disorders. It has been established that after similar regimens of freezing the first stage of thermal denaturation of albumin, which is equal to melting of protein regions, not associated with fatty acids takes place at lower temperature. Besides, the carried out researches testify to the fact, that after freezing of SCB with low rates the increase of the content of high molecular and decrease of low molecular protein fractions are observed, that is due to aggregation of biomacromolecules' serum. The serum albumin and immunoglobulin carry dominantly contribute to this process. It has been established that rapid freezing (with 300–400°C/min) has more reduced impact on serum proteins. This freezing has no effect on gel-chromatography results, curves of thermal absorption of SCB and appearance of electrophoregrams.

The obtained data enable to suggest about the mechanisms of serum protein cryoaggregation.

Оценка энергетического состояния клеток после криоконсервации

О. А. ЛОПАТИНА¹, Г. И. МОРОЗОВА², Г. А. ДАНЛЫБАЕВА¹, Е. Л. ФИРСОВА¹, Р. Я. ПОДЧЕРНЯЕВА¹

¹ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва

²Российский университет дружбы народов, г. Москва

Estimation of Cell Energetic State After Cryopreservation

O.A. Lopatina¹, G.I. Morozova², G.A. Danlybayeva¹, E.L. Firsova¹, P.Ya. Podchernyayeva¹

¹D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Методом долгосрочного хранения клеточных линий является их криоконсервация и хранение суспензий клеток в жидком азоте.

Эффективность применения клеточных линий после деконсервации во многом зависит от степени восстановления их исходных свойств. Показано, что клетки с более высоким уровнем энергетического обмена способны сохранять достаточно высокий уровень функциональной активности [Тошчаков В.Ю. и соавт., 1989].

Цель работы – изучение состояния трансмембранных потенциалов (ТМП) и митохондриальной активности (МА) в нервных клетках мозга хорька (Mpf) в процессе размораживания. Для изучения процессов, происходящих в клетках, использовали флуоресценцию потенциал-чувствительного зонда – катиона 4-(*n*-диметиламино-стирил)-1-метилпиридиния (ДСМ), синтезированного в Институте органического синтеза АН Латвии [Морозова Г.И. и соавт., 1981]. С целью выбора контрольных клеток в адекватном физиологическом (энергетическом) состоянии клетки исследовали через различные временные интервалы после их размораживания (3–24 ч).

Культуры клеток Mpf окрашивали флуоресцентным зондом ДСМ при добавлении физиологического раствора с ДСМ к суспензии клеток. В первой серии экспериментов определяли оптимальный режим инкубации клеток с различными концентрациями зонда (от 1 до 50 мкМ в конечной концентрации). Клетки инкубировали с зондом при 20 и 37°C в течение 15–60 мин. Все препараты исследовали в люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ И-2 (ЛОМО). Интенсивность флуоресценции (F) в каждой клетке (в области митохондрий) регистрировали с помощью фотометрической насадки ФМЭЛ через оптический зонд. Для каждого образца измеряли по 50–100 клеток в опыте и контроле. Установлено, что концентрации 2 и 5 мкМ ДСМ в среде и время инкубации 40 или 20 мин с зондом при 20 и 37°C соответственно являются оптимальными. В дальнейшем эксперименты проводили в этих условиях.

Установлено, что F ДСМ в митохондриях клеток зависит от времени их культивирования в течение суток после размораживания. Экспериментальные оценки показали, что в течение 1–3 ч с момента начала культивирования таких клеток сохраняется низкий уровень ТМП, а наиболее высокий их уровень, сопряженный, прежде всего, с энергизацией митохондрий, достигается только через 12 ч. Такая динамика ТМП в клетках может отражать изменения свойств разных мембран, а именно: их вязкости и (или) ионной проницаемости (на фоне температурного скачка в среде после размораживания), изменение протонного потенциала на мембранах митохондрий в процессе метаболической активации и пролиферации [Добрецов Г.Е., 1989; Веренинов А.А., 1986; Скулачев В.П., 1987].

При сопоставлении экспериментальных данных установлено, что биофизический параметр F может быть использован как оценка физиологического (прежде всего энергетического) состояния клеток.

The method providing a long-term storage for cell lines is their cryopreservation and cell suspension storage in a liquid nitrogen.

The efficiency of applying the cell lines after freeze-thawing mostly depends on the recovery degree of their initial properties. The cells with higher level of energetic metabolism were shown to preserve quite a high level of functional activity [Toshchakov et al., 1989].

The research was targeted to study the state of transmembrane potentials (TMP) and mitochondrial activity in nerve cells of ferret brain (Mpf) during freeze-thawing. To investigate the processes, occurring in cells, we have used the fluorescence of potential-sensitive probe: cation 4-(*n*-dimethylaminostiril)-1-methylpyridinium (DSM), synthesized at the Latvian Institute of Organic Synthesis [Morozova et al.s, 1981]. In order to select the control cells in adequate physiological (energetic) state the cells were studied in different time intervals after their thawing (3–24 hrs).

The Mpf cell cultures were stained with DSM fluorescent probe when adding physiological solution with DSM into cell suspension. In the first experimental series we have determined the optimal regimen for cell incubation with different probe concentrations (from 1 to 50 mM final concentration). Cells were incubated with probe at 20 and 37°C for 15–60 min. All preparations were studied under LUMAM I-2 luminescent microscope (LOMO). The intensity of fluorescence (F) in each cell (in mitochondrial area) was recorded with PMEL photometrical attachment via optical probe. For each sample we measured 50–100 cells in the experiment and the control. The concentration of 2 and 5 mM DSM in medium and 40 or 20 min incubation time with probe at 20 and 37°C, correspondingly, were established as optimal. Further experiments were performed under these conditions.

There was established that F of DSM in cell mitochondria depended on time of their culturing within a day after thawing. The experimental assessments have demonstrated that during 1–3 hrs from these cells' culturing beginning there is preserved a low level of TMP, and the highest one, primarily conjugated with mitochondrial energization, is only achieved in 12 hrs. This TMP dynamics in cells may reflect the changes in properties of different membranes, namely their viscosity and/or ion permeability (at the background of temperature jump in the medium after thawing), change in proton potential on mitochondrial membrane during metabolic activation and proliferation [Dobretsov, 1989; Vereninov, 1986; Skulachev, 1987].

When comparing experimental data the biophysical parameter F was established as possible to be applied in estimating physiological (primarily energetic) cell state.

О механизме защиты криоконсервируемых биообъектов с помощью многокомпонентных криопротекторных растворов

А.И. ОСЕЦКИЙ, Т.М. ГУРИНА, А.Л. КИРИЛЮК, Н.В. РЕПИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

About Protection Mechanism of Cryopreserved Bioobjects with Multicomponent Cryoprotective Solutions

A.I. OSETSKY, T.M. GURINA, A.L. KIRILYUK, N.V. REPIN

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

Ингибирование механизмов повреждения криоконсервируемых биообъектов за счет использования композиций из различных криопротекторных веществ представляет собой весьма актуальное направление в криобиологических исследованиях. Однако до сих пор поиск оптимальных составов таких композиций носит чисто эмпирический характер, что снижает результативность данного подхода. В настоящей работе сделана попытка установить параметры, позволяющие целенаправленно подбирать ассортимент и процентное соотношение криопротекторных веществ при разработке технологий криоконсервирования. Особое внимание было уделено температурным интервалам вблизи температур стеклования T_g криопротекторных растворов, где такие композиции могут быть особенно эффективны. Это связано с тем, что в данных интервалах повреждение биосистем в основном происходит за счет пластической релаксации внутренних упругих напряжений различной природы. При этом наиболее сильно данные механизмы проявляются в области образования криоколлоидных фракций. Уменьшить действие за счет сокращения времени прохождения системы в этой области, т.е. за счет увеличения скорости охлаждения, очень сложно, так как после перехода через температуру T_g скорость охлаждения необходимо резко снижать. В то же время можно влиять на кинетику образования криоколлоидной фазы с помощью криопротекторных композиций, уменьшая тем самым действие иницируемых фазой механизмов повреждения. Для развития этого направления был проведен термопластический анализ замороженных водных растворов на основе глицерина и ДМСО, глицерина и ПЭО-1500, ДМСО и ПЭО-1500. Полученные результаты показали, что использование криопротекторных композиций позволяет существенно изменять кинетику образования и границы области существования криоколлоидной фазы на диаграмме состояний.

Данный подход расширяет экспериментальные возможности изучения процессов взаимодействия “вода-криопротектор” в условиях многокомпонентных систем и позволяет разработать принципы целенаправленного поиска оптимальных криопротекторных композиций.

Inhibition of mechanisms of damage of cryopreserved bioobjects due to application of compositions from different cryoprotective solutions represents highly topical concepts in cryobiological researches. However, by now the search of optimal compositions is of just empiric character, that reduces this approach efficiency. In this work the effort to establish the parameters, enabling purposefully select the range and percentage ratio of cryoprotective substances at developing of cryopreservation technologies has been done. A special attention has been given to the temperature intervals close to vitrification temperature T_g of cryoprotective solutions, where these compositions may be especially effective. This is associated with the fact, that in these intervals the biosystem damage generally takes place due to plastic relaxation of internal elastic stresses of different kind. Herewith these mechanisms are manifested very strongly in the range of formation of cryocolloidal fractions. To decrease the effect due to the reduction of system proceeding in this area, i.e. due to increasing of cooling rate, is very difficult, because after transition through temperature T_g the cooling rate is necessary to be sharply reduced.

At the same time one may affect formation kinetics of cryocolloidal phase with cryoprotective compositions, therefore decreasing the activity of the mechanisms of phase-triggered damage. For development of this direction the thermoplastic analysis of frozen aqueous solutions, based on glycerol and DMSO, glycerol and PEO-1500, DMSO and PEO-1500 was carried out. The obtained results have shown that application of cryoprotective compositions enables to significantly change the formation kinetics and region boundaries of cryocolloidal phase presence on state diagram.

This approach upgrades the experimental capacity of studying of water-cryoprotectant interaction under conditions of multicomponent systems and enables to develop the principles of goal-oriented search of optimal cryoprotective compositions.

Использование β -дикетонов Eu как метчика в клетках при криоконсервировании

Е.И. Гончарук¹, Е.В. Онищенко¹, П.Н. Жмури², Н.А. Волкова¹

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

²Институт сцинтилляционных материалов НТК "Институт монокристаллов" НАН Украины, г. Харьков

Usage of Eu β -diketones as Marker in Cells Under Cryopreservation

E.I. GONCHARUK¹, E.V. ONISCHENKO¹, P.N. ZHMURIN², N.A. VOLKOVA¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute for Scintillation Materials of State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

После деконсервирования клеток важно подтвердить их сохранность и аутентичность. Ионы европия, характеризующиеся узкополосной люминесценцией, могут быть использованы для мечения и тестирования клеточных культур. Цель работы – исследование взаимодействия β -дикетонов Eu (ацетотиенилтрифторацетон европия) с диплоидной культурой клеток фибробластов человека до и после криоконсервирования.

Культивирование проводили в стандартных условиях до достижения клетками 70% конfluence, после чего клетки окрашивали растворами β -дикетонов Eu, синтезированных в ИСМА НТК "Институт монокристаллов". Спектры поглощения и испускания клеток, меченных данным красителем, регистрировали на спектрофлуориметре FluoroMax-4 (Horiba, США). Криоконсервирование меченых клеток проводили по 3-этапной программе с использованием 7% ДМСО. Распределение красителя в клетках оценивали с помощью сканирующего конфокального микроскопа (Zeiss) при возбуждении 488 нм. Количественную оценку окрашивания проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, BD). Контролем служили некриоконсервированные культуры клеток.

Спектр флуоресценции при возбуждении на 350 нм культуры клеток, меченных β -дикетонами европия, характеризовался узким пиком с максимумом при $\lambda = 616$ нм, значительно превышающим по интенсивности собственную флуоресценцию клеток. Исследование распределения β -дикетонов европия в пролиферирующей культуре клеток показало связывание красителя с органеллами цитоплазмы клеток, свечение наблюдалось в красной области. При долгосрочном культивировании меченых клеток отмечено достоверное снижение их адгезивной способности и скорости роста. Конфокальная микроскопия показала выход красителя во внеклеточное пространство, что может свидетельствовать о непрочном связывании красителя с органеллами. Этот факт подтверждается данными цитофлуориметрии: количество окрашенных клеток после криоконсервирования снижается в 2,5 раза. Термограммы замораживания нативных и меченых клеток не отличались, т.е. интеграция данного хелатного соединения не оказывала влияния на криоконсервирование.

Полученные результаты свидетельствуют, что β -дикетоны Eu могут использоваться для исследования и идентификации культур клеток. Такая особенность данного метчика как узкополосная люминесценция является уникальным штрих-кодом для подтверждения аутентичности длительно сохраняемых или транспортируемых образцов.

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ 4358.

After cells' freeze-thawing of importance is to confirm their integrity and authenticity. The europium ions, characterized by a narrow-band luminescence, may be used for cell culture labeling and testing. The research was targeted to study the interaction of Eu β -diketones (europium acetylthienyltrifluoroacetone) with human fibroblast cell diploid culture prior to and after cryopreservation.

The culturing was carried-out under the standard conditions up to cell achieving 70% confluent, afterwards cells were stained with Eu β -diketone solutions, synthesized at the Institute for Scintillation Materials of State Scientific Institution "Institute for Single Crystals" of NAS of Ukraine. The absorption and emission spectra of cells, labeled with this dye, were recorded with Fluoro-Max-4 spectrofluorimeter (Horiba). Labeled cells were cryopreserved by the 3-step program with 7% DMSO. Dye distribution in cells was assessed using the scanning confocal microscope (Zeiss) at 488 nm excitation. Staining was quantitatively estimated using the cytofluorimetry method (FACS Calibur, BD). Non-cryopreserved cell cultures served as the control.

Fluorescence spectrum at 350 nm excitation of cell culture, stained with Eu β -diketones, was characterized by a narrow peak with the maximum at $\lambda=616$ nm, significantly exceeding the own cell fluorescence by the intensity. Studying the Eu β -diketone distribution in proliferating cell culture has demonstrated the dye binding with cell cytoplasm organelles, the luminescence was noted in red range. Statistically significant decrease in adhesive ability and growth rate was noted under long-term culturing of labeled cells. Confocal microscopy has shown the dye release into an extracellular space, that may testify to the unstable dye binding with organelles. This fact is confirmed by cytofluorimetric data: a number of stained cells after cryopreservation decreased in 2.5 times. The thermograms of frozen native and labeled cells did not differ, i.e. the integration of this chelative compound did not affect the cryopreservation.

The results obtained testify to the fact that the Eu β -diketones may be used for cell culture study and identification. Such capability of this marker as a narrow-band luminescence is the unique bar-code to confirm the authenticity of long-term stored and transported samples.

The research was carried-out under STCU grant 4358 support.

Мікроінкапсуляція тканини прищитоподібної залози в біополімерні капсули як метод попередження реакції відторгнення при трансплантації тваринам з експериментальним гіпаратиреозом

І.П. ПАСТЕР

ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України", м. Київ

Microencapsulation of Thyroid Gland Tissue into Biopolymer Capsules as Preventive Method Against Rejection Reaction under Transplantation to Animals with Experimental Hypoparathyroidism

I.P. PASTER

V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Важливою проблемою сучасної трансплантології є пошук шляхів запобігання реакції відторгнення трансплантату, для чого застосовують як супресивну терапію, так і метод мікроінкапсуляції тканини. Відомо, що мікрокапсули з біополімерів проникні для гормонів, поживних речовин і кисню, але не проникні для компонентів імунної системи.

Мета роботи – оцінити ефективність алло- і ксенотрансплантації мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози для компенсації експериментального гіпаратиреозу.

Мікроінкапсуляцію паратиреоїдної тканини людини і щурів в альгінатні капсули проводять за стандартними методами [Smidsrød O. and Skjåk-Bræk G., 1990; Zimmermann U. et al., 2001]. Мікроінкапсульовану тканину культивують в середовищі RPMI 1640 з ембріональною сироваткою (частина проб містить CaCl_2 в концентрації 2,0 ммоль/л) при температурі 37°C або трансплантують (підшкірно чи внутрішньочеревно) щурам із сталим післяопераційним гіпаратиреозом. В різні терміни культивування та після трансплантації проводять світломікроскопічні дослідження альгінатних капсул і тканини прищитоподібної залози, а також гормональні та біохімічні дослідження в середовищі культивування і сироватці крові щурів-реципієнтів.

Встановлено, що основні характеристики альгінатних мікрокапсул залежать від хімічної структури та концентрації біополімеру, а також від хімічного складу гелеутворюючого розчину. Альгінатні мікрокапсули зберігають цілісність протягом 49 діб культивування та 90 діб після трансплантації. Мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози щурів і людини зберігає основні морфофункціональні властивості (зокрема, здатність паратиреоцитів людини секретувати паратгормон і їх чутливість до впливу надлишку позаклітинного кальцію на секрецію гормону) в динаміці органного культивування. Трансплантати мікроінкапсульованої паратиреоїдної тканини людини та щурів зберігають свою життєздатність і функціональну активність впродовж тривалого часу після трансплантації, а також позитивно впливають на показники загального і вільного кальцію в крові щурів з експериментальним гіпаратиреозом: повна компенсація гіпокальціємії спостерігається при алотрансплантації ендокринної тканини, майже повна компенсація – при ксенотрансплантації.

Таким чином, мікроінкапсуляція ефективно захищає трансплантат від імунної "атаки" реципієнта, а трансплантація мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини або щурів здатна ефективно компенсувати гормональну недостатність при експериментальному гіпаратиреозі.

An important problem in actual transplantology is search for ways to prevent the transplant's rejection reaction, for this purpose both suppressive therapy and tissue microencapsulation method are applied. Biopolymer microcapsules are known as permeable for hormones, nutrient substances and oxygen, but not for immune system components.

The research was targeted to estimate the efficiency of allo- and xenotransplantation of microencapsulated tissue of thyroid gland to compensate experimental hypothyroidism.

Microencapsulation of human and rat's parathyroid tissue into alginate capsules is performed by the standard technique [Smidsrød O. and Skjåk-Bræk G., 1990; Zimmermann U. et al., 2001]. Microencapsulated tissue is either cultured in RPMI 1640 medium with embryonic serum (a part of samples contains CaCl_2 in 2.0 mmol/l concentration) at 37°C or transplanted (subcutaneously or intraperitoneally) to rats with a permanent post-operative hypoparathyroidism. In different culturing terms and after transplantation the light microscopic studies of alginate capsules and parathyroid gland tissues, as well as hormonal and biochemical studies in culturing medium and rat-recipient's blood serum have been performed.

The principal characteristics of alginate microcapsules were established to be dependent on chemical structure and concentration of biopolymer, as well as on chemical composition of gel-forming solution. Alginate microcapsules preserve the integrity within 49 culturing days and 90 days after transplantation. Microencapsulated tissue of human and rat's parathyroid gland preserves the main morpho-functional properties (excepting the capability of human parathyreocytes to secrete parathyroid hormones and their sensitivity to the effect of extracellular calcium surplus on hormone secretion) in organ culturing dynamics. The transplants of microencapsulated human and rat's parathyroid tissue preserve their viability and functional activity within a long-term after transplantation, as well as positively affect the indices of total and free calcium in rat's blood with experimental hypoparathyroidism: complete compensation of hypocalcemia is observed at endocrine tissue allotransplantation and almost complete one at xenotransplantation.

