



**Тезисы конференции молодых ученых “Холод в биологии и медицине 2006”  
24-25 мая 2006, г. Харьков**

<i>Горохова Н.А.</i> Криоконсервирование фетальных фибробластоподобных клеток человека методом витрификации.....	423
<i>Кофанова О.А.</i> Влияние глицерола на активность $Ca^{2+}$ -АТФазы и асимметричное распределение липидов в мембране эритроцитов человека.....	424
<i>Мусина И.А.</i> О влиянии озона на сохранность эритроцитов человека, криоконсервированных в среде, содержащей декстран.....	425
<i>Ямпольская Е.Е., Дубрава Т.Г., Гурина Т.М., Гольцев А.Н.</i> Изменение функционального состояния кроветворных клеток фетальной печени в зависимости от режимов криоконсервирования.....	426
<i>Петренко Ю.А.</i> Морфологический и фенотипический анализ различных популяций клеток эмбриональной печени человека после выделения и криоконсервирования.....	427
<i>Тимон В.В.</i> Оценка состояния митохондрий в клетках после криоконсервирования.....	428
<i>Сомова Е.В.</i> Влияние различных концентраций озонированных растворов на динамику раневого процесса при холодовых повреждениях кожи крыс.....	429
<i>Хоменко М.В.</i> Активность $Ca^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека в условиях гипертонии при различных температурах.....	430
<i>Луценко Д.Г., Бабийчук В.Г.</i> Нейро- и ангиоархитектоника головного мозга крыс разного возраста после гипотермического воздействия.....	431
<i>Дудецкая Г.В., Юрчук Т.А., Устиченко В.Д., Алабедаькарим Н.М., Бондаренко Т.П.</i> Регидратированные адренкортикоциты как модель криоконсервированных стероидпродуцирующих клеток.....	432
<i>Писаренко Н.А., Рамазанов В.В.</i> Влияние непроникающих криопротекторов и скорости охлаждения на гипертонический криогемолиз эритроцитов человека.....	433
<i>Трифонов А.В., Лаврик А.А., Гулевский А.К.</i> Воздействие фракции до 5 кДа крови молочных телят (Актовегин) на перевиваемые линии клеток.....	434
<i>Даниленко Н.А.</i> Модифицирующее влияние хлорида алюминия на чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу.....	435
<i>Александрова Д.И., Бондаренко В.А.</i> Влияние pH, температуры на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу.....	436
<i>Перчик О.А.</i> Сравнительное изучение влияния криоконсервированного экстракта плаценты и препарата “Овестин” на микрофлору влагалища женщин с урогенитальными расстройствами в период климактерия.....	437
<i>Абакумова Е.С., Моисеева Н.Н., Долгих О.Л., Гулевский А.К.</i> Изучение язвозаживляющего действия низкомолекулярной фракции (до 5 кДа), выделенной из криогемолизата крови молочных телят, на модели хронической язвы желудка у крыс.....	438
<i>Зубов П.М., Зубова О.Л.</i> Структурные и функциональные показатели эритроцитов кордовой и донорской крови в норме и после криоконсервирования.....	439
<i>Сафранчук О.В., Гольцев А.Н.</i> Влияние температурного фактора на развитие аденокарциномы Эрлиха.....	440
<i>Еришов С.С.</i> К вопросу о гипертоническом криогемолизе эритроцитов млекопитающих.....	441
<i>Мищенко А.Г., Горбунов Л.В.</i> Инициация внеклеточного кристаллообразования при замораживании спермиев быка.....	442
<i>Лаврик А.А., Стегний Б.Т., Белоконь В.С.</i> Система паспортизации перевиваемых клеточных линий, хранящихся в низкотемпературных банках.....	443
<i>Водопьянова Л.А., Жегунов Г.Ф.</i> Криоконсервирование клеток костного мозга собак под защитой проникающих и непроникающих криопротекторов.....	444
<i>Пакулова О.К.</i> Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на гипертонический лизис эритроцитов человека.....	445
<i>Ковалёв Г. А., Черкашина Д.В.</i> Модулирование состояния прооксидантно-антиоксидантной системы головного мозга ксенопрепаратами при экспериментальном хроническом алкогольном отравлении.....	446
<i>Салина А.С., Горбунов Л.В.</i> Оценка эффективности технологий криоконсервирования ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена.....	447
<i>Кондаков И.И.</i> Экспериментальный атеросклероз и лейкоцитарный клиренс липидов при аллогенной трансплантации криоконсервированной плаценты.....	448
<i>Мищенко Ю.Г., Горбунов Л.В.</i> Влияние разного качества эмбрионов млекопитающих на показатели оцениваемой технологии криоконсервирования.....	449