Thus, microencapsulation efficiently protects transplant against a recipient's immune "attack" and the transplantation of microencapsulated tissue of human or rat's parathyroid gland is capable to efficiently compensate the hormonal failure

Комбинированная ксенотрансплантация криоконсервированной органотипической культуры или островков поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете 1 типа

Е.И. ЛЕГАЧ, Н.В. КОЛОТ, Г.А. БОЖОК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Combined Xenotransplantation Either of Cryopreserved Organotypic Culture or Pancreas Islets Under I Type Experimental Diabetes Mellitus

E.I. LEGACH, N.V. KOLOT, G.A. BOZHOK

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

Сахарный диабет (СД) занимает значительное место среди наиболее распространенных заболеваний современности. Трансплантация поджелудочной железы или изолированных островков поджелудочной железы (ОПЖ) остается единственным методом, который позволяет добиться адекватной регуляции углеводного обмена на уровне организма и отдалить или исключить развитие вторичных осложнений. Комбинированная трансплантация может являться фактором, который пролонгирует выживаемость ОПЖ. На сегодня имеются данные об успешном функционировании ОПЖ при трансплантации с клетками Сертоли семенников. Однако насколько будет эффективным этот подход при использовании не суспензионных, а органотипических культур, требует дальнейшего изучения, так как такие культуры содержат клетки эндотелия, "пассажиры" лейкоциты, клетки протоков, что увеличивает способность такого биологического материала к стимуляции иммунного ответа при трансплантации.

Цель работы – изучить степень компенсации экспериментального СД 1 типа после комбинированной ксенотрансплантации криоконсервированной органотипической культуры или ОПЖ на основе определения комплекса показателей углеводного обмена.

Органотипическую культуру поджелудочной железы (ОКПЖ), органотипическую культуру семенников (ОКС), ОПЖ и клетки Сертоли получали от новорожденных поросят. Сахарный диабет вызывали у 3–4-месячных крыс и у 5-6-месячных кроликов путем однократной внутривенной инъекции стрептозотцина или аллоксана. Ежедневно в сыворотке крови измеряли: уровень глюкозы – глюкозооксидазным методом, содержание инсулина и С-пептида – иммуноферментным и радиоизотопным методами.

Установлено, что использование комбинированной трансплантации криоконсервированных ОКПЖ с ОКС ускоряло коррекцию гипергликемии (2 недели в отличие от 3–4 недель при монотрансплантации криоконсервированной ОКПЖ). На основании комплекса показателей углеводного обмена (тест толерантности к глюкозе, содержание гликозилированного гемоглобина) установлена компенсация СД у животных с комбинированной трансплантацией тканей поджелудочной железы и семенников на длительном сроке наблюдения (3 месяца).

Интрапортальная монотрансплантация ОПЖ новорожденных поросят в течение 12–14 суток приводила к нормализации уровня глюкозы у реципиентов, однако после 29–31 суток наблюдался возврат гипергликемического состояния. Интрапортальная комбинированная трансплантация ОПЖ с клетками Сертоли позволяла повысить выживаемость островков в 2,3 раза по сравнению с монотрансплантатом. Степень компенсации углеводного обмена у животных с комбинированной трансплантацией была значительно выше, чем у животных с монотрансплантацией.

Diabetes Mellitus (DM) holds a high position among the most spread actual diseases. Transplantation either of pancreas or isolated pancreas islets (PIs) has remained the unique method, enabling to achieve an adequate regulation of carbohydrate metabolism at an organism's level and to remote/or exclude the development of secondary complications. A combined transplantation may be the factor, prolonging the PIs survival. Nowadays there are the data about a successful PIs functioning under transplantation with testicular Sertoli cells. However the question about this approach efficiency when using organotypic cultures, but not suspension ones, needs to be studied in future, since such cultures contain endothelial cells, "passenger" leukocytes, duct cells, that augments this biological material capability of immune response stimulation under transplantation.

This research was aimed to study the compensation degree of experimental I type DM after combined xenotransplantation of cryopreserved organotypic culture or PIs, based on determining the complex of carbohydrate metabolism indices.

Pancreas and testicular organotypic culture (POC) and (TOC), correspondingly, PIs and Sertoli cells were derived from newborn piglets. DM was induced in 3-4 months' rats and in 5-6 months' rabbits via a single intravenous injection either of streptozotocin or alloxan. Glucose level and insulin, C-peptide contents were weekly measured in blood serum with glucose oxidase method and immune enzyme and radioisotope ones, correspondingly.

Usage of a combined transplantation of cryopreserved POC with TOC was established as accelerating hyperglycemia correction (2 weeks versus 3–4 ones under monotransplantation of cryopreserved POC). Basing on the complex of carbohydrate metabolism indices (glucose-tolerance test, glycosylated hemoglobin content) there was established the DM compensation in animals with a combined transplantation of pancreas and testicular tissues within a prolonged observation term (3 months).

An intraportal monotransplantation of newborn piglet's PIs within 12-14 days resulted in glucose level normalisation in recipients, but following 29–31 days the return to hyperglycaemic state was observed. An intraportal combined PIs transplantation with Sertoli cells enabled to a two-, three-fold increase in islet survival compared to the monotransplant. The compensation extent of carbohydrate metabolism in animals with a combined transplantation was significantly higher than in those with monotransplantation.

Оценка эффективности высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток у больных множественной миеломой

Т.П. ЗАГОСКИНА, Н.В. МИНАЕВА, Н.А. МЕДВЕДЕВА, Е.П. СВЕДЕНЦОВ, Н.В. ИСАЕВА,
А.С. ЛУЧИНИН, К.А. МАРТЫНОВ, А.А. КОСТЯЕВ, С.В. УТЕМОВ

Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Assessment of High-Dosed Chemotherapy Efficiency with Following Transplantation of Autologous Hemopoietic Cells in Patients with Multiple Myeloma

T.P. ZAGOSKINA, N.V. MINAYEVA, N.A. MEDVEDEVA, E.P. SVEDENTSOV, N.V. ISAYEVA,

A.S. LUCHININ, K.A. MARTYNOV, A.A. KOSTYAYEV, S.V. UTEMOV

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

Успехи в лечении множественной миеломы (ММ), достигнутые за последние 15 лет, связаны с разработкой и внедрением в клиническую практику высокодозной химиотерапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток периферической крови. Использование высокодозной (140 или 200 мг/м²) химиотерапии мелфаланом позволяет получить полные ремиссии у 24–75% первичных больных ММ, а токсическая смертность при этом в группе молодых больных не превышает 5%. Классическим примером такой терапии может служить программа total therapy (B. Barlogie). Однако высокодозное лечение с последующей аутоТПСК при ММ все же не предотвращает развитие рецидивов.

В период с 2002 по 2007 год 14 больным (мужчин – 4, женщин – 10) ММ была проведена высокодозная химиотерапия с последующей аутоТПСК. Возраст больных – от 40 до 55 лет (медиана 49 лет). У 10 (72%) больных была диагностирована IgG миелома, у 2 (14%) – миелома Бенс-Джонса и у 2 (14%) – несекретирующая форма ММ. Индукционная химиотерапия включала 3-4 курса по программе VAD, далее проводился курс высокодозированного циклофосфана с последующей заготовкой CD34⁺ клеток на сепараторах непрерывного тока крови. Затем выполнялась однократная (12 больным) или не позднее 6 мес. двойная (2 больным) аутоТПСК. Продолжительность периода наблюдения за больными после завершения лечения колеблется от 1 до 38 мес. (медиана 8 мес.). На сегодняшний день полная ремиссия сохраняется у 8 из 14 (57%) больных. У 4 (29%) больных через 3–27 мес. (медиана 10,5 мес.) после трансплантации был выявлен рецидив заболевания. Токсическая летальность составила 14% от аспергиллеза легких. Медиана безрецидивной выживаемости больных ММ составила 21 мес. Ожидаемая трехлетняя безрецидивная выживаемость равняется 31%. Среди больных с рецидивами заболевания у 50% обострение наступило в течение первых 12 мес. после трансплантации. При этом рецидивы были зафиксированы у больных, у которых не достигнута полная ремиссия после курсов индукционной терапии. Медиана общей выживаемости составила 34 мес.

Таким образом, высокодозная химиотерапия с последующей аутоТПСК позволила половине больных ММ прожить около 2 лет без обострения заболевания. В то же время риск развития рецидивов остается по-прежнему высоким и неизбежным при данном виде терапии.

Achievements in treating multiple myeloma (MM) within the recent 15 years are associated to the development and introduction into clinical practice of a high-dosed chemotherapy with following transplantation of autologous hemopoietic stem cells of peripheral blood. The usage of high-dosed (140 or 200 mg/m²) chemotherapy with melphalan enables the complete remissions in 24-75% of primary patients with MM, thereat a toxic mortality in the young patients' group does not exceed 5%. The total therapy program (B. Barlogie) may serve as the standard example of this therapy. However, the high-dosed treatment with following autoSCT at MM does not even prevent the relapse development.

Within the period from 2002 to 2007 14 patients with MM (4 men and 10 women) received a high-dosed chemotherapy with following autoSCT. Patients were 40-55 years old (49 years median). The IgG myeloma was diagnosed in 10 patients (72%), the Bence Jones myeloma in 2 (14%) and non-secreting MM in 2 (14%). The induction chemotherapy comprised 3-4 courses by the VAD program, afterwards there was performed the course of a high-dosed cyclophosphanum with following procurement of CD34⁺ cells using the continuous blood separators. Then a single (12 patients) or double (2 patients) autoSCT not later than 6 months have been done. The duration of observation period after treatment completing varies from 1 to 38 months (8 month median). Nowadays a complete remission is kept in 8 from 14 patient (57%). In 4 patients (29%) 3–27 months after trans-plantation (10.5 months median) the disease relapse has been revealed. A toxic lethality was 14% of the lung aspergillosis. The median of relapse-free survival of MM patients was 21 months. The expected three-years' relapse-free survival is 31%. Among the patients with disease relapse in 50% the aggravation occurred within the first 12 months after transplantation. At the same time the relapses were registered in patients with non-achieved complete remission after induction therapy courses. The total survival median was 34 months.

Thus, a high dosed chemotherapy with following autoSCT enabled a half of MM patients to live about 2 years with no disease aggravation. At the same time, the risk of relapse development has still remained high and inevitable at this therapy.

Эффективность высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных стволовых клеток у больных с прогностически неблагоприятными вариантами лимфомы Ходжкина

Н.В. МИНАЕВА, Н.А. МЕДВЕДЕВА, Е.П. СВЕДЕНЦОВ, Т.П. ЗАГОСКИНА,
Г.А. ЗАЙЦЕВА, Н.В. ИСАЕВА, А.А. КОСТЯЕВ, С.В. УТЕМОВ

Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Efficiency of High Dose Chemotherapy With Transplantation of Autologous Stem Cells in Patients With Prognostically Unfavorable Variants of Hodgkin's Lymphoma

N.V. MINAYEVA, N.A., MEDVEDEVA, E.P. SVEDENTSOV, T.P. ZAGOSKINA,
G.A. ZAYTSEVA, N.V. ISAEVA, A.A. KOSTYAEV, S.V. UTEMOV

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

Проведенные исследования показали, что высокодозная химиотерапия (ВХТ) с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток является перспективным и реальным методом лечения больных с резистентными и рецидивирующими формами лимфомы Ходжкина (ЛХ). Частота достижения полных ремиссий у этой категории больных, по данным различных авторов, колеблется от 36 до 76%, а трехлетняя безрецидивная выживаемость достигает 37-50%.

В отделении трансплантации клиники КНИИ ГПК с 1994 по 2007 год высокодозную химиотерапию с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток получили 20 пациентов с ЛХ. Возраст больных составил от 15 до 47 лет. При постановке первичного диагноза 4 ст. установлена у 35% пациентов, 3 ст. – 50%, 2 ст. – 15%, В-симптомы выявлены у 60% больных. Причиной проведения ВХТ 60% была первичная резистентность (60%), 10% – поздние рефрактерные рецидивы пациентов, у 20% ВХТ проведена в качестве консолидации 1-й ремиссии в продвинутой стадии заболевания. До принятия решения о проведении ВХТ пациенты получили 6-14 курсов химиотерапии. В качестве предтрансплантационной подготовки 75% пациентов получили программу BEAM, 25% – режим CVB. В качестве гемопоэтического материала костный мозг использовался в 60% случаев, стволовые клетки периферической крови – в 40%.

Медиана периода восстановления уровня нейтрофилов более $0,5 \times 10^9/\text{л}$ составила 18 дней, тромбоцитов более $20 \times 10^9/\text{л}$ – 21 день, в течение 100 дней летальность составила 5%. После проведения ВХТ полная ремиссия достигнута у 65% пациентов, неподтвержденная полная ремиссия – у 10%, длительность ремиссии составила от 10 до 156 месяцев. Рецидив заболевания развился у 15% больных в сроки от 7 до 11 месяцев наблюдения, 1(5%) пациент погиб в состоянии ремиссии через 36 месяцев после ВХТ с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток от сопутствующей патологии.

Полученные результаты демонстрируют высокую эффективность этого метода терапии при прогностически неблагоприятных формах лимфомы Ходжкина и сопоставимы с результатами лечения в специализированных клиниках России и Украины.

The studies performed till now have shown that high dose chemotherapy (HDC) with following transplantation of hemopoietic stem cells is perspective and actual treatment method for the patients with resistant and recurrent forms of Hodgkin's lymphoma (HL). The frequency of achieving the complete remissions in this group of patients according to the data of different authors varies from 36 to 76% and three-years' survival with no relapses reaches 37–50%.

At the Clinical Department of Transplantology of the Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion since 1994 to 2007 20 patients with HL received a high dose chemotherapy with following transplantation of autologous hemopoietic stem cells. The patients' age was from 15 to 47 years old. When making the primary diagnosis of the 4th grade it has been found in 35%, the one of the 3rd grade for 50%, the 2nd one for 15%. B-symptoms were found in 60% of patients. The reason of giving HDC was primary resistance (60%), late refractory relapses in 10%, HDC was done as consolidation of the 1st remission in an advanced disease stage. Prior to the solving the task of HDC performing the patients received 6–14 chemotherapy sessions. As pre-transplantation preparing 75% of patients have received the BEAM program, CVB regimen for 25% ones. Bone marrow was used in 60% of cases as hemopoietic material, and peripheric blood stem cells in 40%.

Median of the recovery period for neutrophils level of more than $0.5 \times 10^9/\text{l}$ made 19 days, 21 days for platelets more than $20 \times 10^9/\text{l}$, the lethality for 100 days made 5%. After HDC a complete remission was achieved in 65% of patients, non-confirmed complete remission in 10%, remission duration was from 10 to 156 months. The disease relapse developed in 15% of patients within the terms from 7 to 11 observation months, 1 patient (5%) died in a remission state in 36 months after HDC with transplantation of hemopoietic stem cells from the accompanying pathology.

The obtained results demonstrate a high efficiency of this therapy method at prognostically unfavorable forms of Hodgkin's' lymphoma and are comparable with the treatment results in specialized clinics of Russia and Ukraine.

Влияние среды культивирования на жизнеспособность бифидобактерий после криоконсервации

А.В. СИДОРЕНКО, Г.И. НОВИК

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Effect of Medium Culturing on Bifidus Bacteria Viability After Cryopreservation

A.V. SIDORENKO, G.I. NOVIK

Institute of Microbiology of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus

Криоконсервация является эффективным методом хранения производственных и коллекционных культур, обеспечивающим сохранность жизнеспособности, основных морфофункциональных и генетических свойств микроорганизмов в течение длительного времени. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что жизнеспособность микроорганизмов после криоконсервации зависит от ряда факторов, в частности среды, используемой для культивирования клеток перед замораживанием.

Цель работы – изучить влияние среды культивирования на выживаемость бифидобактерий после криоконсервации.

Объектом исследований служил штамм *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ. Криоконсервации подвергали 18–20-часовые культуры, выращенные при 37°C в следующих средах: MRS с добавлением 0,05% L-цистеина (MRS-C), “Бифидум” (БД) и тиогликолевой (ТГ). В качестве суспензионной среды применяли физиологический раствор. Образцы замораживали путем непосредственного погружения в жидкий азот.

При исследовании жизнеспособности бифидобактерий после криоконсервации установлено, что выживаемость клеток, выращенных в среде MRS-C (82%), достоверно выше клеток, выращенных в средах ТГ (50,9%) и БД (48,1%). В то же время показатели накопления биомассы и активности кислотообразования через 24 ч культивирования, полученные для криоконсервированных клеток независимо от среды культивирования перед замораживанием, практически не отличались от величин, полученных для интактных клеток. Изучение устойчивости бифидобактерий к действию стрессовых факторов выявило существенное увеличение чувствительности криоконсервированных культур к кислотному шоку: выживаемость клеток, выращенных в среде MRS-C, снижалась на 23,3%, БД – 25%, ТГ – 28,7% по отношению к показателям выживаемости интактных клеток. Устойчивость бифидобактерий к тепловому шоку после криоконсервации независимо от среды предварительного культивирования достоверно не изменялась.

Полученные данные свидетельствуют, что оптимальной средой для культивирования бифидобактерий перед замораживанием является MRS-C, применение которой позволяет повысить выживаемость и уменьшить количество нелетальных повреждений, развивающихся в клетках данных микроорганизмов на этапах замораживания-отогрева.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № Б07К-024.

Cryopreservation is effective method of storage of commercial and collection cultures, providing the preservation of viability and basic morphofunctional and genetic properties of microorganisms for the long time. Numerous experimental data testify that the microorganism viability after cryopreservation depends on several factors, particularly, the medium used for the cell culturing prior to freezing.

The research aim was to study the effect of culturing on viability of bifidus bacteria after cryopreservation.

The research object was *Bifidobacterium adolescentis* 94 BIM strain. The cultures of 18–20 hrs were exposed to cryopreservation, grown at 37°C in following media: MRS with adding of 0.05% L-cysteine (MRS-C), “Bifidum” (BD) and thioglycolate (TG). As the suspension medium the physiological solution was used. The samples were frozen by a direct plunging into liquid nitrogen.

When investigating the viability of bifidus bacteria after cryopreservation, it has been established, that survival of cells, grown in the MRS-C (82%) medium was significantly higher if compared to the cells grown in TG (50.9%) and BD (48.1%). At the same time the indices of biomass accumulation and activity of acid production over 24 hrs of culturing, obtained for the frozen-thawed cells independently on medium of culturing prior to freezing, practically did not differ from the intact cells. Studying of bifidus bacteria resistance to the stress effect revealed the significant increase in sensitivity of frozen-thawed culture to the heat shock: survival of cells, grown in MRS-C medium decreased to 23.3%, 25% for BD, 28.7% for TG comparing to survival indices of intact cells. The resistance of bifidus bacteria to thermal shock after freeze-thawing irrespectively to the preculturing media did not change significantly.