**Abstracts of the Conference of Young Scientists “Cold in Biology and Medicine 2006”  
May, 24-25th, 2006**

<i>Gorokhova N.A.</i> Cryopreservation of Human Fetal Fibroblast-like Cells by Vitrification.....	423
<i>Kofanova O.A.</i> Effect of Glycerol on Ca <sup>2+</sup> -ATPase Activity and Asymmetrical Distribution of Lipids in Human Erythrocyte Membrane.....	424
<i>Musina I.A.</i> Effect of Ozone on Integrity of Human Erythrocytes, Cryopreserved in Dextrane Based Solution.....	425
<i>Yampolskaya E.Ye., Dubrava T.G., Gurina T.M., Goltsev A.N.</i> Changes in Functional State of Foetal Liver Haemopoietic Cells Depending on Cryopreservation Regimen.....	426
<i>Petrenko Yu.A.</i> Morphological and Phenotypical Analysis of Different Populations in Human Embryonic Liver Cells After Isolation and Cryopreservation.....	427
<i>Parfenova V.V.</i> Assessment of Mitochondria State in Frozen-Thawed Cells.....	428
<i>Somova E.V.</i> Effect of Dissolved Ozone in Different Concentrations on Wound Healing Process During Cold Damages of Rat Skin.....	429
<i>Khomenko M.V.</i> Human Erythrocyte Ca <sup>2+</sup> -ATPase Activity Under Hypertonic Conditions at Different Temperatures.....	430
<i>Lutsenko D.G., Babijchuk V.G.</i> Brain Neuro- and Angioarchitectonics in Rats of Different Age after Hypothermic Effect.....	431
<i>Dudetskaya G.V., Yurchuk T.A., Ustichenko V.D., Alabedalkarim N.M., Bondarenko T.P.</i> Rehydrated Adrenocorticocytes as Model of Cryopreserved Steroid-Producing Cells.....	432
<i>Pisarenko N.A., Ramazanov V.V.</i> Influence of Non-Penetrative Cryoprotectants and Cooling Rate on Hypertonic Cryohemolysis of Human Erythrocytes.....	433
<i>Trifonova A.V., Lavrik A.A., Gulevsky A.K.</i> Effect of Fraction up to 5 kD of Vealer Blood (Actovegin) on Inoculated Cell Lines.....	434
<i>Danilenko N.A.</i> Modifying Effect of Aluminium Chloride on Human Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Cryohemolysis.....	435
<i>Aleksandrova D.I., Bondarenko V.A.</i> Influence of pH, Temperature on Erythrocyte Resistance to Hypertonic Stress.....	436
<i>Perchik O.A.</i> Comparative Study of Influence of Cryopreserved Placenta Extract and “Ovestin” Preparation on Vaginal Microflora in Women with Urogenital Disorders During Climacterium.....	437
<i>Abakumova E.S., Moiseyeva N.N., Dolgikh O.L., Gulevsky A.K.</i> Studying of Ulcer-healing Effect of Low Molecular Fraction (up to 5 kD), Isolated From Cryohemolysate of Vealer Blood on Model of Chronic Gastric Ulcer in Rats.....	438
<i>Zubov P.M., Zubova O.L.</i> Structural and Functional Indices of Cord and Donor Blood Erythrocytes in Norm and Following Cryopreservation.....	439
<i>Safranchuk O.V., Goltsev A.N.</i> Temperature Factor Effect on Ehrlich Adrenocarcinoma Development.....	440
<i>Ershov S.S.</i> To the question of hypothermal mammalian erythrocyte cryohemolysis.....	441
<i>Mischenko A.G., Gorbunov L.V.</i> Initiation of Extracellular Crystal Formation When Freezing Bovine Sperm.....	442
<i>Lavrik A.A., Stegnyy B.T., Belokon V.S.</i> Certification System for Recultured Cell Lines, Stored at Low Temperature Banks.....	443
<i>Vodopyanova L.A., Zhegunov G.F.</i> Cryopreservation of canine bone marrow cells under protection of penetrating and non-penetrating cryoprotectants.....	444
<i>Pakulova O.K.</i> Influence of Lyotropic Series Anions in Dehydration Medium on Hypertonic Lysis of Human Erythrocytes.....	445
<i>Kovalev G.A., Cherkashina D.V.</i> Modulating the State of Prooxidant-Antioxidant Brain System With Xenopreparations Under Experimental Chronic Alcohol Poisoning.....	446
<i>Salina A.S., Gorbunov L.V.</i> Estimation of Cryopreservation Technology Efficiency for Mammalian Oocytes within a Wide Range of Heat Exchange Rates.....	447
<i>Kondakov I.I.</i> Experimental Atherosclerosis and Leukocyte Clearance of Lipids Under Allogenic Transplantation of Cryopreserved Placenta.....	448
<i>Mischenko Yu. G., Gorbunov L.V.</i> Influence of Different Quality of Mammalian Embryos on Indices of Cryopreservation Technology Under Study.....	449

# Криоконсервирование фетальных фибробластоподобных клеток человека методом витрификации

Н.А. ГОРОХОВА

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

## Cryopreservation of Human Fetal Fibroblast-like Cells by Vitrification

N.A. GOROKHOVA

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

Витрификация является одним из альтернативных способов криоконсервирования. В настоящее время успешно витрифицируют образцы тканей небольшого размера, яйцеклетки, зиготы, эмбрионы ранних стадий, колонии эмбриональных стволовых клеток. Однако вопросы оптимизации данного метода и разработки технологических этапов для витрификации клеточных суспензий остаются актуальными.

Цель работы – определить возможность использования метода витрификации для криоконсервирования суспензии фетальных фибробластоподобных клеток человека.

В состав витрифицирующих растворов (ВР) включали ДМСО 10%; ЭГ (10, 15, 20, 25%); 1,2-ПД (10, 15, 20, 25%) и сахарозу (0,5, 1, 1,5, 2 М), комбинируя их различные концентрации. Скрининг растворов проводили с учетом прозрачности стекла, устойчивости к растрескиванию в азоте и парах азота, а также по отсутствию рекристаллизации при отогреве. Для витрификации фибробластоподобных клеток к клеточной суспензии добавляли в два этапа маточный ВР, затем полученные образцы объемом 0,5 мл в пластиковых криоконтейнерах помещали в жидкий азот. Отогрев образцов проводили на водяной бане при +37°C. Отогретую суспензию отмывали в 0,5М растворе сахарозы и среде 199, дополненной 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой. Для удаления криопротекторов использовали двух- и трехступенчатую отмывку. Жизнеспособность клеток оценивали по трипановому синему и способности клеток к адгезии в условиях культивирования.

Для определения комбинации наименьших эффективных концентраций ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы, позволяющих ВР сохранить необходимые витрификационные свойства, проводили скрининг растворов. Из серии растворов выбрали два, образующие в жидком азоте прозрачное и стойкое стекло, которое плавилось без девитрификации при отогреве. Растворы обозначили ВР-1 (10% ДМСО, 20% ЭГ, 20% ПД и 0,5М сахарозы) и ВР-2 (10% ДМСО, 15% ЭГ, 15% ПД и 1М сахарозы).

Жизнеспособность фибробластоподобных клеток после контакта с ВР и отмывки при двух- и трехступенчатой отмывке составляла соответственно для ВР-1: 77,5±4,7 и 68,9±3,7%; ВР-2: 74,8±4,8 и 68,8±2,8%; после замораживания-отогрева для ВР-1: 65,5±2,7 и 59±3,6%; для ВР-2: 47,1±1,9 и 33,6±3,8%. Клетки сохраняли способность прикрепляться к пластику, при этом после двухступенчатой отмывки они проявляли большую способность к распластыванию.

Таким образом, была показана возможность применения метода витрификации для криоконсервирования клеточных суспензий под защитой ДМСО, ЭГ, 1,2-ПД и сахарозы.

Vitrification is one of the alternative cryopreservation methods. Nowadays, small tissue samples, oocytes, zygotes, embryos at early stages, colonies of embryonic stem cells are successfully vitrified. However, optimizations tasks of this method and development of technological stages for vitrification of cell suspensions are still actual.

Purpose of work is to find possibility of using the vitrification method for cryopreservation suspension of human fetal fibroblast-like cells.

In composition of vitrifying solutions (VS) included 10% DMSO, EG (10, 15, 20, 25 %); 1,2 – PD (10, 15, 20, 25%); and sucrose (0.5, 1, 1.5, 2 M), with combination of their different concentrations. Solution screening was performed on glass transparency, resistance to cracking in nitrogen and its vapours, as well as on absence of recrystallisation during warming. For vitrification of fibroblast-like cells to cell suspension the stock VS was added in two stages, after that the obtained 0.5 ml samples in plastic cryocontainers were placed into liquid nitrogen. Sample thawing was performed on water bath at +37°C. The thawed suspension was washed-out in 0.5 M solution of sucrose and in medium 199, supplemented with 10 % fetal calf serum. For removal of cryoprotectants two- and three-stage washing-outs were used. The viability of cells was assessed with trypane blue staining and adhesion ability of cells during culturing.

For determination of combination the least effective concentrations of EG, 1.2-PD and sucrose, enabling VS to keep essential vitrifying properties, solution screening was performed. Among the series of solutions two were chosen, those forming in liquid nitrogen the transparent and stable glass, which melted with no devitrification during warming. The solutions were defined as VS-1 (10% DMSO, 20% EG, 20% PD and 0.5 sucrose) and VS-2 (10% DMSO, 15% PD and 1M sucrose).