Obtained data testify to the fact that the optimal media for culturing of bifidus bacteria prior to freezing is MRS-C, which application enables to increase the survival and to decrease the number of nonlethal damages, appearing in cells of the studied microorganisms at the stages of freeze-thawing stages.

The work was carried out with financial support from Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research., grant № B07K-024.

Оцінка стану популяції еритроцитів хворих на гіпотиреоз до та після трансплантації криоконсервованої щитоподібної залози за їх розподілом по індексу сферичності

В.О. МАКЕДОНСЬКА, О.І. ГОРДІЄНКО

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Evaluation of Population State of Erythrocytes of Patients with Hypothyroidism Prior to and After Transplantation of Cryopreserved Thyroid Gland for Their Sphericity Index Distribution

V.O. MAKEDONSKAYA, O.I. GORDIENKO

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

Важливе фізіологічне значення мають геометричні параметри еритроцитів, що обумовлено необхідністю проходження еритроцитів крізь найменші капіляри в циркуляційному руслі. Здатність цих клітин до деформації тісно пов'язана з їх формою, а саме з відношенням площі поверхні клітини до її об'єму. Попередні дослідження показали, що порушення у функціонуванні щитоподібної залози впливають на картину розподілу еритроцитів за індексом сферичності. Розроблений нами метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності був використаний для оцінки стану еритроцитарної популяції у хворих на гіпотиреоз до та після трансплантації криоконсервованої щитоподібної залози. Показано, що у всіх хворих, яких готували до трансплантації, розподіл еритроцитів за індексом сферичності характеризувався додатковим максимумом в зоні малих індексів сферичності (від 1,0 до 1,2). Це свідчить про існування значної субпопуляції клітин, близьких до сферичних. Через 6 місяців після трансплантації криоконсервованої щитоподібної залози у всіх досліджених популяціях криві розподілу виявляють зменшення питомої ваги клітин в зоні малих індексів сферичності, що свідчить про нормалізацію балансу клітин червоної крові, який був порушений через гормональну недостатність при гіпотиреозі. Результати обстеження пацієнтів показують, що така нормалізація кривих розподілу узгоджується з покращенням стану хворих на гіпотиреоз після трансплантації криоконсервованої щитоподібної залози за даними клінічного та гормонального дослідження. Запропонований метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності може бути додатковим інформативним показником стану хворих у процесі лікування.

The geometrical parameters of erythrocytes have physiologic importance, stipulated by the necessity of erythrocyte transmission through the thinnest capillaries in circulatory stream. The capacity of these cells to deformation is closely connected with their shape, in particular with cell surface area to volume ratio. Previous investigations have shown that damages of thyroid gland function affect the picture of erythrocyte distribution on the sphericity index. The developed method of determining the density of erythrocyte distribution on the sphericity index was used for evaluation of erythrocyte population state of patients with hypothyroidism prior to and after transplantation of cryopreserved thyroid gland. It has been shown that in all the patients, prepared for transplantation, erythrocyte distribution on the sphericity index was characterized by additional maximum in zone of low sphericity index (from 1.0 to 1.2). It testifies to the fact of the presence of significant subpopulations, with shape close to spheric. Over 6 months after transplantation of cryopreserved thyroid gland in all the investigated populations the distribution curves manifest the decrease of cell specific density in the zone of low sphericity index, that testifies to the normalization of red blood cells' balance, which was impaired because of hormonal insufficiency at hypothyroidism. The results of patient's examination have shown that this normalization of distribution curves is associated with improvement of patients with hypothyroidism after transplantation of cryopreserved thyroid gland according to the data of clinical and hormonal investigation. The suggested method of determining the erythrocyte distribution density on the sphericity index may be an additional informative parameter of the patients' state during treatment.

Изменения показателей антиоксидантной активности и перекисного окисления липидов сыворотки крови

Е.В. СОМОВА, А.Д. РОШАЛЬ, Б.П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Changes in Indices of Antioxidative Activity and Lipid Peroxidation of Blood Serum

E.V. SOMOVA, A.D. ROSHAL, B.P. SANDOMIRSKY

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

В последние годы активно изучаются методы лечения, основанные на использовании озона. Несмотря на ряд публикаций о разнообразных биологических свойствах озона, влияние местного применения озонированного физиологического раствора (ОФР) изучено недостаточно.

Цель данной работы – изучение влияния озонированных растворов, экстракта плаценты (ЭП) официального на антиоксидантную активность и уровень перекисного окисления сыворотки крови крыс после холодового воздействия.

На крысах-самцах массой 200–250 г моделировали холодовые раны с помощью медного аппликатора диаметром 10 мм, охлажденного жидким азотом до температуры -196°C со временем аппликации 60 с. Озонированный физиологический раствор получали на сконструированной в ИПКиК НАН Украины установке с генератором озона безбарьерного типа путем барботирования озон-кислородной смесью (исходная концентрация озона в ОФР 1 мг/л). Растворы вводили подкожно в зону холодовой раны со 2-х по 14-е сутки эксперимента: ОФР через 10 мин после барботирования в объеме 1 мл; ЭП официальный (Р 12/9901311) с физиологическим раствором в соотношении 1:1 в объеме 1 мл. Через 30 мин осуществляли забор крови для проведения анализа.

Антиоксидантную активность (АОА) сыворотки крови исследовали методом индуцированной хемилуминесценции на спектрофлуориметре «Hitachi F4010», работающем в режиме хемилуминометра. Метод основан на способности фенилового эфира N-метилакридинийкарбоновой кислоты разлагаться под действием окислителей с образованием интенсивно флуоресцирующих производных N-метилакридона.

АОА исследовали в следующих группах:

- на 2-е сутки, 3-и и 16-е сутки после холодового воздействия (ХВ) и подкожного введения ОФР;
- на 16-е сутки после ХВ и введения ЭП;
- контрольные интактные животные.

В сыворотке крови определяли также интенсивность ПОЛ: спектрофотометрически на спектрофлуориметре «Hitachi F4010» по уровню продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), с применением бутанола. Забор крови у крыс для анализа ПОЛ осуществляли из хвостовой вены под ингаляционным эфирным наркозом.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили по методу Стьюдента - Фишера.

Подкожное введение крысам озонированных растворов с концентрацией 1 мг/л в течение 14 суток после моделирования криодеструкций привело к достоверному росту показателей АОА сыворотки крови по сравнению с интактными животными. В группе с введением ЭП подобный эффект не был обнаружен.

Recently the treatment methods based on ozone use have been actively studied. In spite of some publications on different biological properties of ozone, the effect of local application of ozonized physiological solution (OPS) was insufficiently studied.

The research aim was to investigate the effect of ozonized solutions, placenta extract pharmacopoeial (PE) on antioxidative activity and the level of lipid peroxidation of rat's blood serum after cold effect.

Cold wounds were modeled in male rats of 250–300 g weight using the 10mm' copper applicator cooled by liquid nitrogen down to the temperature of -196°C with the application time of 60 seconds. OPS was obtained with the designed at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine assembly with ozone generator of barrier-free type by means of bubbling with ozone-oxygen mixture (ozone initial concentration in OPS is 1 mg/l). The solutions were subcutaneously injected into the cold wound zone from the 2nd to 14th experimental days: OPS in 10 min after bubbling in the volume of 1 ml; PE pharmacopoeial (P 12/9901311) with physiological solution in 1:1 ratio in 1 ml volume. In 30 min the blood was procured for analysis.

Antioxidative activity (AOA) of blood serum was investigated by the method of induced chemiluminescence with Hitachi F4010 spectrofluorimeter functioning as chemiluminescence. Into the base of the method the ability of phenyl ether N-methylacridiniumcarbonyl acid for disintegrating under the effect of oxidizers with the formation of intensively fluorescing derivatives of N-methylacridone was laid.

AOA was examined in the following groups:

- to the 2nd, 3rd and 16th day after cold effect (CE) and after subcutaneous injection of OPS;
- to the 16th after CE and after subcutaneous injection of PE;
- control intact animals.

Additionally the LPO intensity was examined in blood serum spectrophotometrically with Hitachi F4010 spectrofluorimeter on the level of the products reacting with TBA using butanol. Blood procurement in rats for LPO analysis was done from tail vein using inhalation ether narcosis.

The obtained results were statistically processed with the Student-Fischer method.

Subcutaneous injection of ozonized solution with the concentrations of 1 mg/l for 14 days to the rats after modeling the cryodestruction resulted to a statistical and significant growth of AOA indices in blood serum if compared with intact animals. In the group with PE the similar effect was not found.

Разнонаправленное влияние К-среды от культуры опухолевых лимфоцитов на пролиферативную активность и выживаемость клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7), растущих в 2-D и 3-D культурах

Е.С. КОБЕЛЬСКАЯ, Е.М. ПЕРЕПЕЛИЦЫНА, Л.В. ГАРМАНЧУК, М.В. СИДОРЕНКО

Отделение биотехнических проблем диагностики

Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Киев

Multi-Directed Effect of K-Medium of Culture of Tumor Lymphocytes on Proliferative Activity and Survival of Mammalian Gland Adenocarcinoma Cells (MCF-7) Growing In 2D and 3D Cultures

E.S. KOBELSKAYA, E.M. PEREPELTSYNA, L.V. GARMANCHUK, M.V. SIDORENKO

Department of Biotechnical Problems of Diagnostics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Опухоли в системе *in vivo* представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, которая регулируется посредством гуморальных факторов, продуцируемых клетками в микроокружение.

Цель работы – исследование влияния лимфоцитов периферической крови на опухолевые клетки через систему цитокинов, выделяемых клетками в культуральную среду.

Многочелюстные сфероиды, являющиеся признанной моделью аваскулярной стадии развития опухоли, сравнивали с монослойной культурой. Показателями сравнения были выбраны пролиферация и выживаемость клеток аденокарциномы молочной железы, растущих в монослойной культуре (2D) и многочелюстных сфероидах (3D).

В результате исследования установлена разная реактивность и жизнеспособность клеток MCF-7 в монослое и опухолевых микросфероидах. Установлено, что в зависимости от типа роста клеток (в микросфероидах или монослое), их пролиферация и выживаемость при действии гуморальных факторов К-среды существенно отличаются. В монослое активируется пролиферация (на $17 \pm 3,1\%$, $p < 0,05$) и повышается выживаемость; при сфероидном росте – ингибируется пролиферация клеток и не изменяется выживаемость по сравнению с контролем.

Таким образом, реактивность клеток MCF-7 в ответ на гуморальные воздействия К-среды зависит от модели культивирования (монослой или сфероиды) и сроков культивирования. Полученные данные указывают на разнонаправленное влияние факторов гуморальной среды на пролиферативную активность и выживаемость опухолевых клеток при 2D и 3D росте: в монослое эти факторы выступают как митогены, при сфероидном росте, напротив, ингибируют пролиферацию. Клетки, достигнув плотного конfluence, вытесняются в суспензию. Для дальнейшего развития в микроагрегаты им, вероятнее всего, недостаточно гормональных, паракринных и конгломератообразующих стимулов, и клетки погибают. Для сформированных сфероеидов гуморального сигнала от МТ-4 достаточно для усиления пролиферации и выживаемости клеток.

В системе *in vitro* была апробирована модель опухолевого микроузла на аваскулярной стадии роста (микросфероиды) и система непрямого гуморального влияния клеток иммунной системы на выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток.

Tumours *in vivo* represent heterogeneous cell population, which is regulated by humoral factors produced by cells into microenvironment.

The research aim was to investigate the effect of lymphocytes of peripheral blood on tumour cells via the system of cytokines, released by cells into cultural medium.

Multi-cellular spheroids being the known model of avascular state of tumour development were compared with monolayer medium. The comparison indices were selected as proliferation and survival of the cells of mammalian gland adenocarcinoma, growing in monolayer cells (2D) and multi-cellular spheroids (3D).

In the research result there have been established the different reactivity and viability of MCF-7 cells in monolayer and tumour micro-spheroids. It has been found that depending on the growth type of cells (in microspheroids or in monolayer), their proliferation and survival when being affected by K-medium humoral factors significantly differ. In the monolayer the proliferation activates (by 17 ± 3.1 , $p < 0.05$) and survival increases; at spheroid growth: the proliferation of cells is inhibited and the survival is not changed if compared with the control.

Thus the reactivity of MCF-7 cells in response to humoral effect of K-medium depends on the culturing model (monolayer or spheroids) and culturing terms. The obtained data point to the multi-directed effect of the factors of humoral medium on proliferative activity and survival of tumour cells at 2D and 3D growth: in monolayer these factors act as mitogens, at spheroid growth vice versa they inhibit proliferation. The cells when they reach a dense confluent are displaced into the suspension. For their further development into microaggregates, the hormonal, paracrine and conglomerate-forming stimuli are likely insufficient and the cells die. For the formed spheroids the humoral signal from МТ-4 is sufficient for strengthening the cell proliferation and survival.

In the system *in vitro* there was approbated the model of tumour micro-node on avascular stage of growth (micro-spheroids) and the system of indirect humoral effect of immune system cells on survival and proliferation of tumour cells.

Зависимость жизнеспособности меристем чеснока от условий криоконсервирования

Т.Ф. СТРИБУЛЬ¹, Т.В. ИВЧЕНКО², Т.И. ВИЦЕНЯ², Н.А. ШЕВЧЕНКО¹, Ю.С. ЛЫСАК¹

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

²Институт овощеводства и бахчеводства УААН, г. Мерефа, Харьковская область

Dependence of Garlic Meristem Viability On Cryopreservation Conditions

T.F. STRIBUL¹, T.V. IVCHENKO², T.I. VYTSENYA², N.A. SHEVCHENKO¹, YU.S. LYSAK¹

¹Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine

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

Institute of Vegetable Farming and Mellow-Growing of Ukrainian Academy

of Agrarian Sciences, Merefá, Kharkov Region, Ukraine

Сорта чеснока народной селекции *Allium* L., имеющие высокий уровень популяционного полиморфизма, являются ценным источником генетического разнообразия и могут быть использованы для улучшения современных сортов. Актуальной задачей современного сельскохозяйственного производства является сохранение уникальных форм такого генетического разнообразия.

Наиболее перспективный и надежный способ долгосрочного сохранения генетических ресурсов растений – криоконсервирование в условиях низкотемпературных банков. В ряде стран мира (Польша, Чехия, Германия, Япония) существуют программы сохранения генетических коллекций представителей рода *Allium* L.

В работе исследуются условия подготовки, проведения криоконсервирования меристем чеснока озимого и ярового сортов, а также влияние данных условий на жизнеспособность меристем после размораживания.

Меристемы чеснока выделяли из зубков, находящихся в состоянии покоя, и помещали на питательную среду. Через сутки их обрабатывали растворами криозащитных сред – витрифицирующимися растворами PVS 3 и PVS 2. Исследовали новые композиции: PVS N (1 М сахарозы, 2 М глицерина и 2,5 М этиленгликоля на среде культивирования) и смесь 1 М пропиленгликоля (ПГ) с 7% поливинилпирролидоном на среде культивирования.

Контейнерами для замораживания служили пробирки Nunc или тонкостенные алюминиевые контейнеры объемом 0,1 мм³. Вид контейнера существенно определяет скорость замораживания объекта.

Замораживание проводили путем погружения контейнеров с меристемами либо в жидкий азот, либо в шугу азота.

В результате проведенных исследований показано, что жизнеспособность меристем чеснока существенно зависит от вида криозащитной среды и скорости замораживания. От этих факторов зависит не только процент выживших меристем, но и структура тканей, продуцируемых живой меристемой при культивировании ее после размораживания.

Показано, что использование в качестве криозащитных сред PVS 3 и PVS 2 зачастую приводит к калусообразованию. Наилучший криозащитный эффект получен при использовании PVS N, особенно в сочетании с быстрыми скоростями охлаждения. При этом сохраненные после размораживания меристемы давали одностебельные проростки, что гарантировано характеризует воссоздание исходного генотипа.

Garlic varieties of peoples' selection *Allium* L. with a high level of population polymorphism are the valuable sources of genetic variety and may be used for improving the contemporary varieties.

The most perspective and reliable method of long-term storage of plant genetic resources is cryopreservation in low-temperature banks. In some countries of the world (Poland, Czechia, Germany, Japan) there are programs for storing genetic collections of the representatives of *Allium* L.

In this paper there are studied the preparing and cryopreservation conditions of garlic meristems of winter and spring garlic varieties, as well as the effect of these conditions on viability of meristems after thawing.

Garlic meristems were derived from the bulbils being in quiescent state and placed into nutritive medium. In 24 hrs they were treated with the solutions of cryoprotective media: vitrifying solution PVS 3 and PVS 2. The new compositions PVS N (1M sucrose, 2 M glycerol and 2.5 M ethylene glycol in culturing medium) and the mixture of 1M propylene glycol (PG) with 7% polyvinyl pyrrolidone in culturing medium) have been studied.

Nunc vials or 0.1 mm³ thin-walled aluminum containers served as the ones for freezing. The container type significantly determined the object's freeing rate.

Freezing was performed by means of plunging the containers with meristems into either liquid nitrogen or nitrogen slush.

In the result of the performed studies it has been shown that viability of garlic meristems considerably depends on the type of cryoprotective medium and freezing rate. On these factors not only percentage of survived cells, but also the structure of tissues produced by a living meristem during its culturing after thawing are dependent.

The use of PVS 3 and PVS 2 as cryoprotective media has been demonstrated to result in callus-formation. The highest cryoprotective effect was obtained when using PVS N, especially in combination with rapid cooling rates. Herewith the preserved post-thaw meristems provided single-caulis seedling that characterizes for sure the recreation of initial gene type.

Микрогемоциркуляция печени при различных способах лечения экспериментального цирроза

И.В. СЛЕТА, Н.А. ЧИЖ, А.А. ОЛЕФИРЕНКО, Д.Г. ЛУЦЕНКО,

И.В. БЕЛОЧКИНА, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, Б.П. САНДОМИРСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Liver Microhemocirculation at Different Treatments of Experimental Cirrhosis

I.V. SLETA, N.A. CHIZH, A.A. OLIFERENKO, D.G. LUTSENKO,

I.V. BELOCHKINA, S.E. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY

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

Восстановление структуры и функции печени при ее диффузных поражениях (гепатит и цирроз) возможно только при адекватном кровоснабжении органа. Стимуляция ангиогенеза и оксигенация печени являются важнейшими задачами гепатологии.

Цель работы – оценить состояние микроциркуляции в цирротически измененной печени при различных способах стимуляции процессов репарации.

Эксперимент проведен на самцах крыс с CCl_4 -индуцированным циррозом печени. Для оптимизации восстановительных процессов в печени применяли криоденервацию *a. hepatica*, дозированную криогепатодеструкцию, а также введение экстрактов криоконсервированных фрагментов печени новорожденных поросят и селезенки свиней.

Микрогемоциркуляцию (МГЦ) печени исследовали методом прижизненной микроскопии с помощью контактного микроскопа Люмам К-1. Оценивали диаметр микрососудов, относительную площадь сосудов в поле зрения, а также фрактальную размерность D , интегрально характеризующую морфофункциональное состояние микроциркуляции печени. О кровенаполнении печени судили по концентрации люминесцентного красителя нафтоиленбензимидазола (НБИ) в гомогенате ткани.

Морфометрические исследования МГЦ показали, что криохирургические воздействия приводили на 14-е сутки к почти двукратному увеличению относительной площади сосудистого русла. При денервации *a. hepatica* увеличение относительной площади сосудистого русла наблюдалось уже через сутки, а увеличение объема артериального кровотока печени подтверждалось повышением концентрации НБИ (на 23% через 20 мин после криоденервации). Сочетание криодеструкции печени с введением тканевых экстрактов приводило к более выраженному ангиогенезу в печени по сравнению с их раздельным применением.

Размерность D , в норме составляющая $1,290 \pm 0,047$, при циррозе снижается до $1,210 \pm 0,017$. После различных вариантов воздействия происходит определенное повышение хаотичности системы, что проявляется в статистически достоверном увеличении размерности D . Мы предполагаем, что такие изменения связаны с запуском процессов регенерации в печени и восстановлением ее микроангиоархитектоники.

Recovery of liver structure and function at its diffuse impairments (hepatitis and cirrhosis) is possible only at adequate blood supply to the organ. Stimulation of angiogenesis and liver oxygenation are the most important tasks of hepatology.

The research aim was to estimate the state of microcirculation in cirrhotically changed liver under various ways of reparation stimulation.

The experiment was performed in male rats with CCl_4 -induced liver cirrhosis. To optimize the recovery processes in liver there was applied cryodeneration *a. hepatica*, dosed cryohepatodestruction, as well as introduction of the extracts of cryopreserved liver fragments of newborn piglets and pig's spleen.

Microhemocirculation (MHC) of liver was examined by the method of vital microscopy using contact microscope Lumam K-1. The diameter of microvessels, relative area of vessels in vision field, as well as fractal dimension D , which integrally characterizes morphofunctional state of liver microcirculation were assessed. Liver blood filling was judged on the concentration of luminescent dye, naphthabenzimidazole (NBI) in tissue homogenate.

Morphometric studies of MHC have shown that cryosurgical effects resulted to the 14th days to almost two-fold rise in relative area of vascular bed. At denervation of *a. hepatica* the increase of relative number of vascular bed was observed even in 24 hrs and rise in the volume of arterial liver blood flow was confirmed with the increase in NBI concentration (by 23% in 20 min after cryodeneration). Combined liver cryodestruction and introduction of tissue extracts led to more manifested angiogenesis in liver if compared with their separate application.

Dimension D in the norm comprising 1.290 ± 0.047 at cirrhosis reduces down to 1.210 ± 0.017 . After different variants of effect there is certain rise in chaotic system that is manifested in statistical and significant increase of dimension D . We believe that these changes are related to the triggering of regeneration processes in liver and recovery of its microangiarchitecture.

Витрификация стволовых клеток

А. ХЕЛБИГ, Я. НААЛДЖИК, А. ШТОЛЦИНГ

Институт клеточной терапии и иммунологии, Лейпциг, Германия

Vitrification of Stem Cells

A. HELBIG, Y. NAALDIJK, A. STOLZING

Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – мультипотентные клетки-предшественники, выделенные из костного мозга и способные к самообновлению. Показано, что МСК могут дифференцироваться во многие типы клеток: адипоциты, хондроциты, остеоциты, гепатоциты, кардиомиоциты и нейроны.

Мезенхимальные стволовые клетки можно сохранять с помощью криобиологических методов, скорость их пролиферации и остеогенный потенциал после размораживания остаются нормальными, что делает возможным их будущее использование уже при существующих терапевтических подходах. Эксперименты на животных по восстановлению поврежденных тканей (хрящ, кость, мышцы, мышцы сердца и связки) с использованием МСК показали их перспективность при лечении заболеваний человека.

Жизнеспособность клеток или тканей после криоконсервирования ниже таковой для свежих клеток и тканей. При криоконсервировании такие факторы, как флуктуация температуры при замораживании и оттаивании, сочетание криопротекторов приводят к повреждению клеток и тканей.

Диметилсульфоксид (ДМСО), один из наиболее используемых в клинической практике криопротекторов, является токсичным для клеток и вызывает побочные эффекты при введении пациенту. Поэтому было бы целесообразно полностью исключить ДМСО.

Цель исследования – определение способа криоконсервирования, сохраняющего стволовые клетки, повышающего их жизнеспособность и потенциал дифференцировки после замораживания, с использованием современных методов; идентификация новых комбинаций криопротекторов для минимизации токсичности и устранения необходимости отмывания ДМСО перед применением клеток.

Мы сравним классическое криоконсервирование и контролируемые методы замораживания с витрификацией, используя различные растворы криопротекторов.

Используя устройство CryoMed с контролируемой скоростью замораживания, мы можем применять в работе различные протоколы замораживания. После замораживания клеток в образцах мы будем определять выживаемость клеток, используя тест на окрашивание трипановым синим, измерять пролиферацию клеток с помощью стандартного теста МТТ, а также анализировать способность стволовых клеток к дифференцировке с помощью КОЕ-ф, количественной АЛФ и измерения метиленового синего.

Мы будем использовать МСК человека/крысы и фибробласты. Эксперименты будут проводиться на клетках между 2-м и 4-м пассажами. Будут сравниваться различные криопротекторы, проникающие в клетку (ДМСО, глицерин, пропандиол) и непроникающие (пропиленгликоль и этиленгликоль).

Установлены и проверены специальные протоколы для различных типов клеток. Мы смогли определить протоколы, исключаяющие необходимость отмывания и использования сыворотки в криосредах, что повысит успешность трансплантаций и уменьшит осложнения и побочные эффекты.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells isolated from the bone marrow and they have the capacity for self-renewal. MSCs have been shown to be capable of differentiating into multiple cell types such as adipocytes, chondrocytes, osteocytes, hepatocytes, cardiomyocytes and neurons.

MSCs can be preserved by cryopreservation and their proliferation rate and osteogenic potential seems to be normal after thawing, thus allowing for future “off-the-shelf” therapy approaches. Animal trials looking at reconstitution of damaged tissues such as cartilage, bone, muscle, heart muscle and tendon using MSCs have shown great promises for the use in human treatment.

Cell or tissue viability after cryopreservation is lower compared to fresh cells and tissues. Several factors interfere with cryopreservation leading to cell and tissue damage such as, fluctuation in the temperature during the freezing and thawing of the cells, use of inadequate cryoprotectant combinations.

Absence of the cryoprotectant DMSO (dimethylsulfoxide), one of the most used cryoprotectant known in clinical applications, is toxic for the cell and causes side effects when injected into patient. It would be very useful if DMSO could be eliminated completely.

The aim of our study is to determine a cryopreservation method to conserve stem cells and to improve their viability and differentiation potential after freezing using current methods. New cryoprotectant mixtures need to be identified in order to minimize toxicity and to eliminate the need for washing off the DMSO before transfer into a patient.

Classical cryopreservation and controlled freezing methods will be compared to vitrification using different cryoprotectant solutions.

By using the controlled rate freezing machine from CryoMed we are able to work with different freezing protocols. After freezing the cells, assays will be performed to determine cell viability using the trypan blue assay, measure cell proliferation by MTT assay, and the ability of the stem cells to differentiation will be analyzed by CFU-f and quantitative ALP and methylene blue measurement.

We will use human/rat MSC and fibroblasts. Experiments will be performed using cells between passage 2 and 4. Different cryoprotectants penetrating cells (DMSO, glycerol, propandiol) and non-penetrating (propylene glycol and ethylene glycol) will be compared.

Specific protocols for the different cells types were established and tested. We were able to set up protocols eliminating the need for washing and use of serum in the cryomedia. This will improve the transplantation success in patients and minimize complications and side effects.

Модификация мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов животных под действием факторов низкотемпературного воздействия

О.Н. ДЕНИСОВА¹, Н.Г. ЗЕМЛЯНСКИХ², Л.А. БАБИЙЧУК², Г.Ф. ЖЕГУНОВ¹

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия

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

Modification of Membrane-Cytoskeletal Complex of Erythrocytes of Animals Under Low-Temperature Factor's Effect

O.N. DENISOVA¹, N.G. ZEMLYANSKIKH², L.A. BABIICHUK², G.F. ZHEGUNOV¹

¹Kharkov State Zooveterinary Academy

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Изменение параметров среды под влиянием физико-химических факторов, сопутствующих процессу криоконсервирования, может привести к модификации плазматических мембран, структурная целостность которых поддерживается слабыми взаимодействиями между липидной и белковой компонентами мембран.

Цель работы – изучение модификации белок-белковых взаимодействий в мембрано-цитоскелетном комплексе эритроцитов в процессе криоконсервирования.

Исследование мембрано-цитоскелетного комплекса нативных эритроцитов лошади, быка и собаки методом электрофореза в полиакриламидном геле показало, что общая картина белкового спектра очень похожа у всех видов исследуемых млекопитающих. Однако имеется ряд видовых отличий, в частности, отмечен дефицит белков полос 4.2 и 6 в эритроцитах лошади. Вместе с тем в эритроцитах лошади в большем количестве присутствуют белки полос 4.9 и 7. Для изучения структурных изменений, возникающих в цитоскелетной белковой сети в результате охлаждения, использовали белок-сшивающий реагент – диамид. Инкубация эритроцитов в растворе ПЭГ-1500 и ДМСО приводит к некоторому нарушению пространственного расположения белков цитоскелета, в результате чего возникают доступные для диамида SH-группы. При этом появляются полосы белковых агрегатов молекулярной массы ~1000 кДа. Отмечено изменение содержания белков в отдельных фракциях: в частности, снижается содержание спектрина, анкирина, белков полос 4.2, 4.9 и 5; происходит полная потеря белков полос 6 и 8. В ряде случаев формирование сшивок между белками может стабилизировать клетку в неблагоприятных для жизнедеятельности условиях. Модификации мембрано-цитоскелетного комплекса выражены сильнее для эритроцитов, криоконсервированных под защитой ПЭГ-1500. По-видимому, более выраженный эффект диамида на клетки, криоконсервированные с ПЭГ-1500 по сравнению с ДМСО, определяется различными механизмами действия данных криопротекторов, поскольку ПЭГ-1500 относится к соединениям экзоцеллюлярного, а ДМСО – эндоцеллюлярного типа действия.

Alteration of medium parameters under the effect of physical and chemical factors, accompanying cryopreservation process, may lead to modification of plasma membrane, structural integrity of which is maintained with quite weak interactions between lipid and protein components of membrane. The research aim was to study the modification of protein-protein interactions in membrane-cytoskeletal complex of erythrocytes during cryopreservation.

Investigation of membrane-cytoskeletal complex of native equine, bovine and canine erythrocytes with electrophoresis method in polyacrylamide gel has shown that the general picture of protein spectrum is very similar for all the mammalian species studied. However, there are some species' differences, in particular, there was found the deficiency of band 4.2 and 6 proteins in equine erythrocytes. Along with this in equine erythrocytes in a bigger amount there are band 4.9 and 7 proteins. To study the structural changes appearing in cytoskeletal protein net as a result of cooling, the diamide, protein cross-linking reagent was used. Incubation of erythrocytes in PEG-1500 and DMSO results in an impairment of spatial location of cytoskeleton proteins, resulting in the appearance of diamide-susceptible SH-groups. Herewith the bands of protein aggregates of molecular mass ~1,000 kDa appear. There was noted the change of protein content in some fractions: in particular, the content of spectrin, ankyrin, band 4.2, 4.9 and 5 proteins is reduced, as well a complete loss of band 6 and 8 proteins takes place. In some cases the formation of cross-linking may stabilize cell under unfavorable for vital activity conditions. Modifications of membrane-cytoskeletal complex are manifested stronger for erythrocytes, cryopreserved with PEG-1500. More manifested effect of diamide on the cells cryopreserved with PEG-1500 if compared with DMSO is likely determined with different mechanisms of effect of these cryoprotectants, since PEG-1500 is referred to the compounds of exocellular effect type and DMSO is an endocellular action compound.

Исследование метаболитов энергетического обмена в клетках костного мозга собак после криоконсервирования

Л.А. ВОДОПЬЯНОВА, Г.Ф. ЖЕГУНОВ

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Investigation of Metabolites of Energy Metabolism in Canine Bone Marrow Cells After Cryopreservation

L.A. VODOPYANOVA, G.F. ZHEGUNOV

Kharkov Zooveterinary Institute, Ukraine

Использование клеток костного мозга (ККМ) в лечении нарушений гемопоэза является перспективным способом терапии домашних животных. Однако при хранении *in vitro* в ККМ истощаются запасы энергетических субстратов: гликогена, глюкозы, в то же время накапливаются метаболиты, например молочная кислота, играющие негативную роль в жизнедеятельности и функционировании клеток. Низкотемпературное консервирование ККМ под защитой криопротекторов решает проблему хранения биоматериала до трансплантации, однако процессы образования и использования энергии в ККМ после криовоздействия мало изучены.

Замораживание проводили с криопротекторами, обеспечивающими лучшую сохранность ККМ собак при замораживании: диметилсульфоксид (ДМСО в концентрации 7 и 10%) и полиэтиленоксид-400 (ПЭО-400 в концентрации 10 и 15%). Для характеристики интенсивности энергетического обмена после замораживания-отогрева ККМ собак под защитой криопротекторов использовали определение концентраций ряда метаболитов: глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), АТФ, пирувата (ПВК) и лактата.

Проведенные исследования показали, что после экспозиции и замораживания-отогрева ККМ собак в криозащитных средах, содержащих ДМСО и ПЭО-400, уровень АТФ несколько снижается, при этом наблюдается повышение уровня Г-6-Ф в ККМ собак в сравнении с данным показателем в контроле, что, вероятно, отражает повышение затрат энергии и рост функциональной активности ККМ собак после замораживания-отогрева.

После криоконсервирования в ККМ собак в присутствии указанных криопротекторов уровень ПВК повышается относительно контроля, что, видимо, связано с интенсификацией обменных процессов. При этом уровень молочной кислоты в ККМ собак хотя и повышается в сравнении с показателями контроля, но такое повышение незначительно отличается от показателей в ККМ после экспозиции (30 мин) с криопротекторами до замораживания.

Таким образом, исследование метаболитов энергетического обмена в деконсервированных ККМ собак свидетельствует о сохранении энергетического обмена на уровне, близком к контролю.

Application of bone marrow cells (BMC) in treatment of hemopoiesis damages is the perspective therapy method of domestic animals. However during storage *in vitro* in BMC the stocks of energetic substances exhaust: glucose, glycogen, at the same time metabolites are accumulated, for example, lactic acid, playing a negative role in cell action and function. Low temperature storage of BMC under protection of cryoprotectants solves a problem of biomaterial storage before transplantation, however formation and application of energy in BMC after cryoexposure have been studied slightly.

Freezing was carried out with cryoprotectants providing the highest integrity of canine BMC at freezing: dimethylsulfoxide (7 and 10% DMSO) and 400 polyethylene oxide (10 and 15% PEO-400). For characteristic of intensity of energy metabolism after freeze-thawing of canine BMC under protection of cryoprotectants we applied the determination of metabolite series concentrations: glucose-6-phosphate (G-6-P), ATP, pyruvate (PVA) and lactate.

The carried out researches have shown, that after exposure and freeze-thawing of canine BMC in cryoprotective media, containing DMSO and PEO-400, ATP level reduces a little, herewith the increasing of G-6-P level in canine BMC is observed, in comparison with this index in the control, that probably, indicates the increase of energy consumption and growth of functional activity of canine BMC after freeze-thawing.

After cryopreservation in canine BMC in presence of these cryoprotectants, PVA level increases in respect of the control that probably is associated with intensification of metabolic processes. Though at this the level of lactic acid in canine BMC increases in comparison with the control indices, but this increase is insignificantly different from the indices in BMC after exposure (30 min) with the cryoprotectants before freezing.

Thus, the metabolite research of energy metabolism in frozen-thawed canine BMC testifies to the preservation of energy metabolism at the level close to the control.

Криоконсервирование эритроцитов и клеток костного мозга домашних животных

Г.Ф. Жегунов¹, О.Н. Денисова¹, Л.А. Водопьянова¹, Л.А. Бабичук², Н.Г. Землянских²

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия

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

Cryopreservation of Erythrocytes and Bone Marrow Cells of Domestic Animals

G.F. ZHEGUNOV¹, O.N. DENISOVA¹, L.A. VODOPYANOVA¹, L.A. BABIYCHUK², N.G. ZEMLYANSKIKH²

¹Kharkov Zooveterinary Institute

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

Исследовали действие различных криопротекторов и замораживания-отогрева на клетки костного мозга и эритроциты домашних животных. Показано, что замораживание-отогрев без криопротекторов существенно повреждает клетки и делает их негодными для трансфузии. Установлено, что наиболее эффективным криопротектором для эритроцитов лошади, быка, собаки оказался ДМСО, который не только обеспечивает приемлемый уровень потери клеток после замораживания-отогрева, но и сохраняет осмотическую устойчивость клеток. Глицерин и ПЭО-400 оказались менее эффективными. Установлено, что в условиях замораживания до -196°C эритроцитов экспериментальных животных ПЭО-1500 обеспечивает сохранность клеток $\sim 95\%$, ДМСО $\sim 75\%$, а глицерин – менее 25% (в зависимости от видовой принадлежности клеток).

Оценка проницаемости мембран для криопротекторов показала, что более высокая криозащитная эффективность ДМСО по сравнению с глицерином согласуется с его более высокой проникающей способностью. Эритроциты, криоконсервированные с ДМСО, проявляют высокую устойчивость в модели трансфузии (сохранность $\sim 90\text{--}95\%$) с сохранением осмотической хрупкости на уровне контроля. При сравнении исследованных клеток животных эритроциты лошади оказались менее устойчивыми к криоконсервированию под защитой криопротекторов и осмотическим изменениям среды, а эритроциты собаки – наиболее устойчивыми. Криоконсервирование эритроцитов млекопитающих с ДМСО позволяет сохранить содержание АТФ и 2,3-ДФГ на уровне контроля, а после замораживания клеток под защитой ПЭО-1500 наблюдается достоверное снижение концентрации данных метаболитов через 24 ч в модели трансфузии.

Установлено, что сохранность клеток костного мозга собак, замороженных в жидком азоте без криопротекторов, очень мала, что подтверждает необходимость использования криозащиты. Все использованные криопротекторы проявили защитное действие, сохраняя до 70% клеток костного мозга собак. Наиболее эффективным был ДМСО, обеспечивающий наибольшую сохранность клеток после криоконсервирования (до 90%). Недифференцированные клетки костного мозга, замороженные под защитой криопротекторов, имеют почти 100%-ю сохранность. Немного меньше этот показатель у ретикулярных клеток, промиелоцитов и клеток лимфоцитарного ряда. Большой спектр клеток костного мозга после криоконсервирования сохраняется под защитой ДМСО в 7 и 10%-й концентрации и ПЭО-400. Слабую стойкость к криоконсервированию, даже под защитой использованных криопротекторов, имеют полихроматофильные эритроциты и оксифильные нормоциты. Клетки мегакариоцитарного ряда не сохраняются вообще. Сегментоядерные клетки и макрофаги сохраняются только в присутствии 7 и 10%-го ДМСО. Процессы инкубации и замораживания-оттаивания приводят к снижению количества гликогена в клетках костного мозга собак. Наибольшее количество гликогена сохранялось после криоконсервирования с 7 и 10%-м ДМСО, 10 и 15%-м ПЭО-400.