Viability of fibroblast-like cells after the contact with VS and washing-out during two- and three-step washing-outs made correspondingly to VS-1: 77.5±4.7 and 68.9±3.7%; VS-2: 74.8±4.8 and 68.8±2.8%; after freezing-thawing – for VS-1: 65.5±2.7 and 59±3.6%; for VS-2: 47.1±1.9 and 33.6±3.8%. Cells kept the ability of adhering to plastic, herewith after two-step washing-out they showed higher ability to flattening.

In such a way, there was shown the ability to use vitrification method for cryopreservation of cell suspensions under protection of DMSO, EG, 1.2-PD and sucrose.

# Влияние глицерола на активность $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и асимметричное распределение липидов в мембране эритроцитов человека

О.А. КОФАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Glycerol Effect on $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Activity and Asymmetric Lipid Distribution in Human Erythrocyte Membrane

O.A. KOFANOVA

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

Изменение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  играет важную роль в регуляции структурно-функционального состояния различных субклеточных систем. В эритроцитах человека  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза является единственной структурой, осуществляющей транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  против градиента концентрации. Поскольку при криоконсервировании эритроцитов человека наиболее часто используется глицерол, то изучение его влияния на структуру плазматической мембраны и функциональную активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы необходимо для понимания механизмов стабилизации клеток к действию стрессовых факторов.

Цель данной работы – изучение влияния глицерола на каталитическую активность  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса и асимметричное распределение фосфатидилсерина (ФС) в мембранах эритроцитов человека.

Установлено, что увеличение содержания криопротектора в среде вызывает концентрационно-зависимое изменение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. При использовании различных модельных систем (сапонин-пермеабилizированных клеток и белых теней) были выявлены особенности модификации глицеролом каталитической активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса, связанные с участием регуляторных эндогенных модуляторов. В белых тенях  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазная активность постепенно снижается при увеличении концентрации глицерола. В сапонин-пермеабилizированных клетках изменение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса в присутствии криопротектора имеет бифазный характер с максимумом активности при 10%-м глицероле. Применение ингибитора кальмодулин-зависимых реакций R24571 позволило установить, что активация глицеролом  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы возможна только при участии кальмодулина. В обеих моделях при использовании криопротекторных концентраций глицерола отмечено снижение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса на 20-30% по сравнению с контролем, что приводит к повышению уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и может вызвать негативные последствия. Активация скремблазы при повышении содержания  $\text{Ca}^{2+}$  разрушает асимметрию плазматической мембраны и ведет к экстернализации ФС. Воздействие глицерола на перераспределение ФС в мембране, оцененное по связыванию аннексина V-FITC с эритроцитами, показало, что достаточно продолжительный контакт клеток с криопротектором не оказывает заметного влияния на экспонирование ФС на внешнюю поверхность мембраны. Следовательно, увеличение уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванное ингибированием активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы под влиянием глицерола, не оказывает негативного влияния на структуру липидного бислоя.

Таким образом, глицерол может оказывать криопротекторное действие не только вследствие изменения свойств раствора, но и его способности модифицировать биохимические процессы в клетке, способствуя их стабилизации в стрессовых условиях.

Change in concentration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  plays an important role in regulating structural and functional state of different subcellular systems. In human erythrocytes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is the only structure, realising  $\text{Ca}^{2+}$  transport against concentration gradient. Since glycerol is the most applied in cryopreservation of human erythrocytes, studying its effect on plasmatic membrane structure and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase functional activity is necessary for understanding mechanisms of cell stabilisation to stress factors.

This research was aimed to study glycerol effect on  $\text{Ca}^{2+}$ -pump catalytic activity and asymmetric distribution of phosphatidyl serine (PS) in human erythrocyte membranes.

The augmentation of cryoprotectant content in the medium was established to cause a concentration-dependent change in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. When using different model systems (saponin-permeabilised cells and white ghosts) there were revealed the peculiarities of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump catalytic activity modification with glycerol, associated to the participation of regulatory endogenous modulators. In white ghosts the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity gradually reduces with augmenting glycerol concentration. In saponin-permeabilised cells a change in  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity at cryoprotectant presence is of biphasic character with the maximum activity under 10% glycerol. The applying of inhibitor of calmodulin-dependent reactions R24571 enables to establish that  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activation with glycerol was possible only with calmodulin participation. A decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -pump activity by 20-30% in comparison with the control was noted in both models when using cryoprotective concentrations of glycerol, that inevitably increased the level of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and could cause negative consequences. Scramblase activation under  $\text{Ca}^{2+}$  increase destroys plasmatic membrane asymmetry and results in PS externalisation. Glycerol effect on PS redistribution in a membrane, assessed by annexin V-FITC binding with erythrocytes demonstrated that quite a long cell contact with cryoprotectant did not significantly affect PS exposure onto external membrane surface. Consequently,  $\text{Ca}^{2+}$  level augmentation, caused by inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity under glycerol effect does not negatively affect the structure of lipid bilayer.

Thus, glycerol can cause a cryoprotective effect not only due to a change in solution properties, but its capability to modify biochemical processes in cell, by contributing their stabilisation under stress conditions.



# О влиянии озона на сохранность эритроцитов человека, криоконсервированных в среде, содержащей декстран

И.А. МУСИНА

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

## About Ozone Effect on Integrity of Human Erythrocytes, Cryopreserved in Dextran-Containing Medium

I.A. MUSINA

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

В настоящее время активно исследуется влияние озона на биологические системы. Установлено, что действие озона имеет дозозависимый характер, причем при использовании его малых доз проявляются эффекты стимуляции биологических функций, а при превышении некоторой пороговой дозы – их ингибирование.

Цель работы – исследование возможности использования малых доз озона для повышения сохранности эритроцитов человека после криоконсервирования.

Эритроциты получали из донорской крови человека, трижды отмывая их от плазмы физиологическим раствором. Полученную эритроцитарную массу смешивали в объемном соотношении 1:1 с криозащитным раствором, содержащим глюкозу, сахарозу, хлористый натрий, ДМСО 7% и декстран 20%. После инкубирования в криозащитной среде при комнатной температуре образцы замораживали погружением в жидкий азот. Замороженные образцы оттаивали на водяной бане при 40°C и отмывали физиологическим раствором при 37°C. Две последующие отмывки проводили озонированным физиологическим раствором с концентрациями растворенного озона 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мг/л. Контрольные образцы отмывали физиологическим раствором, не содержащим озон. Исследовали сохранность эритроцитов, замороженных в средах с аналогичным составом и концентрациями декстрана 5, 10 и 15%. Образцы отмывали физиологическим раствором с концентрацией растворенного озона 0,2 мг/л. Сохранность эритроцитов определяли по выходу гемоглобина на приборе СФ-4А.