The effect of different cryoprotectants and freeze-thawing on domestic animal bone marrow cells and erythrocytes was investigated. It has been shown that freeze-thawing without cryoprotectants highly damages cells and makes them unsuitable for transfusion. It has been established that the most efficient cryoprotectant is DMSO for equine, bovine, canine erythrocytes, providing not only proper level of cell loss after freeze-thawing, but preserves the osmotic cell resistance. Glycerol and PEO-400 are less effective. It has been established that under freezing conditions down to -196°C of experimental animal erythrocytes PEO-1500 provides 95% cell survival, 75% DMSO and less than 25% glycerol (according to cell specificity).

Membrane penetration evaluation for cryoprotectants has shown, that most high cryoprotective DMSO efficiency in comparison with glycerol confirms with its higher penetration ability. Erythrocytes cryopreserved with DMSO, exhibit high resistance in transfusion model (90–95% integrity) with preservation of osmotic fragility at the control level. When comparing the investigated animal cells the equine erythrocytes were less resistant to cryopreservation under protection of cryoprotectants and osmotic changes of media, but canine erythrocytes were the most resistant. The cryopreservation of mammalian erythrocytes with DMSO enables to preserve the ATP and 2,3-DPG content at the control level, but after cell freezing under PEO-1500 protection the significant decreasing of concentration of these metabolites in 24 hrs in transfusion model is observed.

It has been established that cell integrity of canine bone marrow, frozen in liquid nitrogen without cryoprotectants, is very low, that confirms the application necessity of cryoprotection. All used cryoprotectants exhibited the protective activity, preserving up to 70% cells of canine bone marrow. The most effective was DMSO, providing the highest cell integrity after cryopreservation (up to 90%). The nondifferentiated cells of bone marrow, frozen under protection of cryoprotectants have quite 100% integrity. This index in reticular cells, promyelocytes and cells of lymphocyte series is slightly low. Wider cell spectrum of bone marrow after cryopreservation preserves under protection of DMSO under 7, 10% concentration and PEO-400. Low resistance to cryopreservation even under protection of used cryoprotectants is in the polychromatocytes and oxyphil normocytes. Cells of megakaryocyte series are not preserved at all. The segmented cells and macrophages are preserved only in the presence of 7, 10% DMSO. The incubation and freeze-thawing result in decreasing of glycogen amount in the cells of canine bone marrow. The highest glycogen amount was preserved after cryopreservation with 7, 10% DMSO and 10, 15% PEO-400.

Изучение криозащитного действия холинхлорида при замораживании лейкоцитов до -40°C

О.О. ЗАЙЦЕВА¹, Е.П. СВЕДЕНЦОВ¹, О.Н. СОЛОМИНА¹, Т.В. ТУМАНОВА¹,

Г.А. НИКУЛИНА¹, С.В. УТЕМОВ², А.А. КОСТЯЕВ², Ф.С. ШЕРСТНЕВ²

¹Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

²Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Study of Choline Chloride Cryoprotective Effect Under Leukocyte Freezing Down to -40°C

O.O. ZAJTSEVA¹, E.P. SVEDENTSOV¹, O.N. SOLOMINA¹, T.V. TUMANOVA¹,

G.A. NIKULINA¹, S.V. UTEMOV², A.A. KOSTYAEV², F.S. SHERSTNEV²

¹Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural Division of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

²Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В современной криобиологии актуальным остается поиск новых веществ, обладающих криозащитными свойствами. При замораживании эритроцитов крови человека до -196°C по быстрой и медленной линейной программам Гулевским А.К. и соавт. (1987 г.) проведено исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов холинхлорида и его криозащитных свойств. Авторы предложили применять данное вещество как дополнительный ингредиент в составе криозащитных сред для повышения их эффективности.

Цель работы – изучение криозащитных свойств холинхлорида при замораживании ядерных клеток крови до умеренно низкой температуры (-40°C) по экспоненциальному режиму.

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов, выделенный из цельной донорской крови путем цитофереза. Среднее количество биообъекта составляло $18,2 \pm 5,3$ мл. Клетки смешивали в соотношении 1:1 с криозащитным раствором в пластиковом контейнере “Компопласт 300” и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин. Использовали 2 криозащитных раствора: 1-й включал только эндоцеллюлярный криопротектор 1,2-пропандиол (ПД) в конечной концентрации 21%; 2-й – дополнительно холинхлорид в конечной концентрации 1%. Замораживание клеток производили по медленной трехэтапной программе сначала в спиртовой (96°) ванне камеры электроморозильника “Криостат”, охлажденной до -28°C в течение 15 мин, затем в морозильнике на -40°C . Быстрое размораживание биообъекта осуществляли через сутки в 20-литровой водяной ванне, нагретой до 38°C в течение 45–60 с (в зависимости от объема биообъекта) при интенсивном покачивании контейнера.

Результаты исследований показали, что при замораживании лейкоцитов с раствором 1 количество лейкоцитов после их отогрева составило $67,2 \pm 16,1\%$ от исходного уровня, а с раствором 2 – достоверно ($p < 0,05$) больше ($89,6 \pm 9,2\%$). При анализе лейкоформулы в опытах с раствором 1 количество гранулоцитов также было достоверно ниже, чем в опытах с раствором 2, и составило $39,2 \pm 9,8$ и $77,9 \pm 11,2\%$ соответственно. Оценить фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) стало возможно только в опытах с раствором, содержащим холинхлорид. Она наблюдалась у $66,4 \pm 5,2\%$ отогретых нейтрофилов. В опытах, содержащих только ПД, определить ФАН не удалось в связи с быстрым разрушением клеток после размораживания. Таким образом, применение холинхлорида совместно с основным криопротектором существенно повышает эффективность замораживания лейкоцитов до -40°C по экспоненциальному режиму.

The search for new substances with cryoprotective properties has remained to be actual in current cryobiology. When freezing human erythrocytes down to -196°C with rapid and slow linear programs [Gulevsky A.K. et al., 1987] there were studied the phase transitions and physical states of choline chloride aqueous solutions and its cryoprotective properties. The authors have proposed to apply this substance as an additional ingredient as a part of cryoprotective media to increase their efficiency. This research was aimed to study the choline chloride cryoprotective properties when freezing blood nucleated cells down to a moderately low temperature (-40°C) by an exponential regimen.

Leukocyte concentrate, isolated from the whole donor blood by cytopheresis, served as the research object. An average number of bioobject was 18.2 ± 5.3 ml. Cells were mixed with cryoprotective solutions in 1:1 ratio in “Komplast 300” plastic container and exposed at room temperature for 20 min. We have used 2 cryoprotective solutions: the 1st one comprised only 1,2-propanediol (PD) endocellular cryoprotectant in 21% final concentration; the 2nd one did an additional choline chloride in 1% final concentration. Cells were frozen by a slow three-step program primarily in alcohol (96°) bath of “Kriostat” electric freezer chamber, cooled down to -28°C for 15 min, then in a freezer at -40°C . Rapid thawing of bioobject was realized one day later in 20 l water bath, heated up to 38°C for 45–60 sec (depending on bioobject’s volume) under intensive container shaking.

Research results have demonstrated that under freezing of leukocytes with the 1st solution, their number after thawing was $67.2 \pm 16.1\%$ of an initial level, and with the 2nd one it was statistically and significantly ($p < 0.05$) higher ($89.6 \pm 9.2\%$). When analysing leukoformula in trials with the 1st solution the granulocyte number was also statistically and significantly lower, than in those with the 2nd solution and made 39.2 ± 9.8 and $77.9 \pm 11.2\%$, correspondingly. The estimation of neutrophil phagocyte activity (NPA) occurred to be possible only in trials with choline chloride-containing solution. NPA was observed in $66.4 \pm 5.2\%$ of thawed neutrophils. In the trials, containing only PD, the NPA determination failed due to a rapid cell destruction after freeze-thawing. Thus, the choline chloride application together with the main cryoprotectant significantly increases the efficiency of leukocyte freezing down to -40°C by exponential regimen.

**Перспективность использования комбинированных криопротекторов
при замораживании компонентов крови одноступенчатым
способом при температуре -196°C**

Е.М. КОРНИЕНКО¹, В.А. БОНДАРЕНКО²

¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

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

**Perspective in Using Combined Cryoprotectants During Blood Component
Freezing by One-step Method at -196°C**

E.M. KORNIENKO¹, V.A. BONDARENKO²

¹V.N.Karazin Kharkov National University

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

Исследование криобиологической эффективности комбинированных сред, включающих проникающие (ДМСО, 1,2-ПД) и непроникающие (декстран М 10000 и ПЭГ М 2000) криопротекторы, представляет существенный интерес. Непроникающие криопротекторы образуют вокруг клетки диффузионный слой и препятствуют росту кристаллов во внеклеточной среде. Применение проникающих криопротекторов приводит к торможению роста кристаллов льда внутри клетки и эффективному связыванию воды внутри клеток.

Были исследованы концентрационные ряды (5, 10, 12, 15, 20, 25, 30 %) ДМСО, 1,2-ПД, декстран, ПЭГ, а также среды, включающие комбинации проникающих и непроникающих криопротекторов. Установлено, что при повышении концентрации проникающих криопротекторов изоосмотический лизис клеток проявляется при достаточно высоких концентрациях криопротекторов (30% и более). Были выбраны оптимальные концентрации комбинаций криопротекторов: ДМСО-декстран; ДМСО-ПЭГ; 1,2-ПД-декстран; 1,2-ПД-ПЭГ, в которых токсический эффект проникающих криопротекторов не проявлялся. Применение комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов позволило при быстрых скоростях замораживания-отогрева получить более высокие значения сохранности эритроцитов. Оптимальные концентрации криопротекторов соответствовали осмолярности среды 0,8 Осмоль.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение комплексов криопротекторов в сравнении с однокомпонентными растворами последних приводит к более высоким значениям сохранности эритроцитов, что подтверждается биохимическими исследованиями уровня МДА, восстановленного глутатиона, а также активности глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы.

Of great interest is to study the cryobiological efficiency of combined media, including penetrative (DMSO, 1,2-PD) and non-penetrative (dextran M 10000 and PEG M 2000) cryoprotectants. Non-penetrative cryoprotectants form a diffusive layer around a cell and prevent crystal growth in extracellular medium. Application of penetrative cryoprotectants results in ice crystal growth inhibition inside a cell and an efficient water binding inside cells. The concentration series (5, 10, 12, 15, 20, 25, 30%) of DMSO, 1,2-PD, dextran, PEG as well as the media, comprising the combinations of penetrative and non-penetrative cryoprotectants, have been under study. When increasing the penetrative cryoprotectant concentrations the isoosmotic cell lysis was established as manifesting under quite high concentrations of cryoprotectants (30% and higher). There were selected the optimal concentrations of cryoprotectant combinations such as: DMSO-dextran; DMSO-PEG; 1,2-PD-dextran; 1,2-PD-PEG, where no toxic effect of penetrative cryoprotectants was manifested. The application of penetrative and non-penetrative cryoprotectant combination enabled under more rapid freeze-thawing rates to obtain higher values of erythrocyte integrity. The optimal cryoprotectant concentrations corresponded to 0.8 Osmol medium osmolarity.

The data obtained testify to the fact that the application of cryoprotectant complexes results in higher values of erythrocyte integrity, if comparing with mono-component cryoprotectant solutions, that is confirmed by biochemical studies of MDA level, reduced glutathione, as well as glutathione reductase and glutathione peroxidase activities.

Замедление темпа необратимой возрастной атрофии тимуса с помощью аутотрансплантации длительно криоконсервированной вилочковой железы

А.В. КУЛИКОВ^{1,4}, Г.Н. СМЕРНОВА¹, Л.В. АРХИПОВА¹, Д.А. КУЛИКОВ², Н.В. ШИШОВА³

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино

²Военно-медицинская Академия им. С.М.Кирова, г. С.-Петербург

³Институт биофизики клетки, г. Пушкино

⁴НИИ прикладной биологии, г. Москва

Slowing-down of Irreversible Age Thymus Atrophy Rate by Means of Auto-Transplantation of Long-Lastingly Cryopreserved Thymus

A.V. KULIKOV^{1,4}, G.N. SMIRNOV¹, L.V. ARKHIPOVA¹, D.A. KULIKOV², N.V. SHISHOVA³

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences, Puschino, Russia

²S.M. Kirov's Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

³Institute of Cell Biophysics, Puschino, Russia

⁴R&D Institute of Applied Biology, Moscow, Russia

Разработан новый способ замедления темпа необратимой возрастной атрофии тимуса. Часть тимуса у 1-месячных крыс вырезали и подвергали длительной (4,5 и 6,5 месяцев) криоконсервации, затем аутотрансплантаты пересаживали животным в жировую клетчатку и через 3,5 месяца животных исследовали по ряду гематологических, физиологических и иммунологических показателей. Выявлено, что одним из способов лечения миастении является удаление тимуса, собственный “молодой” тимус с высоким пролиферативным потенциалом может оказать весьма серьезную поддержку организму в зрелом и старческом возрасте.

Исследованные гематологические показатели (количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, количество тромбоцитов) достоверно не отличаются от этих показателей в контрольной группе животных, а количество лейкоцитов смещено в сторону более молодых животных, что может свидетельствовать об отсутствии в организме явных патологических изменений, связанных с трансплантацией клеток тимуса.

Известно, что с возрастом концентрация ФНО- α и ИЛ-2 снижается. Как показали наши исследования, концентрация ФНО- α в крови у опытной группы животных после аутотрансплантации ткани тимуса почти вдвое выше, чем в контрольной. Концентрация интерлейкина-2 также достоверно выше в опытной группе крыс. Другими словами, наблюдается “омоложение” организма по этим показателям.

Количество тимоцитов в собственной вилочковой железе после аутотрансплантации длительно криоконсервированных тимоцитов в жировую клетчатку увеличилось более чем в 2 раза у 9 и 10,5-месячных животных, т.е. в результате аутотрансплантации происходит “омоложение” Т-клеточного звена иммунологической системы организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №07-04-12048 и программы президиума РАН “Поддержка инноваций” 2006, 2007).

New method for slowing-down of the rate of irreversible age thymus atrophy has been developed. The part of thymus of 1-month's rats was isolated and subjected to long-lasting cryopreservation (4.5 and 6.5), afterwards the autotransplants were grafted to the animals into the fat and in 3.5 months the animals were examined on some hematological, physiological and immunological indices. The studies have demonstrated that one of the ways to treat myasthenia is thymus removal, the own “young” thymus with high proliferative potential may be quite serious support to mature and aged organisms.

The studied hematological indices (number of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, average volume of erythrocytes, average content of hemoglobin in erythrocyte, number of platelets) do not statistically and significantly differ from the ones in the control group of animals, and number of leukocytes is shifted towards younger animals, testifying to the absence in an organism of evident pathological changes, related to transplantation of thymus cells.

It is known that with age the concentration of TNF- α and IL-2 reduces. As our studies have shown the concentration of TNF- α in blood of experimental group of animals after auto-transplantation of thymus tissue is almost twice higher than in the control. Interleukin-2 concentration is also statistically and significantly higher in experimental group of rats. By other words, there is observed the “rejuvenation” of an organism on these indices.

Number of thymocytes in own thymus after autotransplantation of long-lastingly cryopreserved thymocytes in fat increased more than twice in 9-months' animals as well as in 10.5-months' ones, i.e. in the result of autotransplantation the “rejuvenation” of T-cell link of immunological system of an organism take place.

The research was financially supported by Russian Foundation for Basic Research (the project N 07-04-12048, as well as by the Program of Russian Academy of Sciences' Presidium “Supporting of Innovations”, 2006, 2007).

Свободнорадикальное окисление липидов мембран сперматозоидов птиц под воздействием криопротекторов в условиях гипотермии

И.Н. МАРТЫНЮК¹, С.Е. ОВСЯННИКОВ¹, Т.П. ЛИННИК¹, А.Б. АРТЕМЕНКО²

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

²НИИ птицеводства УААН, с. Борки

Lipid Peroxidation of Avian Sperm Membranes under Hypothermia and Cryoprotectant Effect

I.N. MARTYNYUK¹, S.E. OVSYANNIKOV¹, T.P. LINNIK¹, A.B. ARTEMENKO²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Poultry Breeding, Borki, Ukraine

Проникающие криопротекторы (КП) ряда амидов и диолов широко применяются в практике криобиологии, в частности при криоконсервировании спермы птиц. Но все они неиндифферентны по отношению к клеткам и еще на этапе экспозиции до замораживания оказывают воздействие на физико-химические и функциональные свойства цитоплазматических, акросомальных и митохондриальных мембран спермиев, изменяют активность ферментов.

Известно, что одним из повреждающих факторов могут быть активные формы кислорода и свободные радикалы ненасыщенных жирных кислот. В то же время в низких концентрациях они выполняют регуляторную роль в физиологических процессах: сигнальной трансдукции, акросомальной реакции и капацитации.

В данной работе изучено влияние химической структуры двух гомологических рядов КП: формамида (ФА), N,N-диметилформида (ДМФА), N,N-диметилацетида (ДМАЦ), этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 2,3-бутандиола (2,3-БД) на интенсивность свободнорадикального окисления липидов (СРО) мембран спермиев петухов в условиях гипотермии.

Содержание гидроперекисей липидов и оснований Шиффа в эякулятах петухов, хранившихся 24 часа в условиях гипотермии (0°C), определяли после их 30-минутной эквilibрации со всеми вышеперечисленными КП при 25°C. Контролем служила нативная сперма.

Установлено, что ни один из исследованных КП не вызывал повышения содержания продуктов СРО по сравнению с контролем. Более того, 2,3-БД и ДМФА обладали определенным антиоксидантным эффектом. Подобная закономерность наблюдалась как на сперме, неиндуцированной прооксидантами, так и после индукции реакции СРО гидроперекисью водорода.

Ранее было показано, что некоторые исследованные КП обладают достаточно высокой способностью к перехвату гидроксильного радикала в модельных системах. Можно предположить, что и выявленный антиоксидантный эффект КП в сперме птиц развивается по этому же механизму.

Таким образом, исследованные КП не оказывают прооксидантного действия на спермии петуха в постгипотермический период, поэтому могут использоваться как перспективные компоненты криозащитных сред для криоконсервирования спермы птиц.

Penetrating cryoprotectants (PCs) of amides and diols series have been used widely in practical cryobiology, particularly, at cryopreservation of avian sperm. But they all are not indifferent in relation to the cells and even at exposure stage prior to freezing affect physical, chemical and functional properties of cytoplasmic, acrosomal, mitochondrial spermatozoa membranes, change the enzyme activity.