Показано, что при некоторых оптимальных дозах озона повышается сохранность эритроцитов после криоконсервирования. После обработки озоном в дозах 0,2 и 0,3 мг/л она составила 95,04±0,43 и 93,15±0,32%, соответственно, а в контрольных образцах – 89,32±0,58%. В результате использования доз озона выше или ниже 0,2-0,3 мг/л отмечено снижение сохранности эритроцитов. Обработка озоном в дозе 0,2 мг/л способствовала также повышению сохранности клеток, замороженных в средах, содержащих 5, 10 и 15% декстрана, хотя сохранность таких клеток была значительно ниже, чем при замораживании в среде, содержащей 20% декстрана.

Таким образом, обработка криоконсервированных эритроцитов человека озоном в дозах 0,2-0,3 мг/л позволяет повысить сохранность данных клеток на 2-6%.

Nowadays ozone influence on biological systems has been actively investigated. Ozone effect has been established to have a dose-dependent character, moreover if using it under low doses the stimulation effects of biological functions are manifested, but their inhibiting occurs if to exceed a certain threshold dose.

The research was targeted to study the possibility of using low ozone doses to augment human erythrocyte integrity after cryopreservation.

Erythrocytes were derived from human donor blood, three-fold washed-out of plasma with physiological solution. Obtained erythrocyte mass was mixed in 1:1 volume ratio with cryoprotective solution, containing glucose, sucrose, sodium chloride, 7% DMSO and 20% dextran. Following incubation in cryoprotective medium at room temperature the samples were frozen by immersing into liquid nitrogen. Frozen samples were thawed on water bath at +40°C and washed out with physiological solution at 37°C. Two following washing-out procedures were performed using an ozonized physiological solution with 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 mg/l dissolved ozone concentrations. Control samples were washed-out with ozone-free physiological solution. Integrity of erythrocytes, frozen in media of similar composition and 5, 10 and 15% dextran concentration were studied. Samples were washed-out with physiological solution with 0.2 mg/l dissolved ozone concentration. Erythrocyte integrity was determined by hemoglobin yield using SF-4A device.

Under certain optimal ozone doses the erythrocyte integrity was shown to augment after cryopreservation. After treating with 0.2 and 0.3 mg/l ozone it made 95.04±0.43 and 93.15±0.32%, correspondingly and in the control samples it was 89.32±0.58%. As a result of using higher or lower than 0.2-0.3 mg/l ozone doses there was noted a decrease in erythrocyte integrity. Treatment with 0.2 mg/ml ozone contributed to an increase in the integrity of cells, frozen in the media, containing 5, 10 and 15% dextran as well, although the integrity of these cells was significantly lower than during freezing in 20% dextran-containing medium.

Thus, the treatment of cryopreserved human erythrocytes with 0.2-0.3 mg/l ozone enables to augment these cells integrity by 2-6%.

# Изменение функционального состояния кроветворных клеток фетальной печени в зависимости от режимов криоконсервирования

Е.Е. ЯМПОЛЬСКАЯ, Т.Г. ДУБРАВА, Т.М. ГУРИНА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Change of Functional State of Fetal Liver Hematopoietic Cells Depending on Cryopreservation Protocol

E. YE. YAMPOLSKAYA, T. G. DUBRAVA, T. M. GURINA, A. N. GOLTSEV

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

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) – прототип модели определения общего биологического потенциала стволовых клеток млекопитающих. В связи с их востребованностью необходима разработка эффективных методов криоконсервирования и долгосрочного хранения как обязательных компонентов технологического процесса при использовании в клинической практике.

Цель работы – исследование влияния различных режимов криоконсервирования на структурно-функциональные параметры стволовых кроветворных клеток фетальной печени (КФП) в системе *in vitro*.

Эксперименты проводились на мышах линии СВА 12-14-недельного возраста массой 18-20 г. Манипуляции с животными выполнены согласно Международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985). КФП со сроком гестации 13-15 суток были получены на среде 199 с 3% эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия.

Криоконсервирование КФП осуществляли под защитой 5 или 7,5% диметилсульфоксида (ДМСО) на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) со скоростью 1°C/мин до –40°C (режим Крио-1) и 1°C/мин до –40°C с 10-минутной экспозицией на плато кристаллизации, а также со скоростью 10°C/мин от –40 до –80°C (режим Крио-2) с последующим погружением образцов в обоих случаях в азот.

Содержание колониеобразующих единиц грануломоноцитопоеза (КОЕ-ГМ) в КФП определяли в системе *in vitro* по количеству формирующихся в агаровой культуре колоний (КОЕ) и кластеров (КлОЕ). Их идентификацию в нативном материале осуществляли на 7-е сутки, в криоконсервированном – на 14-е сутки культивирования. Для оценки особенностей распределения кроветворных клеток различной степени дифференцировки был введен индекс пролиферативной активности (ИПА – КОЕ/КлОЕ).

Установлено, что максимальную сохранность КОЕ-ГМ КФП обеспечивал режим Крио-2 (5% ДМСО). При режиме Крио-1 с обеими концентрациями ДМСО в условиях сниженного количества КОЕ-ГМ сохранялся сбалансированный состав их субпопуляций (КОЕ и КлОЕ), соответствующий таковому в интактных КФП. Перераспределение субпопуляционного состава среди КОЕ-ГМ является основанием для использования различных режимов криоконсервирования как фактора дифференциального воздействия на определенные компартменты кроветворных предшественников фетальной печени.

Hematopoietic stem cells (HSCs) are prototypes of the model of determination of general biological potential of mammalian stem cells. Due to their being in demand there is a need in development of effective methods of cryopreservation and long-term storage as mandatory components of technological process when using them in clinical practice.

The research purpose is to study the influence of different cryopreservation regimens on structural and functional parameters of fetal liver hematopoietic stem cells *in vitro*.

The experiments were done in CBA mice of 12-14 weeks' age and 18-20 g weight. In accordance with “European convention of protection vertebrate animals used for experimental and other experimental purposes” (Strasbourg, 1985). Fetal liver cells (FLCs) with the gestation term of 13-15 days were obtained with medium 199 and embryonic calf serum 3 % and sodium citrate 2%.

FLC cryopreservation was realized under protection of either 5 or 7.5 % DMSO with programmable freezer “Cryoson” (Germany) with the rate 0°C/min down to –40°C (regimen Cryo-1) and 1C/min down to –40°C with 10 min's exposure on crystallization plateau, as well as with the rate of 10°C/min from –40°C down to –80°C (regimen Cryo-2) with following plunging of the samples into nitrogen in both cases.

The content of colony-forming units of granulomonocytopenesis (CFU-GM) in FLCs was found *in vitro* on the number of colonies in agar culture (CFU) and clusters (CIFU) being formed. Their identification in native material was performed to the 7-th day, in and to the 14-th day of culturing in cryopreserved one. To estimate the peculiarities of distribution of hematopoietic cells with different differentiation extent proliferative activity index was defined (PAI) (CFU/CIUE).