It has been known that one of the damaging factors may be reactive oxygen species and free radicals of unsaturated fatty acids. At the same time under low concentrations they carry out the regulative role in physiologic processes: signal transduction, acrosomal reaction, and capacitation.

In this work the effect of chemical structure of two homologous series of PCs: formamide (FA), N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-dimethyl acetamide (DMAC), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD), 2,3-butanediol (2,3-BD) on the intensity of lipid peroxidation (LP) of membranes of fowl spermatozoa at hypothermia conditions have been studied.

The content of lipid hydroperoxides and Schiff's bases in the fowl ejaculates, stored for 24 hrs at hypothermia (0°C) was determined after their 30 min equilibration with all above listed PCs at 25°C. The control was native sperm.

It has been established that one of the investigated PCs did not trigger the increase of LP products content in comparison with the control. In addition, 2,3-BD and DMFA had the special antioxidant effect. The same regularity was observed not only for sperm, non-induced with prooxidants, but also after the induction of LP reaction with hydrogen hydroperoxide.

It has been shown previously, that some investigated PCs have quite a high capacity to interception of hydroxyl radical in model systems. So, one may suggest that the revealed antioxidant effect of PCs in avian sperm develops under this mechanism.

So, investigated PCs have no prooxidant effect on fowl spermatozoa at posthypothermic period, herewith they may be used as the perspective components of cryoprotective media for cryopreservation of avian sperm.

Индуктивное и радиозащитное действие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток тимуса

И.С. НИКОЛЬСКИЙ, В.В. НИКОЛЬСКАЯ, Г.М. БУТЕНКО

Институт генетической и регенеративной медицины АМН Украины, г. Киев

Inductive and Radioprotective Effect of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells of Thymus

I.S. NIKOLSKY, V.V. NIKOLSKAYA, G.M. BUTENKO

Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

В экспериментах на летально облученных мышах линии СВА показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки тимуса (МСКТ) в результате совместной инкубации *in vitro* с криоконсервированными гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) значительно усиливают радиозащитное действие последних. Обнаружено, что МСКТ обладают выраженным радиозащитным действием в дозах, меньших в 10 раз, чем таковые ГСК.

Для изучения индуктивного влияния МСКТ на поверхность с колониями этих клеток помещали суспензию размороженных ГСК и проводили совместное культивирование клеток в течение 24 часов. Затем легко переходящие в суспензию ГСК отделяли от прилипших МСКТ и вводили внутривенно летально γ -облученным (900 рад) мышам линии СВА в количестве $0,5 \times 10^6$ на следующий после облучения день.

Для изучения возможного радиозащитного действия МСКТ мышей линии СВА отделяли от поверхности с помощью раствора версена и трипсина (1:1) и в количестве $0,05 \times 10^6$ вводили летально γ -облученным мышам линии СВА.

Установлено, что по средней продолжительности жизни и динамике выживаемости в течение 4 месяцев радиозащитным действием обладали ГСК, полученные из всех источников, причем как в сингенной, так и ксеногенной комбинациях, а также МСКТ, вводимые в десятикратно меньшем количестве, чем ГСК. Наиболее эффективны ГСК из эмбриональной печени. Средняя продолжительность жизни в результате введения ГСК из эмбриональной печени, преинкубированных с МСКТ, возрас- тала в 3-5 раз. Методом прямой проточной цитофлуориметрии в костном мозге и лимфоидных образованиях таких мышей выявлено 3–15% CD3⁺- и CD20⁺-клеток, что свидетельствует о формировании у леченных ксеногенными ГСК животных довольно стойкого клеточного химеризма, в процессе формирования которого создаются условия для дифференцировки ГСК и пролиферации их потомков. Возможно, что при создании межклеточных контактов *in vitro* или возникновении таковых *in vivo* вследствие эктопической пересадки МСКТ осуществляется индуктивное влияние указанных клеточных элементов на ГСК по характерному для “ниш” алгоритму.

Можно предположить, что эффект контактно-клеточного индуктивного усиления радиозащитного действия ГСК принципиально отражает существующие кооперативные отношения между различными типами стволовых клеток и в дальнейшем может быть использован в трансплантологии.

In the experiments in lethally irradiated CBA mice it has been shown that multipotent mesenchymal stromal cells of thymus (MSCT) as a result of combined *in vitro* incubation with cryopreserved hemopoietic stem cells (HSCs) significantly increase the radioprotective effect of the latter. It has been found also that the MSCT themselves possess a manifested radioprotective effect in the doses 10 times lower than those for HSCs.

For studying the inductive effect of MSCT on the surface with colonies of these cells the suspension of thawed HSCs was placed and the combined culturing of cells for 24 hrs was performed. Afterwards easily transiting to the suspension HSCs were separated from the adhered MSCT and introduced intravenously to lethally γ -irradiated (900 rad) CBA mice in an amount of 0.5×10^6 to the next after irradiation day.

For studying possible radioprotective effect the MSCT of CBA mice were removed from the surface using versene and trypsin solution (1:1) and in the amount of 0.5×10^6 were injected to γ -irradiated CBA mice.

It has been established that on average life span and survival dynamics during 4 months HSCs obtained from all the sources (both in syngeneic and xenogeneic combinations), as well as MSCT introduced in the 10 fold less amount vs HSCs, have radioprotective effect. The most effective were HSCs from embryonic liver. An average life span as a result of HSCs introduction from embryonic liver, preincubated with MSCT, increased 3–5 times. With direct flow cytometry in bone marrow and lymphoid formations of these mice there were found 3–15% of CD3⁺- and CD20⁺-cells, that testifies to the formation in treated with xenogeneic HSCs animals of quite a stable cell chimerism, during which the conditions for differentiation of HSCs and proliferations of their posterity are created. It is very likely that during either creation of intercellular contacts *in vitro* or appearance of those *in vivo* due to ectopic grafting of MSCT there is performed an inductive effect of the mentioned cell elements on HSCs according to characteristic for “niches” algorithm.

One may suppose that the effect of contact-cell inductive strengthening of radioprotective effect of HSCs principally reflects the existing cooperative relationships between various types of stem cells and further may be used in transplantology.

Критерии оценки качества преимплантационных эмбрионов человека до и после криоконсервирования

М.П. ПЕТРУШКО, В.И. ПИНЯЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Estimation Criteria for Pre-implanted Human Embryo Quality Prior to and After Cryopreservation

M.P. PETRUSHKO, V.I. PINYAEV

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

Морфологический анализ позволяет оценить влияние физических факторов на сохранность эмбрионов. Способность к возобновлению митоза и возможность достижения стадии бластоцисты не являются абсолютными показателями генетической полноценности, поскольку даже эмбрионы, несущие хромосомные аномалии, развиваются до стадии бластоцисты и способны имплантироваться. Риск возникновения генетических аномалий обуславливает необходимость введения четких критериев оценки безопасности процедуры криоконсервирования для генетического аппарата преимплантационных эмбрионов человека.

Цель данного исследования – изучение частоты хромосомных аномалий в бластомерах нативных и криоконсервированных эмбрионов человека.

Эмбрионы человека были разделены на две группы: 1 – 207 эмбрионов культивировали 16 ч с блокатором митоза (0,1% раствором колхицина) для получения препаратов хромосом, 2 – 189 эмбрионов криоконсервировали, культивировали в среде с блокатором митоза, после чего проводили фиксацию для последующего цитогенетического анализа методом кариотипирования.

Нормальный диплоидный набор хромосом имели 68,1% нативных эмбрионов. Полиплоидия была отмечена в 2,5% нативных эмбрионов. Анеуплоидными выявились 26,9% эмбрионов, в том числе гиперплоидными – 10,9% эмбрионов, гипоплоидными – 14,3%. Причем в большинстве случаев отмечали анеуплоидию по хромосомам групп С, Е и F.

По результатам анализа интерфазных ядер 80% нативных и 63,7% криоконсервированных эмбрионов обладали нормальным кариотипом. Полиплоидные мозаики были диагностированы в 18,2% эмбрионов после криоконсервирования.

Цитогенетический анализ методом кариотипирования и флюоресцентной гибридизации *in situ* позволил определить, что преимплантационные эмбрионы, полученные в ходе оплодотворения *in vitro* ооцитов пациенток, участвующих в циклах лечения бесплодия, обладают высокой генетической гетерогенностью.

В связи с этим важно проведение преимплантационной генетической диагностики как нативных, так и криоконсервированных эмбрионов с целью выявления генетических патологий до переноса эмбрионов в полость матки пациенток, что необходимо для предотвращения рождения ребенка с хромосомными аномалиями.

Morphological analysis enables to estimate the effect of physical factors on embryo preservation. The capability for mitosis renewal and the possibility of reaching blastocyst stage are not the absolute indices for genetic integrity, since even the embryos with chromosome abnormalities develop to the blastocyst stage and are capable to be implanted. The risk of genetic abnormality occurrence stipulates the necessity in introduction of distinct estimation criteria of cryopreservation procedure safety for genetic apparatus of preimplanted human embryos.

This research was targeted to study the frequency of chromosomal abnormalities in blastomeres of native and cryopreserved human embryos.

Human embryos were divided in two groups: the 1st one comprised 207 embryos, cultured for 16 hrs with mitosis blocker (0.1% colchicine solution) to procure chromosome preparation. The 2nd one included 189 embryos, cryopreserved, then cultured in mitosis blocker-containing medium, then fixed for further cytogenetic analysis using karyotyping method.

Normal diploid chromosome set was in 68.1% native embryos. Polyploidy was noted in 2.5% native embryos. Aneuploid were 26.9% embryos, including 10.9 and 14.3% hyperploidy and hypoploidy ones, correspondingly. Moreover in the most cases the aneuploidy by C, E and F group chromosomes was noted.

According to the results of interphase nuclei analysis, 80 and 63.7% of native and cryopreserved embryos, correspondingly, were of normal karyotype. Polyploid mosaics were diagnosed in 18.2% embryos after cryopreservation.

Cytogenetic analysis by karyotyping method and *in situ* fluorescent hybridization enabled determining the fact that the pre-implanted embryos, procured during *in vitro* oocyte fertilization of patients, participating in infertility treatment cycles, had a high genetic heterogeneity.

Due to this fact of importance is to perform a preimplantation genetic diagnostic both of native and cryopreserved embryos with the aim to find out genetic pathologies prior to embryo transfer into patients' uterine cavity, that is indispensable to prevent child birth with chromosome abnormalities.

Метод дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоцитоподобные

В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, А.В. Оберемко, В.В. Буше

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

Method of Stem Cell Differentiation in Cardiomyocyte-like Ones

V.K. GRIN', A.G. POPANDOPULO, A.V. OBEREMKO, V.V. BUSHE

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

Для исследования возможности дифференцировки клеток стромы костного мозга по кардиомиоцитарному пути была проведена серия экспериментов. Культуру стромальных стволовых клеток 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% монослая клетки пассировали раствором 0,25% трипсин/версена (1:5).

Конфлуентную культуру второго пассажа стимулировали к дифференцировке добавлением в культуральную среду 5-азациитидина в концентрации 10 мкмоль/л на 24 ч. После этого среду заменяли на среду DMEM/F12 1:1 ("Sigma", США), содержащую дополнительно 20% фетальной телячьей сыворотки ("Биолот", Россия), глутамин ("Биолот", Россия), инсулин ("Sigma", США), дексаметазон ("Sigma", США), L-аскорбиновую кислоту ("Sigma", США) и фактор роста фибробластов b (FGFb) ("Sigma", США). Среду меняли каждые 3-е суток.

Изменение клеточной морфологии наблюдали визуально при помощи метода световой микроскопии. Через одну неделю после начала индукции культура представляла собой монослой фибробластоподобных клеток. В конце второй недели появлялись продольные кардиомиоцитоподобные мускульные клетки, до 20% от общего количества клеток. Через 3–4 недели культивирования до 30% клеток спонтанно сокращались и содержали от одного до нескольких ядер.

Для подтверждения состоявшейся дифференцировки ССК в кардиомиоцитоподобные клетки использовали иммуногистохимический метод идентификации в культурах этих клеток специфических белков – тропонина I и актина с помощью моноклональных антител. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе "Laborux" ("Leica", Германия).

The series of experiments were carried-out for studying the possibility for bone marrow stromal cell differentiation by cardiomyocyte way. The culture of stromal stem cells 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 main fibroblast growth 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)

Confluent culture of the second passage was stimulated to differentiation by adding into cultural medium of 5-azacytidine in 10 μM/l concentration for 24 hrs. Afterwards the medium was changed for DMEM/F12 1:1 ("Sigma", USA), additionally containing 20% fetal bovine serum ("Biolog", Russia), glutamine ("Biolog", Russia), insulin ("Sigma", USA), dexamethazone ("Sigma", USA), L-ascorbic acid ("Sigma", USA) and fibroblast growth factor b (FGFb) ("Sigma, USA"). The medium was changed every 3 days.

Change in cell morphology was visually observed by means of light microscopy. One week after beginning the induction, the culture represented a monolayer of fibroblast-like cells. At the end of the second week the lateral cardiomyocyte-like muscular cells, up to 20% of total cell amount, appeared. Three-four weeks after culturing up to 30% of cells contracted spontaneously and contained from one to several nuclei.

To confirm the occurred SSCs differentiation in cardiomyocyte-like cells we used the immune histochemical method of identification of specific proteins: troponin I and actin using monoclonal antibodies in cultures of these cells. Phase-contrast and fluorescent microscopies were done with "Laborux" microscope ("Leica", Germany).

Метод индукции стволовых клеток стромы костного мозга по остеогенному типу

À.Ã. ÎÎÁÍÁÏÔË, À.Â. ÎÃÃ ÁÏË, Â.Ì. ÎËËÏÃÖ

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

Method for Induction of Bone Marrow Stromal Stem Cells on Osteogenic Type

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

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

Для исследования возможности дифференцировки клеток стромы были созданы микс-культуры стромальных стволовых клеток (ССК) костного мозга и прогениторных клеток надкостницы (ПКН) в соотношении 3:1 (600000 ССК и 200000 ПКН). Культуру ССК получали из костного мозга путём механической дезагрегации, центрифугирования с последующим высеванием 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).

Культуру ПКН получали из периоста костных фрагментов. Биоптат многократно промывали раствором PBS с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и вносили при 4°C на 24 ч в питательную среду "Игла" ("Биолот", Россия), содержащую 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. После этого элементы мышечной и соединительной ткани отделяли от костной. Поверхность чашек Петри диаметром 35 мм предварительно обрабатывали раствором коллагена I типа и помещали в них костные фрагменты. Культивирование проводили по стандартной методике. На 8-е сутки в фазово-контрастном микроскопе "Laborux" ("Leica", Германия) при стократном увеличении наблюдали миграцию ПКН, через месяц после начала культивирования была получена конфлуэнтная культура.

Микс-культуру культивировали по стандартной методике. Поверхность плазматических мембран предварительно помечали прижизненными красителями PKH67 Green (для ССК) и PKH26 Red (для ПКН) Fluorescent Linker Kit ("Sigma", США), которые обладают флуоресценцией в зелёной и красной частях спектра соответственно. Каждые 3–4 дня культуры фотографировали при помощи программы "Qwin" ("Leica", Германия). Через 3–4 недели после совместного культивирования отмечена дифференцировка ССК в остеобласты, что подтверждалось положительной окраской на щелочную фосфатазу, которая является продуктом жизнедеятельности костных клеток (BCIP/NBT Liquid Substrate System, "Sigma", США).

In order to investigate the possibilities for stromal cell differentiation there were designed the mix-cultures of stromal stem cells (SSCs) of bone marrow and periosteal progenitor cells (PPCs) in 3:1 ratio (600,000 SSCs and 200,000 PPCs). SSCs culture was derived from bone marrow by means of mechanical disaggregation, centrifugation with following inoculation in 75 cm² cultural flasks ("Costar", USA). The isolated SSCs culture was primarily plated on DMEM/F12 growth medium in 1:1 ratio ("Sigma", USA) with adding 20% fetal calf serum ("Biolot", Russia), glutamine ("Biolot", Russia), L-ascorbic acid ("Sigma, USA") and main factor of fibroblast growth ("Sigma", USA). Cells were cultured in CO₂ incubator (37°C, 5 and 95% of CO₂ and humidity, correspondingly). Medium was changed every 3 days. When getting 70-80% monolayer, the cells were passed with 0.25% trypsin/versene solution (1:5).

The PPCs culture was derived from bone fragment periost. Biopsy specimen was many-fold washed with PBS solution, complimented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and introduced into the "Eagle" cultural medium ("Biolot, Russia), containing 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin at 4°C for 24 hrs. Afterwards the elements of muscular and connective tissues were isolated from the bone one. The surface of 35 mm diameter's Petri dishes was preliminarily treated with I type collagen solution with placing bone fragments into them. Culturing was carried-out by the standard technique. To the 7th day the PPCs migration was observed under phase-contrast microscope "Laborux" ("Leica, Germany") at 100-fold magnification, a confluent culture was obtained a month later of culturing beginning.

The mix-culture was cultured according to the standard technique. The surface of plasmatic membranes was preliminarily marked with supravital dyes PKH67 Green (for SSCs) and PKH26 Red (for PPCs) Fluorescent Linker Kit ("Sigma", USA), having fluorescence in green and red spectra, correspondingly. Cultures were recorded with "Qwin" software ("Leica", Germany) every 3-4 days. The SSCs differentiation into osteoblasts was noted 3-4 weeks after mutual culturing, confirmed by a positive staining onto alkaline phosphatase, being the product of bone cell vital activity (BCIP/NBT Liquid Sytem, "Sigma", USA).

Применение пектина ряски малой лемнана для консервирования лейкоцитов при -20°C

О.Н. СОЛОМИНА, Е.П. СВЕДЕНЦОВ, В.В. ГОЛОВЧЕНКО, О.О. ЗАЙЦЕВА, Т.В. ТУМАНОВА, Г.А. НИКУЛИНА
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

Application of Lemnan Duckweed Pectin for Leukocyte Preservation at -20°C

O.N. SOLOMINA, E.P. SVEDENTSOV, V.V. GOLOVCHENKO, O.O. ZAYTSEVA, T.V. TUMANOVA, G.A. NIKULINA
Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural Division
of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Углеводы – известный класс органических веществ, широко используемых для консервирования клеток компонент различных защитных сред. У данных веществ отмечено наличие слабых протекторных свойств. Показано [Оводова Р.Г. и соавт., 2000], что выделенный из свежесобранного водного растения ряски малой *Lemna minor* L. пектиновый полисахарид лемнан характеризуется высокой способностью к образованию вязких водных растворов и к гелеобразованию. В литературе отсутствуют сведения об изучении криозащитных свойств у растительных полисахаридов.

Цель данной работы – исследование морфологических и функциональных показателей лейкоцитов, подвергнутых замораживанию до -20°C и хранению в течение суток под защитой криоконсерванта, содержащего пектин ряски малой лемнан.