There was found, that regimen Cryo-2 (5% DMSO) provided the highest survival of CFU-GM. When using regimen Cryo-1 with both DMSO concentrations at decreased amount of CFU-GM the balanced composition of their subpopulations (CFU-CIUE) preserved. This composition corresponded to the one for intact FLCs. Redistribution of subpopulation CFU-GM composition is the reason of using different cryopreservation regimens as the factor of differential influence on certain compartments of hematopoietic precursors of fetal liver.

# Морфологический и фенотипический анализ различных популяций клеток эмбриональной печени человека после выделения и криоконсервирования

Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Morphological and Phenotypic Analysis of Various Populations of Human Embryonic Liver Cells After Isolation and Cryopreservation

YU.A. PETRENKO

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

Эмбриональная печень человека (ЭПЧ) 8-12 недель гестации содержит большое количество гемопоэтических, гепатических и мезенхимальных клеток-предшественников. В работе была предпринята попытка охарактеризовать данные популяции клеток, определить их устойчивость к факторам выделения и криоконсервирования.

Ультраструктуру клеток ЭПЧ исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К, снабженного системой съема и анализа изображения. Фенотипический анализ клеток ЭПЧ проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD Biosciences) или EPICS-Altra Flow Sorter (Beckman Coulter). Криоконсервирование клеток проводили под защитой 5% ДМСО со скоростью охлаждения 1°C/мин до -80°C, после чего клетки погружали в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане при 37°C.

Электронно-микроскопические исследования ультратонких срезов ЭПЧ 8-12 недель гестации позволили оценить морфологические особенности и локализацию основных ее клеточных популяций. После ферментативного выделения критических изменений в морфологии клеток не наблюдалось. В то же время была установлена разная устойчивость клеток гемопоэтического и гепатического ростков к факторам криоконсервирования. Гепатические клетки оказались менее устойчивы, что, главным образом, проявлялось в нарушениях внутриклеточных структур.

Кроме клеток эритроидного и гепатического рядов, представляющих большинство в ЭПЧ данного срока гестации, была выделена популяция фибробластоподобных клеток, активно пролиферирующих *in vitro*. Фенотипический анализ клеток 4-го пассажа установил наличие CD29, CD44, CD105, HLA-ABC, слабую экспрессию CD49D и отсутствие CD33, CD34, CD4, CD45 и HLA-DR антигенов. Данный фенотип был описан ранее для мезенхимальных клеток-предшественников из костного мозга и пуповинной кордовой крови.

Количество кроветворных клеток-предшественников до и после криоконсервирования было оценено по экспрессии клетками CD34 и CD38 антигенов. Содержание ранних кроветворных предшественников с фенотипом CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> составило 0,46±0,28%. После криоконсервирования их жизнеспособность составила около 80%. При оценке колониеобразующей активности ККП после криоконсервирования наблюдалось незначительное снижение общего количества образованных колоний по сравнению со свежeweделенными клетками.

Таким образом, в данной работе на основании морфологических и фенотипических исследований представлены различные популяции клеток ЭПЧ, а также показана их устойчивость к факторам выделения и криоконсервирования.

Human embryonic liver (HEL) of 8-12 gestation weeks contains a big number of hematopoietic, hepatic and mesenchymal progenitor cells. The attempt to characterize these cell populations as well as to determine their resistance to isolation and cryopreservation factors has been done.

The HEL cell ultrastructure was studied using PEM-125K electron microscope, supplied with the image recording and analysing system. Cells were phenotypically analysed by flow cytometry using FACS Calibur (BD Biosciences) or EPICS-Altra Flow Sorter (Beckman Coulter). Cells were cryopreserved under protection of 5% DMSO with the cooling rate 1°C/min down to -80°C, afterwards samples were immersed into liquid nitrogen. Thawing was done at water bath at 37°C.

Electron-microscopy studies of the ultrathin sections of 8-12 gestation weeks' HEL allowed to assess the morphological peculiarities and localization of its main cell populations. After non-enzymatic isolation no critical changes in cell morphology were observed. At the same time different resistance of cells of hematopoietic and hepatic lineage to cryopreservation factors was established. Hepatic cells appeared to be less resistant and that was mainly manifested by disorders of intracellular structures.

Besides cells of erythroid and hepatic lineages that represent the majority in HEL of the indicated gestation terms, the population of fibroblast-like cells, that could actively proliferate *in vitro* was isolated.

The flow cytometry analysis of the 4<sup>th</sup> passage cells indicated the presence of CD29, CD44, CD105, HLA-ABC, low expression of CD49D and no CD33, CD34, CD4, CD45 and HLA-DR antigens. This phenotype was previously described for mesenchymal progenitor cells from bone marrow and umbilical cord blood. An amount of hematopoietic progenitor cells prior to and after cryopreservation was evaluated by the expression of CD34 and CD38 antigens. The content of early hematopoietic precursors with CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> phenotype was 0.46±0.28%. After cryopreservation their viability makes about 80%. When evaluating the colony-forming activity of hematopoietic progenitor cells after cryopreservation a slight reduction of total amount of colony formation in comparison with freshly isolated cells was observed.

Thus, basing on morphological and phenotypic studies this study presented the characteristics of different populations of HEL cells, as well as the indices of their resistance to isolation and cryopreservation factors.

## Оценка состояния митохондрий в клетках после криоконсервирования

В.В. ТИМОН

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

## Estimation of Mitochondria's State After Cryopreservation

V. V. TIMON

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

Процесс криоконсервирования связан с образованием внутри- и внеклеточных кристаллов льда, которые при росте могут повреждать мембранные компоненты клетки.

Цель работы – изучить состояние митохондриального аппарата клеток культуры эмбриональных фибробластов человека (ЭФЧ) после криоконсервирования.

Клетки культуры ЭФЧ окрашивали флуоресцентными красителями C2, C9 и JC-1 (предоставлены ГНУ НТК “Институт монокристаллов”) в выбранных концентрациях и криоконсервировали под защитой 10%-го ДМСО по двухэтапной программе с последующим хранением в жидком азоте. Образцы отогревали при температуре 41°C в течение 3 мин, после чего клетки высевали в культуральные флаконы и через 24 ч культивирования оценивали состояние митохондрий под флуоресцентным микроскопом при  $\mu = 520$  нм.

Контролем служили клетки нативной культуры ЭФЧ, при окрашивании которых зондами C2 и C9 под люминесцентным микроскопом наблюдали зеленое свечение, а при использовании JC-1 – зеленое и оранжевое. Митохондрии клеток культуры ЭФЧ имел характерное нитчатое строение и разветвлялся по всей клетке. По характеру распределения на поверхности митохондрий C2, C9 и JC-1 не отличались, хотя для JC-1 характерно скопление красителя с образованием так называемых J-агрегатов, что выражалось в появлении зон оранжевого свечения.

Установлено, что свечение флуоресцентных красителей после криоконсервирования сохранялось в митохондриоми пролиферирующей культуры ЭФЧ. Степень свечения зондов C9 и JC-1 в криоконсервированных образцах не отличалась от контрольных, зонд C2 при свете флуоресцентной лампы быстро терял локализацию свечения в митохондриях и выходил в цитоплазму.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранности структурной и функциональной организации митохондрий пролиферирующих клеток после криоконсервирования и возможности использования флуоресцентных зондов C9 и JC-1 для данных целей.

Cryopreservation process is related to the formation of intra- and extracellular ice crystals, which may damage membrane cell components at growth stage.

Research aim is to study the state of mitochondria apparatus of human fibroblast cell embryonic culture (HEF) after cryopreservation.

HEF culture cells were stained with C2, C9 and JC-1 fluorescent dyes (provided by SNU STC “Institute of single crystals”) under chosen concentrations and were cryopreserved under 10% DMSO protection according to two-stage program with following storage in liquid nitrogen. Samples were thawed on water bath at 41°C for 3 min, afterwards the cells were seeded in cultural flasks and in 20-24 hrs of culturing the state of mitochondria was estimated with fluorescent microscope at 520 nm wavelength.

Cells of HEF native culture served as the control, when staining them with C2 and C9 probes with luminescent microscope, there was observed a green luminescence and when using JC-1 this was orange one. HEF cell culture mitochondria was of a typical filamentous structure and branched along the whole cell. On the distribution character on the surface of mitochondria C2, C9 and JC-1 do not differ, but for JC-1 there was characteristic accumulation of dye with the formation of J-aggregates, that was expressed in appearance of zones of orange luminescence.

There was established that luminescence of fluorescent dye after cryopreservation was kept in mitochondria of HEF proliferating culture. The degree of C9 and JC-1 probe luminescence in cryopreserved sample did not differ from the control. C2 probe when being in the light of fluorescent lamp rapidly lost the localization of luminescence in mitochondria and released into the cytoplasm.

The obtained results indicate about the integrity of structural and functional organization of mitochondria of proliferating cells after cryopreservation and possibility of using C9 and JC-1 fluorescent probes for these aims.



# Влияние различных концентраций озонированных растворов на динамику раневого процесса при холодовых повреждениях кожи крыс

Е.В. СОМОВА

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

## Effect of Different Concentrations of Ozonized Solutions on Dynamics of Wound Process During Cold Damages of Rat's Skin

E.V. SOMOVA

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

Цель работы – исследовать динамику раневого процесса кожи крыс при холодовых повреждениях и использовании различных концентраций озонированного физиологического раствора.

Исследования были проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 250-350 г. Для моделирования холодовых ран использовали медный аппликатор диаметром 10 мм, охлажденный в жидком азоте до температуры  $-196^{\circ}\text{C}$ , время аппликации – 1 мин. Озонированный физиологический раствор (0,89% NaCl, pH 7,2) получали на сконструированной в ИПКиК НАНУ установке с генератором озона барьерного типа путем барботирования озон-кислородной смесью. Для замедления распада озона процедуру насыщения озоном и дальнейшее хранение раствора использовали термостат со льдом ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Концентрацию озона оценивали спектрофотометрическим методом на приборе Specord UV VIS (Германия) по поглощению света на полосе Хартли.

Исследовали пять групп животных: первая (контрольная) – лечение не проводили; вторая (контрольная) – лечение мазью “Левомиколь”; третья, четвертая и пятая – в область зоны холодовой травмы ежедневно подкожно вводили озонированный физиологический раствор с концентрацией озона 12, 6 и 1,1 мг/л соответственно. Во всех группах исследовали динамику раневого процесса (некроз и демаркация) на 1, 3, 7 и 14-е сутки после повреждения.

Излучение кожи в инфракрасном диапазоне ( $\lambda=8-14$  мкм) регистрировали портативным тепловизором. Степень обсемененности кожи и видовую принадлежность анаэробных и аэробных микроорганизмов определяли стандартными методами.

В результате проведенных исследований установлено, что после обработки раны озонированными растворами во всех исследуемых концентрациях на 3-и сутки наблюдаются полное очищение раны от анаэробных микроорганизмов, а также значительное угнетение роста микроорганизмов кишечной группы. Динамика заживления холодовых травм под влиянием различных концентраций озона имеет дозозависимый характер.

The research aim is to study the dynamics of wound process of rat's skin during cold damage and use of various concentrations of ozonized physiological solution.

The studies were performed in Wistar male rats of 250-350g weight. To model cold wounds there was used copper applicator of 10 mm diameter cooled in liquid nitrogen down to  $-196^{\circ}\text{C}$ , application time is 1 min. Ozonized physiological solution (0.89% NaCl, pH 7.2) was obtained by means of the designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine device with ozone generator of barrier type by bubbling with ozone-oxygen mixture. For slowing-down ozone decay the procedure of saturation with ozone and further storage of the solution there was used thermostat with ice ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Ozone concentration was assessed spectrophotometrically with Specord UV VIS (Germany) upon light absorption on Hartley band.

Five groups of animals have been investigated: the first one is the control with no treatment, the second one is the control with treatment by Levomecol ointment, in the third, fourth and fifth groups on daily basis into the zone of cold trauma there was subcutaneously injected ozonized physiological solution with ozone concentration of 12, 6, and 1.1 mg/l, correspondingly. In all groups the dynamics of wound process (necrosis and demarcation) to the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14 days after damage was investigated.

Skin radiation within infrared range ( $\lambda=8-14$  mm) was recorded with portable thermovision camera. Skin seeding rate and specific reference to anaerobic and aerobic microorganisms were found by standard methods.

As a result of the studies conducted it has been established that after treatment of wound with ozonized solutions under all investigated concentrations to the 3<sup>rd</sup> day there is observed the wound purification from anaerobic microorganisms as well as significant growth suppression of microorganisms of enteral group. Healing dynamics of cold traumas under the effect of different ozone concentrations is of dose-dependant character.

# Активность $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов человека в условиях гипертонии при различных температурах

М.В. ХОМЕНКО

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

## Activity of $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of Human Erythrocytes Under Hypothermia at Different Temperatures

M.V. KHOMENKO

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

Изменение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках при стрессовых ситуациях может иметь решающее значение для их выживания. В эритроцитах человека  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза является единственным механизмом регуляции внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . В процессе подготовки клеток к низкотемпературному хранению резко изменяются физико-химические свойства среды. Поэтому целесообразно исследовать модификацию активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в гипертонических условиях (с использованием растворов ПЭО-1500, сахарозы и KCl) при различных температурах. Для этого применяли модель реконструированных эритроцитов, которая отображает действие данных веществ на функцию фермента.