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов, выделенный из цельной донорской крови путем цитафереза. Среднее количество биообъекта составляло $15,52 \pm 4,25$ мл. Лейкоциты смешивали в соотношении 1:1 в пластиковом контейнере “Компопласт 300” с криоконсервантом, содержащим глицерин (в конечной концентрации 3,5%), пектин лемнан и трилон В. Для “выравнивания” рН раствора использовали гидроксид натрия (следы). Смесь выдерживали в течение 20 мин при комнатной температуре и замораживали по экспоненциальной программе в спиртовой (96°) ванне камеры электроморозильника “Криостат”, охлажденной до -20°C в течение 15 мин. Быстрое размораживание лейкоконцентрата осуществляли через сутки в 20-литровой водяной ванне, нагретой до 38°C в течение 35–45 с (в зависимости от объема биообъекта) при интенсивном покачивании контейнера.

Результаты исследований ($n=11$; $M \pm y$) показали, что через сутки хранения биообъекта при -20°C сохраняется $87,4 \pm 10,9\%$ (от исходного уровня) клеток, из них у $78,8 \pm 6,2\%$ плазматическая мембрана устойчива к эозину. Сохранность гранулоцитов составляет $54,0 \pm 7,0\%$, а $82,5 \pm 17,7\%$ отогретых нейтрофилов способны фагоцитировать частицы латекса.

Таким образом, растительный полисахарид лемнан способствует сохранению ядерных клеток крови, подвергнутых замораживанию до -20°C и хранению в течение суток.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований за оказанную финансовую поддержку при выполнении данного этапа исследования (грант РФФИ 08-04-01423).

Carbohydrates are the known class of organic substances, widely applied in cell preservation as the components of different protective media. These substances demonstrate low protective properties. It has been shown [Ovodova R.G. et al., 2000], that the pectic polysaccharide lemnan, isolated from freshly-collected duckweed *Lemna minor* L. aqueous plant, is characterized by a high capability for viscous aqueous solutions and gel formations. There is no information in literature about studying the cryoprotective properties in plant polysaccharides.

This research was aimed to investigate the morphological and functional indices in leukocytes, underwent freezing down to -20°C and one day's storage under protection of cryopreservative, containing lemnan duckweed pectin.

The research object was the leukocyte concentrate, isolated from the whole donor blood by cytaferesis. An average number of bioobject was 15.52 ± 4.25 ml. Leukocytes were mixed in 1:1 ratio into the “Kompoplast 300” plastic containers with the cryopreservative, containing glycerol (in 3.5% final concentration), lemnan pectin and trilon B. We used the sodium hydroxide (traces) for solution pH “leveling”. The mixture was exposed for 20 min at room temperature and frozen by exponential program in alcohol (96°) bath of “Cryostat” electrofreezer chamber, cooled down to -20°C within 15 min. Leukoconcentrate was rapidly frozen-thawed a day later in 20 l water bath, heated up to 38°C for 35–45 sec (depending on bioobject's size) under intensive container shaking.

The research results ($n=11$; $M \pm y$) have demonstrated, that following one day of bioobject storage at -20°C there are preserved $87.4 \pm 10.9\%$ cells (of initial level), in $78.8 \pm 6.2\%$ of them the plasmatic membrane is eosin-resistant. Granulocyte integrity was $54.0 \pm 7.0\%$, $82.5 \pm 17.7\%$ of thawed neutrophils are capable for latex particle phagocytosis.

Thus, the lemnan plant polysaccharide contributes to the integrity in blood nuclear cells, underwent freezing down to -20°C and 1 day's storage.

The authors are gratitude to the Russian Foundation for Basic Research for rendered financial support during this research step performance (grant RFFBR 08-04-01423).

Эффективность применения линейной и экспоненциальной программ замораживания лейкоцитов до -80°C

А.Н. ХУДЯКОВ¹, Е.П. СВЕДЕНЦОВ¹, Т.В. ТУМАНОВА¹, А.А. КОСТЯЕВ²

¹Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

²Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий

Efficiency of Applying Linear and Exponential Programs for Leukocyte Freezing Down to -80°C

A.N. KHUDYAKOV¹, E.P. SVEDENTSOV¹, T.V. TUMANOVA¹, A.A. KOSTYAEV²

¹Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural Division of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

²Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Russia

В настоящее время для замораживания клеток крови и костного мозга широко используются линейные программы, тогда как раньше ряд авторов [Гордиенко Е.А. и соавт., 1994; Сведенцов Е.П. и соавт., 1987; Костяев А.А. и соавт., 2003] предложили применять и экспоненциальные. Цель данного исследования – изучение эффективности применения линейной и экспоненциальной программ замораживания лейкоцитов до -80°C .

Объектом исследования служил концентрат лейкоцитов, выделенный из цельной донорской крови при цитаферезе. Использовали оригинальный малотоксичный хладоограждающий раствор (Пат. № 2290808, 2007), содержащий криопротектор смешанного действия гексаметиленбистетраоксизтилмочевину, криопротектор эндоцеллюлярного действия ДМСО и “реставрирующую” добавку широкого спектра действия. Биообъект смешивали с раствором в соотношении 1:1 и выдерживали при комнатной температуре 20 мин. Замораживание проводили по двум программам: экспоненциальной (серия 1) и линейной (серия 2). В серии 1 контейнер с лейкоцитами погружали в заполненную хладоносителем (96% этиловым спиртом) ванну камеры электроморозильника (объем 4 л) “Криостат”. Клеточную взвесь выдерживали при -28°C (температура адаптации) в течение 15–18 мин в зависимости от объема среды и переносили для дальнейшего замораживания и хранения в электроморозильник (-80°C). В серии 2 контейнер с лейкоцитами помещали в программный замораживатель УОП и замораживали биообъект по следующей программе: на 1-м этапе со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от 22 до -7°C , на 2-м этапе – $-10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от -7 до -40°C , на 3-м этапе – $-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от -40 до -80°C . Образцы хранили при -80°C в течение суток в электрическом морозильнике, отогревали в водяной ванне при 38°C в течение 35–50 с при интенсивном покачивании контейнера.

Установлено, что количество клеток, устойчивость их мембран к витальному красителю эозину, содержание лизосомально-катионных белков в нейтрофилах после отогрева в сериях 1 ($n=12$) и 2 ($n=12$) достоверно ($p<0,05$) не отличаются. При оценке морфологического состава лейкоцитов, замороженных по линейной программе, количество гранулоцитов составило $87,5\pm 6,55\%$ (от исходного уровня), а при использовании экспоненциальной – достоверно выше ($94,5\pm 6,9\%$), однако фагоцитарная активность нейтрофилов данной серии была ниже ($78,13\pm 5,9\%$), чем в серии с применением линейной программы ($88,9\pm 5,41\%$).

Следовательно, линейная и экспоненциальная программы замораживания лейкоцитов до -80°C с применением криоконсерванта по эффективности значительно не отличаются, но экспоненциальная программа имеет низкую экономическую стоимость и является более доступной в методическом плане.

Nowadays there are widely used the linear programs for blood and bone marrow cell freezing, meanwhile some authors [Gordienko E.A. *et al.*, 1994; Svedentsov E.P. *et al.*, 1987; Kostyaev A.A. *et al.*, 2003] previously proposed to use the exponential programs as well. This research aim was to study the efficiency of applying the linear and exponential programs for erythrocyte freezing down to -80°C .

The research object was the leukocyte concentrate, isolated from the whole donor blood under cytopheresis. We used the original low toxic cold-protecting solution (Patent N 2290808, 2007), containing hexamethylene-bis-tetraoxyethyl-urea cryoprotectant of mixed effect, DMSO cryoprotectant of endocellular effect and a “renewing” additive of wide spectrum. Bioobjects were mixed with solution in 1:1 ratio and exposed at room temperature for 20 min. Freezing was carried-out by two programs: exponential (1st series) and linear (2nd series) ones. In the 1st series the container with leukocytes was immersed into the bath of “Криостат” electrofreezer chamber (4 l volume), filled with coolant (96% ethyl alcohol) bath. Cell suspension was exposed at -28°C (adaptation temperature) within 15–18 min depending on the medium volume and transferred into electrofreezer at -80°C for further freezing and storage. In the 2nd series the container with leukocytes was placed into the UOP programmed freezer and the bioobject was frozen according to the following program: at the 1st step with $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate from 22 to -7°C , at the 2nd step with $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from -7 to -40°C , and with $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from 40 to -80°C at the 3rd one. Samples were stored at -80°C for 1 day in electric freezer, thawed with water bath at 38°C for 35–50 sec under intensive shaking of container.

The number of cells, their membrane resistance to eosin vital dye, content of lysosome-cation proteins in neutrophils after thawing in 1st ($n=12$) and 2nd ($n=12$) series were established as not statistically and significantly differed ($p<0.05$). When estimating a morphologic composition of leukocytes, frozen by a linear program, the granulocyte number was $87.5\pm 6.55\%$ (of initial level), and with the exponential one it was statistically and significantly higher ($94.5\pm 6.9\%$), but neutrophil phagocyte activity in these series was lower ($78.13\pm 5.9\%$), than in the series with linear program ($88.9\pm 5.41\%$).

Consequently, the linear and exponential programs for leukocyte freezing down to -80°C with cryopreservative do not considerably differ by the efficiency, but the exponential program has low economic value and is more available in methodical aspect.

Эффект “упаковки” при замораживании эритроцитов в комбинированных криоконсервантах

В.В. РАМАЗАНОВ, В.А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

“Package” Effect under Erythrocyte Freezing with Combined Cryopreservatives

V.V. RAMAZANOV, V.A. BONDARENKO

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

В существующих методах замораживания эритроцитов применяется проникающий криопротектор глицерин, использование которого в высоких концентрациях требует трудоемкие подходы для его отмывания. Такая процедура приводит к значительной потере клеток и осмотическому повреждению оставшейся части клеток. Криоконсервирование эритроцитов с полимерными непроникающими криопротекторами может исключать процедуру их отмывания, однако после трансфузии клеток с такими криопротекторами выявляются лейкоцитоз, повышение концентрации гемоглобина и билирубина в плазме и задержка выведения данных криопротекторов из организма.

Использование комбинированных криоконсервантов с непроникающими и проникающими криопротекторами обеспечивает высокую сохранность функциональных свойств многих клеток после их замораживания: стволовых клеток периферической крови и костного мозга, гранулоцитов, лимфоцитов, гемопоэтических клеток кордовой крови, клеток поджелудочной железы человека.

Установлено, что использование криоконсервантов с непроникающими и проникающими криопротекторами сопровождается устранением эффекта «упаковки» (дополнительных повреждений, связанных с высокой плотностью клеток в среде замораживания), повышением сохранности эритроцитов, поддержанием нормальной осмотической хрупкости и проницаемости ионов H^+ замороженных клеток.

На основе полученных результатов можно предположить, что блокирование развития повреждений, связанных с высокой плотностью эритроцитов, определяется ослаблением осмотического стресса, который создается концентрированием полимерных криопротекторов при замораживании. Включение в криоконсервант проникающего криопротектора оказывается эффективным подходом в отношении уменьшения осмотического стресса, создаваемого в ходе замораживания с непроникающими криопротекторами. Сочетание в криоконсерванте непроникающих и проникающих криопротекторов обеспечивает новое криозащитное качество комбинированного состава, которое противодействует повреждающим факторам при замораживании-отогреве и сохраняет нормальные осмотические показатели для клеток после их отмывания.

Penetrative cryoprotectant glycerol, which usage in high concentrations requires the labour-intensive approaches for its washing-out, is applied in current methods of erythrocyte freezing. This procedure results in a significant cell loss and osmotic damage in the rest part of cells. Erythrocyte cryopreservation with polymer non-penetrative cryoprotectants may exclude the washing-out procedure, but after cell transfusion with such cryoprotectants there have been revealed the leukocytosis, increase in hemoglobin and bilirubin concentrations in plasm and a delay with these cryoprotectants release out an organism.

The usage of combined cryopreservatives with non-penetrative and penetrative cryoprotectants provides a high integrity of functional properties after freezing for many cells such as stem cells of peripheric blood and bone marrow, granulocytes, lymphocytes, cord blood hemopoietic cells, the ones of human pancreas.

The usage of cryopreservatives with non-penetrative and penetrative cryoprotectants was established as accompanying with the “package” effect elimination (additional damages, associated to a high cell density in freezing medium), an increase in erythrocyte integrity, the maintenance of normal osmotic fragility and H^+ ion permeability of frozen cells.

Basing on the results obtained we may assume that the blockage of damage development, related to a high erythrocyte density, is determined by weakening of osmotic stress, created by concentrating polymer cryoprotectants under freezing. Inclusion of penetrative cryoprotectant into cryopreservative occurs to be an efficient approach in respect of a decrease in osmotic stress, created during freezing with non-penetrative cryoprotectants. Combination of non-penetrative and penetrative cryoprotectants in a cryopreservative provides a new cryoprotective quality of a combined composition, which resists to damaging factors under freeze-thawing and preserves the normal osmotic indices for cells after their washing-out.

Влияние аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани на уровень тестостерона при гипофункции яичек в эксперименте

В.Е. ЧАДАЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Testicular Tissue Allotransplantation on Testosterone Level at Testes Hypofunction in Experiment

V.E. CHADAYEV

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

Яички, тестисы или семенники представляют собой мужские половые железы, главными функциями которых являются продуцирование сперматозоидов и синтез тестостерона как основного мужского полового гормона. Известно, что сперматогенный эпителий чрезвычайно чувствителен к повреждающим воздействиям. Цель работы – изучение влияния аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани на уровень тестостерона при гипофункции яичек.

Эксперименты проводили на 18-месячных кроликах породы Шиншилла. Оценивали поведение 20 кроликов-самцов. Живая масса составляла 3000–3500 г. Вся работа с животными проводилась в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2007) и согласованными с положениями “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Тестостерон-продуцирующую способность половых желез исследуемых групп животных изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для количественного определения тестостерона применяли набор реагентов, представляющий собой тест-систему, “Тестостерон-ИФА-БЕСТ”. При этом для анализа использовали по 20 мкл как сыворотки крови, так и предварительно полученного и осветленного центрифугированием в течение 20 мин при 3000 г гомогената тестикулярной ткани (1:4 по весу в стерильном физиологическом растворе). Результаты получали посредством спектрофотометрического анализа на приборе STATFAX-3000 (США) при длине волны 450 нм. Измерения проводили сразу после остановки реакции. Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Спектрофотометрический анализ содержания тестостерона в гомогенате тестикулярной ткани экспериментальных животных показал, что при сроке половой абстиненции 2 месяца его концентрация составляет 30 ± 12 нг/г, что в 10,6 раза ниже контроля (320 ± 190). Через 4 недели после трансплантации криоконсервированной ткани яичек животным со сроком половой абстиненции 2 месяца уровень содержания тестостерона в их тестикулярной ткани значительно повысился (в 4,8 раза) и составил 145 ± 17 нг/г. Та же положительная динамика отмечалась и в группе экспериментальных животных, которым при сроке половой абстиненции 2 месяца производилась трансплантация криоконсервированной тестикулярной ткани и которые после трансплантации в течение 4 недель получали препарат “Ноофен”. При этом содержание тестостерона в гомогенате их тестикулярной ткани составило 163 ± 24 нг/г. Аналогичные результаты были получены при определении концентрации тестостерона в сыворотке крови контрольных и экспериментальных животных.

Таким образом, метод трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани позволяет восстанавливать тестостерон-продуцирующую систему и поведенческие реакции у животных.

Testes are the male sexual glands, which main functions are the spermatozoa production and testosterone synthesis, being the major male sexual hormone. Spermatogenic epithelium is known to be an extremely sensitive to damaging effects. The research was aimed to study the effect of cryopreserved testicular tissue allotransplantation on testosterone level at testes hypofunction.

The experiments were performed in 18 months' Chinchilla rabbits. The behaviour of 20 male rabbits was estimated. Living mass was 3,000–3,500 g. All manipulations with animals were carried-out according to the “General ethical principles of experiments in animals”, approved by the 3rd National Congress on Bioethics (Kiev, 2007) and agreed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985).

Testosterone-producing ability of sexual glands in studied animal groups was investigated by the immune enzyme analysis (IEA) method. The “Testosterone-IEA-BEST” reagent kit in the form of test-system was used for quantitative determination of testosterone. At the same time 20 μ l of both blood serum and testicular tissue homogenate, preliminary obtained and lightened by centrifugation within 20 min at 3000 g (1:4 by weight in sterile physiological solution) were used for analysis. The results were obtained by spectrophotometrical analysis with STATFAX-3000 device (USA) at 450 nm wavelength. Measurements were carried-out right after reaction arresting. Data were statistically processed with Student-Fisher method.

Spectrophotometrical analysis of testosterone content in testicular tissue homogenate of experimental animals has demonstrated that under 2 months' sexual abstinence its concentration is 30 ± 12 ng/g, that is in 10.6 times lower, than the control (320 ± 190). Four weeks after transplantation of the cryopreserved testicular tissue to animals with 2 months' sexual abstinence the level of testosterone content in their testicular tissue significantly increased (in 4.8 times) and was 145 ± 17 ng/g. The similar positive dynamics was noted in the group of experimental animals with transplanted cryopreserved testicular tissue at 2 months' abstinence term and “Noophen” preparation uptake within 4 weeks after transplantation. At the same time the testosterone content in their testicular tissue homogenate was 163 ± 24 ng/g. The same results were received under the certain testosterone concentration in blood serum of the control and experimental animals.

Thus, the method of cryopreserved testicular tissue transplantation enables the recovering of testosterone-inducing system and behaviour responses in animals.

Влияние экзоцеллюлярных криопротекторов на подвижность спермиев человека

В.И. Грищенко, А.А. Гапон, Н.Н. Чуб, М.И. Крамар, В.Л. Родионова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Exocellular Cryoprotectants on Human Spermatozoa Motility

V.I. GRISCHENKO, A.A. GAPON, N.N. CHUB, M.I. KRAMAR, V.L. RODIONOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

Состав криозащитной среды является одним из основных факторов, определяющих эффективность низкотемпературного консервирования.

Полиэтиленоксиды (ПЭО) представляют класс малотоксичных, не проникающих через плазматическую мембрану клеток веществ. В качестве криопротекторов полиэтиленоксиды различной молекулярной массы были успешно применены при разработке методов криоконсервирования эритроцитов, овариальной ткани и других биообъектов человека и млекопитающих. Цель работы – изучение влияния ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 на подвижность спермиев человека на этапах низкотемпературного консервирования.

Материалом исследования служили эякуляты, полученные у мужчин с нормозооспермией в возрасте от 20 до 40 лет после 3-4-дневной половой абстиненции. Концентрацию и подвижность спермиев оценивали согласно рекомендациям ВОЗ. Спермий с быстрым и медленным поступательным прямолинейным движением относили к группе “а+в”. Были использованы 5 и 10 % концентрации ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 (х. ч.) на растворе Хэнкса. Контролем служила криозащитная смесь глюкоза-лактат-желток (ГЛЖ). После эквilibрации с криозащитной средой (1:1) в течение 15, 30 и 60 мин образцы спермы оценивали и криоконсервировали по трехэтапной программе: 1-й – охлаждение со скоростью 1–2°C/мин до 10°C в ультратермостате в условиях холодильника; 2-й – со скоростью 50–60°C/мин до –70...–75°C; 3-й – погружение в жидкий азот. Размораживали препараты на водяной бане при 40°C до появления жидкой фазы. При статистической обработке использовали критерий Стьюдента-Фишера.