При нормотермии ( $37^\circ\text{C}$ ) ПЭО-1500 вызывает ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса в клетках, что связано с комплексным действием этого осмолита на мембранные структуры и макромолекулы. Предположительно, образуется "мантис" вокруг клетки, состоящая из молекул ПЭО, и изменяются свойства воды в ее пределах. Кроме того, возможно встраивание полимера в структуру липидного бислоя, что может вызвать значительные изменения в механизме функционирования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы под воздействием данного соединения. Сахароза влияет на фермент концентрационно-зависимым образом – в диапазоне 100-300 мМ она оказывает стимулирующий эффект на каталитическую активность фермента, а при нарастании концентрации активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы снижается. Этот эффект может быть связан с модификацией свойств мембранного микроокружения  $\text{Ca}^{2+}$ -насоса и изменением подвижности молекул воды в растворе, что, по-видимому, влияет на стабильность (или нестабильность) отдельных конформационных состояний фермента и, в конечном итоге, – на константы скоростей отдельных реакций каталитического цикла. Воздействие KCl как электролитного соединения принципиально отличается от ПЭО-1500 и сахарозы. Гипертонические растворы умеренно высоких концентраций электролита активируют  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу плазматических мембран эритроцитов. Возможно механизм этого феномена обусловлен действием ионной силы растворов на внутримембранные воздействия в молекуле фермента и возмущением структуры липидной фазы мембран при повышении концентрации солей. При гипотермии ( $5^\circ\text{C}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза нечувствительна к эффектам гипертонических растворов, поскольку ее активность при этой температуре снижена.

Полученные результаты позволяют заключить, что активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы эритроцитов при нормотермии может контролироваться изменением химического состава среды, а при гипотермии фермент становится невосприимчивым к этим изменениям.

Change in  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration in cells under stress may be of decisive value for their survival. In human erythrocytes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is the only mechanism responsible for regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . When preparing cells to low temperature storage there is an abrupt alteration in physical and chemical properties of a medium. Therefore it is expedient to study the modification of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity under hypertonic conditions (using the solutions of PEO-1500, sucrose and KCl) under different temperatures. For this aim there was used the model of reconstituted erythrocytes, completely reflecting the action of physical factors on enzyme function.

At normothermia ( $37^\circ\text{C}$ ) PEO-1500 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -pump in cells, that related to complex effect of this osmolyte on membrane structures and macromolecules. Probably there is formed a kind of "mantle", consisting of PEO molecules around a cell and water properties change within its limits. In addition, there is possible building-in of polymer into structure of lipid bilayer, that may cause significant changes in functioning mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase under the effect of this compound. Sucrose affects enzyme in a concentration-dependent way, within the range of 100-300 mM it renders stimulating effect on catalytic activity of enzyme and during ascending of concentration the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity decreases.

This effect may be related to modification of properties of membrane microenvironment of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and with the change in mobility of water molecules in solution that probably affects the stability (or instability) of certain conformational states of enzyme and finally does the constants of rates of separate reactions of catalytic cycle. KCl effect as electrolyte compound differs strongly from PEO-1500 and sucrose. Hypertonic solutions of moderately high concentrations of electrolyte activate  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocyte plasma membranes. Mechanism of this phenomenon is likely stipulated by the influence of solution ionic strength on intra-domain effects in enzyme molecule and structure excitation of membrane lipid phase at a rise in salt concentrations. During hypothermia ( $5^\circ\text{C}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is not sensitive to the effects of hypertonic solutions, since its activity at this temperature is reduced.

Obtained results enable the concluding that activity of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase at normothermia may be controlled by the change in chemical composition of the medium and during hypothermia enzyme becomes insusceptible to these alterations.

# Нейро- и ангиоархитектоника головного мозга крыс разного возраста после гипотермического воздействия

Д.Г. ЛУЦЕНКО, В.Г. БАБИЧУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Post-Hypothermic Effect Aspects of Neuro- and Angioarchitecture of Rat's Brain of Different Age

D.G. LUTSENKO, V.G. BABICHUK

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

Цель работы – определить возрастные особенности функциональной архитектуры головного мозга 4-, 6- и 24-месячных крыс при периодическом охлаждении (ПО) низкими положительными ( $10^{\circ}\text{C}$ ) (10 ПО) и отрицательными температурами ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) ( $-120$  ПО). Фрактальную морфометрию электронно-микроскопических изображений, видеоряда прижизненной микроскопии микроциркуляторного русла мозга проводили по специальной компьютерной программе ФРАМ.

Расчёт размерности D препаратов гипоталамуса 4- и 6-месячных крыс показал, что в широком масштабе величин (увеличение 100-100000) геометрия мозга имеет фрактальные свойства с персистентным уровнем хаотичности ( $D\sim 1,1$ ). Размерность стареющего гипоталамуса близка к эвклидовой ( $D\sim 1,01$ ) и характеризует низкую лабильность структурно-функциональных систем мозга 24-месячных крыс. Изменения афферентных входов термокомпетентных нейронов гипоталамуса при 10 ПО приводит к однотипным немедленным морфофункциональным перестройкам. Хаотичность общей архитектуры гипоталамуса (полутонкие срезы) у 4- и 6-месячных крыс ( $D\sim 1,3$ ) и у 24-месячных крыс ( $D\sim 1,1$ ) повышается, оставаясь в персистентной области. Эффект сохраняется как минимум 2 недели. Такой же стойкий эффект наблюдался и после 9 сеансов  $-120$  ПО, что можно расценивать как ускоренную адаптацию. Следует заметить, что у 4-месячных крыс после  $-120$  ПО значение D повышалось до 1,4, т.е. не выходит из персистентной области, но приближается, на наш взгляд, к опасной “зоне броуновского движения” ( $D=1,5$ ).

Для определения D важна геометрия капиллярного русла. Отслеживая в модельных экспериментах *in vivo* действие норадреналина (НА) на микрогемодициркуляцию в мозге, мы обнаружили изменение фрактальных характеристик не только ангиоархитектоники, но и гемодинамики ( $D=1,1$  в норме,  $D=1,2$  после введения НА). По современным представлениям формирование морфофизиологических фракталов в сердечно-сосудистой системе – признак надёжного функционирования. Вследствие своей избыточной нерегулярности фрактальные структуры являются робастными системами и хорошо противостоят повреждениям. Отчасти поэтому обнаруженную нами фрактальную динамику микроциркуляции можно считать важной составной частью общего адаптационного синдрома при холодовом стрессе.

Таким образом, мы считаем перспективным использование фрактального подхода для выяснения тонких механизмов реагирования функциональных систем мозга на различные воздействия.

The research aim was to determine the age peculiarities of brain functional architecture in 4-, 6- and 24-months' rats under a periodic cooling (PC) with low positive ( $10^{\circ}\text{C}$ ) (10 PC) and negative ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) ( $-120$  PC) temperatures. Fractal morphometry for electron-microscopic images, video of vital microscopy of brain microcirculatory bed was done using the specialized computer FRAM software.

Calculating dimension D for hypothalamus preparations of 4- and 6-months' rats has demonstrated that in a wide scale of values (100-100000 magnification) the brain geometry has fractal properties with persistent level of chaotic character ( $D\sim 1.1$ ). Dimension of aging hypothalamus is close to the Euclid one ( $D\sim 1.01$ ), by showing low lability of structural and functional brain systems of 24-months' rats. Changes in afferent inputs of thermocompetent hypothalamus neurons at 10 PC result in uniform immediate morphofunctional rearrangements. Chaotic character of general architecture of hypothalamus (semi-thin sections) in 4- and 6-months' rats ( $D\sim 1.3$ ), as well as in 24-months' ones ( $D\sim 1.1$ ) augments with remaining within a persistent range. This effect is kept for at least 2 weeks. The same stable effect is observed following 9 sessions at  $-120$  PC that may be considered as accelerated adaptation. Of note is that in 4-months' rats after  $-120$  PC D values increased up to 1.4, i.e. it was not beyond a persistent range, but reached a dangerous, from our point of view, “Brownian movement area” ( $D=1.5$ ).