При оценке нативных эякулятов концентрация спермиев в 1 мл составляла 68±6,8 млн, после добавления криопротекторов – 37±2,8 млн, после криоконсервирования – 30±2,8 млн. При сравнительном изучении подвижности спермиев было отмечено достоверное снижение концентрации гамет во фракции “а+в” через 60 мин эквilibрации с ними, что косвенно может свидетельствовать о достаточно низком цитотоксическом действии изучаемых криозащитных сред на спермин человека. Было обнаружено стимулирующее действие ПЭО-2000 и ПЭО-3000 на подвижность спермиев человека, по-видимому, за счет связывания свободной воды в эякуляте. Однако после криоконсервирования спермы под защитой ПЭО с различной концентрацией и молекулярной массой отмечали достоверное снижение подвижности спермиев человека по сравнению с ГЛЖ.

Таким образом, ПЭО-400, 1500, 2000, 3000 не обладают криопротекторными свойствами для спермиев человека, несмотря на их низкую цитотоксичность.

Cryoprotective medium composition is one of the main factors, determining the efficiency of low temperature preservation.

Polyethylene oxides (PEO) are the class of low-toxic substances, non-penetrating through cell plasmatic membrane. Polyethylene oxides with different molecular mass were successfully applied as cryoprotectants when designing the cryopreservation methods for erythrocytes, ovarian tissue and other human and mammalian bioobjects. The research was aimed to study the effect of PEO-400, 1500, 2000, 3000 on human spermatozoa motility under low temperature preservation stages.

The ejaculates, procured in men with normozoospermia aged from 20 to 40 years after 3-4 days of sexual abstinence, served as the research material. Spermatozoa concentration and motility were estimated according to the WHO recommendations. Spermatozoa with rapid and slow progressive linear movements were referred to the “a+b” group. We used 5 and 10% concentrated PEO-400, 1500, 2000, 3000 (chemically pure grade) with Hank’s solution. The glucose-lactate-yolk (GLY) cryoprotective mixture served as the control. After equilibration with cryoprotective medium (1:1) for 15, 30 and 60 min the sperm samples were assessed and cryopreserved by a three-step program: the 1st consisted in cooling down to 10°C with 1-2°C/min rate in ultrathermostat under refrigerator condition; that with 50–60°C/min rate down to –70...–75°C was in the 2nd one; the 3rd one comprised the immersion into liquid nitrogen. Preparation were thawed on water bath at 40°C up to liquid phase appearance. The results were statistically processes using the Student-Fisher criterion.

When estimating the native ejaculates the spermatozoa concentration in 1 ml was 68±6.8 mln, 37±2.8 mln after cryoprotectant adding and 30±2.8 mln after cryopreservation. Under comparative study of spermatozoa motility a statistically significant decrease in gamete concentrations in “a+b” fraction 60 min after equilibration with them was noted, that might testify to quite a low cytotoxic effect of studied cryoprotective media on human spermatozoa. There was found-out a stimulating effect of PEO-2000 and PEO-3000 on human spermatozoa motility apparently due to a free water binding in ejaculate. However after sperm cryopreservation under PEO protection with different concentration and molecular mass there was observed a statistically significant decrease in human spermatozoa motility compared to the GLY.

Thus, PEO-400, 1500, 2000, 3000 have no cryoprotective properties for human spermatozoa, in spite of their low cytotoxicity.

До питання оптимізації терапії мікоплазмозу у вагітних

В.Ю.ПРОКОПЮК¹, І.Б. МУСАТОВА², В.Є. ЧАДАЄВ²

¹Харківський національний медичний університет

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

To the Question of Optimizing Micoplasmosis Therapy in Pregnants

V.YU. PROKOPYUK¹, I.B. MUSATOVA², V.E. CHADAYEV²

¹Kharkiv National Medical University, Ukraine

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

Розповсюдженість мікоплазмозу у вагітних жінок вкрай негативно впливає на демографічні показники. Погіршення екологічної ситуації, збільшення частоти та важкості інтеркурентних захворювань, обтяжений фармакоалергічний анамнез обумовлює необхідність пошуку принципово нових ефективних лікувальних засобів. Стрімкий розвиток наукових біотехнологічних розробок призвів до створення в останні роки препаратів і методів терапії нового покоління.

Найбільш виправданим, на нашу думку, є патогенетично обгрунтоване лікування мікоплазмозу вагітних із включенням флавоноїдів чи імплантацій хоріальних фрагментів. Дані препарати мають імуномодулюючу, антиоксидантну, бактерицидну та стимулюючу регенеративні процеси дію.

Мета дослідження – обгрунтування терапії мікоплазмозу вагітних з використанням фрагментів кріоконсервованого хоріона і флавоноїдів та верифікація клінічної ефективності цих засобів.

В експериментальній частині роботи використано 48 лабораторних тварин (вагітні самки щурів), що склали 4 групи спостереження: 1 група (12 тварин) – інтактні вагітні самиці; 2-4 групи (36 тварин) – з моделлю фетоплацентарної недостатності гіпоксично-інфекційного генезу: 10 тварин 2 групи не отримували лікування, 14 тварин 3 групи лікували ровамацином, 12 тваринам 4 групи підшкірно вводили кріоконсервовані фрагменти хоріона. Спостерігали перебіг вагітності, оцінювали кількість і вагу новонароджених щурят, перинатальні втрати.

Клінічні спостереження проводили за 90 вагітними жінками, що склали 3 клінічні групи: 1 група – жінки з фізіологічним перебігом вагітності, 2 група – вагітні з мікоплазмозом, які лікувалися ровамацином. В схему терапії вагітних з мікоплазмозом (3 група) додавали флавоноїди (протезфлазид). Вивчали систему „мати–плацента–плід” під час вагітності, пологів, стан новонароджених та породіль.

Експериментальні дослідження на щурах продемонстрували підвищення ефективності терапії мікоплазмозу при вагітності при застосуванні хоріальної імплантації у вигляді збільшення відсотка живих новонароджених щурят, їх ваги та адаптованості.

Клінічні спостереження виявили імунокорегуючий, антигіпоксичний, антиоксидантний ефекти та стимуляцію регенеративних процесів при застосуванні флавоноїдів у лікуванні мікоплазмозу вагітних, що призвело до покращення перебігу вагітності, пологів, стану матерів та немовлят.

The micoplasmosis propagation among the pregnant women affects very negatively the demographic indices. The aggravation of ecological situation, increase in frequency and severity of intercurrent disease, aggravated by pharmacological and allergic anamneses stipulate the search for principally new efficient therapeutic means. Precipitated progress of scientific biotechnological developments resulted in a recent creating of preparations and therapeutic methods of new generation.

We believe that the most justified and pathogenetically substantiated micoplasmosis treatment in pregnant women is either flavonoid administration, or chorion fragment implantation. These preparations have the immune-modulating, antioxidative, bactericidal and stimulating the regenerative process effects.

The research was aimed to substantiate the therapy of pregnant women with micoplasmosis using cryopreserved chorion fragments and flavonoids, as well as to verify clinical efficiency of these means.

In experimental part of the research we used 48 laboratory animals (pregnant female rats), divided in 4 observation groups: 1st group of intact pregnant females (12 animals); 2nd-4th ones (36 animals): those with the model of fetoplacental insufficiency of hypoxic and infectious genesis: 10 animals of the 2nd group were untreated, 14 animals of the 3rd one were treated with rovamycin, 12 animals of the 4th one received subcutaneously the cryopreserved chorion fragments. The pregnancy proceeding was observed, the amount and weight of newborn rats, as well as perinatal losses were estimated.

Clinical observations were carried-out in 90 pregnant women, divided into 3 clinical groups: 1st one comprised women with physiological pregnancy course, rovamycin-treated pregnant women with micoplasmosis were in the 2nd one. Flavonoids (proteflazidum) were added to the therapeutic protocol of pregnant women with micoplasmosis (3rd group). The “mother-placenta-fetus” system during pregnancy, labour, as well as the state of newborns and puerperas have been studied.

Experimental research in rats has demonstrated an increase in the efficiency of micoplasmosis therapy during pregnancy with using chorion implantation in the form of an increased percentage of living newborn rats, their weight and adaptation ability.

Clinical observations have revealed an immune correcting, antihypoxic, antioxidative effects and stimulation of regenerative processes when applying flavonoids in treating micoplasmosis of pregnant women, resulted in improvement of pregnancy course, labour, mother and newborn state.

Одновалентные анионы – модуляторы морфологического ответа эритроцитов

С.В. РУДЕНКО¹, Л. ШИ², В.А. БОНДАРЕНКО¹

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

²Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Monovalent Anions As Modulators of Morphological Response of Erythrocytes

S.V. RUDENKO¹, L. SHI², V.A. BONDARENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine

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

²V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine

Исследовано влияние моновалентных анионов Cl⁻, F⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻ и NO₂⁻ на последовательность изменения формы эритроцитов – морфологического ответа (МО) в изотонической сахарозной среде. Установлено, что МО, который состоит из трех фаз, протекает по-разному в средах, содержащих и не содержащих указанные анионы. Увеличение концентрации анионов от 0 до 20 мМ приводит сначала к ингибированию фазы 3 МО, а затем последовательно к ингибированию фаз 2 и 1. Таким образом, в средах с высокой концентрацией анионов (10 мМ и выше) МО полностью подавляется. Такое поведение характерно для всех анионов, кроме анионов I⁻, которые не ингибируют фазу 1, но активируют фазу 2. Эксперименты, в которых то же количество анионов добавляли к клеткам на разных стадиях МО, показали, что их эффект зависит от фазы МО, в которой находятся клетки в момент добавления аниона, и его типа. Анионы различались по эффективности действия на МО. Так, при добавлении анионов в конце фазы 2 они фиксировали текущую дискоидную форму с эффективностью, уменьшающейся в ряду: NO₃⁻ > NO₂⁻ = Cl⁻ = Br⁻ > F⁻ > I⁻. При добавлении анионов в конце фазы 3, на которой формируются стоматоциты, медленно восстанавливалась дискоидная форма клеток и соответствующий ряд эффективности имел такой вид: NO₃⁻ = NO₂⁻ > F⁻ > Br⁻ = Cl⁻ > I⁻. Выдвигается гипотеза, согласно которой эффект анионов на МО обусловлен не увеличением ионной силы или изменением трансмембранного потенциала мембраны, а специфическими взаимодействиями анионов с анионным переносчиком AE1, которые контролируют его текущую конформацию и вероятность нахождения белка в том или ином конформационном состоянии, что, в свою очередь, влияет на форму эритроцитов.

The effect of monovalent ions Cl⁻, F⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻ and NO₂⁻ on the sequence of the change of erythrocytes shape, morphological response (MR) in isotonic medium has been investigated. It has been found that MR, consisting of three phases proceeds in a different way in the media containing and non-containing the mentioned anions. The rise of anion concentrations from 0 to 20 mM results firstly in inhibiting of MR phase 3 and then sequentially to inhibiting the phases 2 and 1. Thus in the media with high concentration of anions (10 mM and higher) the MR is completely suppressed. This behavior is characteristics for all the anions excluding anions I⁻, which do not inhibit the phase 1, but activate the phase 2. The experiments where the same number of anions were added to the cells at various MR stages, have shown, that their effect depends on the phase of MR wherein the cells are at the moment of adding anion, and its type. The anions differed on the efficiency of the effect on MR. So, when adding anions at the end of phase 2 they fixed current discoid shape with the efficiency, descending in the row: NO₃⁻ > NO₂⁻ = Cl⁻ = Br⁻ > F⁻ > I⁻. When adding the anions at the end of phase 3 at whereat the stomatocytes are formed, slow recovery of discoid shape of cells and the corresponding row of the efficiency was as follows: NO₃⁻ = NO₂⁻ = F⁻ > Br⁻ = Cl⁻ > I⁻. There is hypothesized about stipulated effect of anions on MR by means of not the increased ionic strength or change in transmembrane potential of membranes, but by the specific interactions of anions with anion carrier AE1, controlling its current confirmation and possibility of protein being in certain confirmation state that in its turn affects the shape of erythrocytes.

Современные аспекты подготовки беременных к родам

О.А. КУЗЬМИНА, В.Е. ЧАДАЕВ, И.Ю. КУЗЬМИНА

Харьковский национальный медицинский университет

Actual Aspects in Preparing Pregnant Women to Labour

О.А. KUZMINA, V.E. CHADAYEV, I.YU. KUZMINA

Kharkov National Medical University, Ukraine

Цель исследования – разработка новых методов биологического созревания шейки матки и индукция родовой деятельности.

Обследовано две группы женщин со слабостью родовой деятельности при несвоевременном излитии околоплодных вод: первая – 22 женщины, которым с целью коррекции родовой деятельности капельно внутривенно вводили простин Е (ампулы по 1 мл, содержащие 1 мг/мл динопростона, разводили в 400 мл физиологического раствора); вторая – 26 рожениц, которым для лечения слабости родовой деятельности внутривенно капельно вводили простин F_{2a} (ампулу простина F_{2a}, содержащую 5 мг динопроста, разводили в 500 мл изотонического раствора хлорида натрия).

Введение простина Е роженицам первой группы способствовало уменьшению продолжительности родов у первородящих на 16,0%, у повторнородящих – на 35,0%. Общая продолжительность родов у первородящих, получавших простин Е₂, на фоне слабости родовой деятельности составила 8,5±0,9 ч, у повторнородящих – 6,1±0,5 ч. Применение простина Е₂ привело к уменьшению числа оперативных вмешательств (до 8,9%) по сравнению с использованием обычных средств родостимуляции (24,6%).

При подготовке к родам простагландинами увеличивается количество успешных родов через естественные родовые пути, а по сравнению с оперативным родоразрешением способствует улучшению состояния шейки матки и ее “дозреванию”. Применение простагландинов при слабости родовой деятельности на фоне несвоевременного излития околоплодных вод и “незрелой” шейки матки позволяет предупредить дискоординированную родовую деятельность, которая может развиваться при использовании сокращающих средств без релаксации шейки матки.

The research was aimed to designing the new methods for uterine neck biological maturation and labor activity induction.

We examined two groups of women with uterine inertia at an untimely amniotic fluid discharge: the first group (22 women) received intravenously dropwise prostin E (1ml ampoules, comprising 1 mg/ml dinoprost, diluted with 400 ml physiological solution) for labour activity correction; the second one comprised 26 women in labour, received intravenously dropwise prostin F_{2a} (prostine F_{2a} ampoule, containing 5 mg dinoprost, diluted in 500 ml sodium chloride isotonic solution).

Prostin E introduction into the first group's women in labour contributed to the reduction of labour duration by 16.0 and 35.0% in primipara and multipara, correspondingly. The total labour duration in primipara, received prostin E₂ at the uterine inertia background, was 8.5±0.9 hrs and 6.1±0.5 hrs in pluripara. The prostin E₂ application resulted in a decrease in operative measure number (down to 8.9%) compared to the standard means for labour stimulation (24.6%).

When using prostaglandins for labour preparing, there are an increase in a number of successful vaginal deliveries, compared to the operative ones, improvement in uterine neck state and its “maturation”. The prostaglandin application at uterine inertia at the background of untimely amniotic fluid discharge and “immature” uterine neck enables preventing the discoordinated labour activity, which may develop if using contractile means without uterine neck relaxation.

Влияние дискоординированной и чрезмерно сильной родовой деятельности на состояние новорожденных

О.А. КУЗЬМИНА

Харьковский национальный медицинский университет

Effect of Parodynia and Very Strong Labour on Newborns' State

O.A. KUZMINA

Kharkov National Medical University, Ukraine

Цель исследования – определение состояния новорожденных, родившихся от матерей, перенесших дискоординированную (ДРД) и чрезмерно сильную (ЧСРД) родовую деятельность.

Проведен анализ 47 историй родов, осложненных ДРД и ЧСРД: в 26 случаях во время родов наблюдалась ДРД, в 21 – ЧСРД. При этом основными факторами риска развития были преждевременное излитие околоплодных вод при “незрелой” шейке матки, крупный плод и многоводие. ДРД чаще наблюдалась у первородящих старше 30 лет, ЧСРД – у первородящих моложе 18 лет при маловодии, а также различных экстрагенитальных заболеваний матери, в основном на фоне психических и гормональных нарушений.

При ДРД состояние новорожденных по шкале Апгар оценено $6,3 \pm 0,5$, что соответствовало средней степени гипоксии. В 11 случаях (42%) проведена операция “кесарево сечение”, в результате которой значительно улучшилось состояние детей при рождении. Однако при оперативном родоразрешении у 8 новорожденных (30%) в неонатальном периоде развилось нарушение мозгового кровообращения.

При ЧСРД основным заболеванием у новорожденных (18 детей – 85%) наблюдался респираторный дистресс – “синдром плода”, возможно развивающийся на фоне нарушения маточно-плодово-плацентарного кровообращения. Различные травмы получили 7 новорожденных (31%): кефалогематомы, перелом ключицы, кровоизлияние в головной и спинной мозг.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что ДРД и ЧСРД являются факторами, значительно ухудшающими состояние новорожденного и зачастую осложняющие течение неонатального периода. Результаты исследований позволяют сделать вывод о целесообразности проведения дородовой подготовки беременных, имеющих развитие ДРД и ЧСРД, с целью профилактики возможных осложнений для матери и плода.

Research aim is to determine the state of newborns, born from the mothers suffered from parodynia (PRD) and very strong labour (VSL).

There were analyzed 47 labour histories complicated with PRD and VSL: in 26 cases during labours there was observed PRD and VSL in 21 ones. Herewith main risk factors of the development were premature discharge of water at immature uterus neck, large foetus and hydramnios. PRD was found more frequently in primipara aged older than 30 years, VSL was found in primipara younger than 18 at hypamnios, as well as different extragenital diseases of a mother, basically on the background of psychic and hormonal impairments.

At PRD the state of newborns on the Apgar scale was assessed as 6.3 ± 0.5 , that corresponded to an average hypoxia rate. In 11 cases (42%) there was performed caesarean section, resulted in significantly improvement of the state of babies at birth. However at operative labours in 8 newborns (30%) in neonatal period there was developed a disorder of brain blood flow.

At VSL the main disease in newborns (18 babies – 85%) was respiratory distress, “foetus syndrome”, likely developing on the background of impairment of uterus-foetus-placenta blood flow. Seven newborns (31%) were subjected to different traumas: cephalhematomas, fracture of clavicle, haemorrhages into brain and spinal cord.

When analyzing the obtained data, it should be noted that PRD and VSL are the factors significantly aggravating the course of neonatal period. The research results allow to conclude about the expediency of performing antenatal preparation of pregnant women with the developing PRD and VSL with the aim of prophylaxis of possible complications for mother and foetus.