The geometry of capillary bed is of importance for D determination. By tracing norepinephrine effect on microhemocirculation *in vivo* model experiments in brain we found out a change in fractal characteristics of not only angioarchitecture, but hemodynamics as well ( $D=1.1$  in the norm,  $D=1.2$  after norepinephrine injection). According to the current views the formation of morphophysiological fractals in cardiovascular system is a sign of reliable functioning. Due to their surplus irregularity the fractal structures are the robust systems, therefore they are damage-resistant. Therefore the revealed by us fractal dynamics of microcirculation may be considered as an important component of general adaptation syndrome under cold stress.

Thus, the usage of fractal approach we consider as perspective for revealing intimate mechanisms of brain functional systems response to different effects.

## Регидратированные аденокортикоциты как модель криоконсервированных стероидпродуцирующих клеток

Г.В. Дудецкая<sup>1</sup>, Т.А. Юрчук<sup>2</sup>, В.Д. Устиченко<sup>1</sup>, Н.М. Алабедалькарим<sup>1</sup>, Т.П. Бондаренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Rehydrated Adrenocorticytes as Model of Cryopreserved Steroid-Producing Cells

G. V. DUDETSKAYA, T. A. YURCHUK, V. D. USTICHENKO, N. M. ALABEDALKARIM, T. P. BONDARENKO

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Karazin National University, Kharkov

В настоящее время для органотипических культур надпочечников разработаны режимы криоконсервирования, обеспечивающие сохранение гормонсинтетической активности клеток. Было отмечено, что изменение формы или объема клеток при криоконсервировании, которое способствует пространственному сближению внутриклеточных депо холестерина и цитохрома P450<sub>scc</sub>, может стимулировать стероидпродуцирующую активность. Однако прямые доказательства влияния осмотических факторов на базальный и стимулированный стероидогенез не были получены.

Цель нашей работы – изучить влияние состава и осмолярности гипертонической среды на базальный и dbcAMP-стимулированный стероидогенез аденокортикальных клеток и оценить адекватность этой модели для характеристики влияния замораживания-отогрева на стероидогенный потенциал данных клеток.

Объектом исследования были аденокортикоциты мышей и новорожденных поросят. Для определения влияния факторов криоконсервирования на секрецию гидрокортизона, клетки преинкубировали в растворах NaCl различной осмолярности при 22°C в течение 20 мин, а затем помещали на 18 ч в стандартную среду культивирования. Криоконсервированные аденокортикоциты получали из фрагментов желез, криоконсервированных по методу Гуриной. Митохондриальный потенциал клеток оценивали с использованием красителя JC-1 при последующей цитофлюориметрии.

Установлено, что криоконсервирование не влияет на уровень dbcAMP-индуцированной секреции, но повышает базальную гормонопродукцию. Усилению стероидогенной активности криоконсервированных клеток сопутствовал прирост количества клеток с высоким митохондриальным потенциалом. Для регидратированных клеток установлено, что с ростом осмолярности гипертонической среды тенденция к увеличению базального стероидогенеза реализовалась в достоверное повышение нестимулированной секреции гидрокортизона. Базальный и стимулированный гормонопоэз криоконсервированных аденокортикоцитов по абсолютным значениям соответствовал данным, полученным для клеток, регидратированных из гипертонических растворов электролита.

Таким образом, дегидратация-регидратация клеток в гипертонических растворах электролита NaCl может быть использована для моделирования влияния замораживания-отогрева на стероидогенный потенциал аденокортикальных клеток.

In present time for organotopic cultures of adrenal glands the cryopreservation protocols, proving the preservation of hormonesynthetic cell activity, were designed. There was found that changes of cell shapes or volume under cryopreservation, which contributed to spatial approaching of intracellular depot of cholesterol and P450<sub>scc</sub> cytochrome, can stimulate steroid-productive activity. However direct evidence of the effect of osmolar factors on basal and stimulated steroidgeneses have not been found.

The research purpose was to study the influence of solution and osmolarity of hypertonic medium on basal and dbcAMP-stimulated steroidgenesis of adrenocortical cells and to estimate the adequacy of this model for characteristic of freeze-thawing influence on steroidgenesis potential of these cells.

The research objects were mice and newborn piglets' adrenocorticytes. For examining the influence of cryopreservation factors on the secretion of hydrocortisone, the cells were preincubated in NaCl solutions of different osmolarities, at 22°C for 20 minutes, and then they were placed for 18 hrs into standard culture medium. Cryopreserved adrenocorticytes were obtained from gland's fragments, those were cryopreserved with Gurina's method. Mitochondria cell potential was estimated with exclusion of JC-1 dye with following cytofluorimetry

It was established that cryopreservation did not affect the level of dbcAMP-inductive section, but enhanced basal hormone production. Reinforced steroidgenic activity of cryopreserved cells the accumulation of cell amount with high mitochondria potential. For rehydrated cells there was established that with growth of hypertonic medium osmolarity the trend to increasing the basal steroidgenesis was realized as statistical and significant rise in unstimulated secretion of hydrocortisone. Basal and stimulated hormonopoiesis of cryopreserved adrenocorticytes on absolute data corresponded to those showed for the cells rehydrated from hypertonic electrolyte solution.

Thus, cell dehydration and rehydration in hypertensive NaCl electrolyte solutions can be used for modeling the influence of freeze-thawing on steroidgenic potential of adrenocortical cells.



# Влияние непроникающих криопротекторов и скорости охлаждения на гипертонический криогемолиз эритроцитов человека

Н.А. ПИСАРЕНКО<sup>2</sup>, В.В. РАМАЗАНОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Influence of Non-Penetrative Cryoprotectants and Cooling Rate on Hypertonic Cryohemolysis of Human Erythrocytes

N.A. PISARENKO<sup>2</sup>, V.V. RAMAZANOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>V.N. Karazin National University, Kharkov

Гипертонический криогемолиз (ГК) – повреждение эритроцитов человека, обусловленное экспозицией клеток в гипертоническом растворе солей или неэлектролитов в диапазоне от 45 до 20°C и последующим охлаждением до температур, близких к 0°C. В настоящее время определены факторы, вызывающие сенсбилизацию клеток к ГК, однако влияние криопротекторов на динамику развития этого процесса не изучено.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека II группы. ГК осуществляли посредством переноса аликвот клеточной суспензии эритроцитов из проб, подвергнутых инкубации при 37°C в среде 1,2M NaCl, 10mM трисбуфера, pH 7,6 в течение 1-60 мин (первая стадия), в 1 мл раствора дегидратации при температуре 37 или 0°C на 10 мин (вторая стадия). Криопротекторы (полиэтиленгликоль 2000 и декстран 20000) в концентрации 20% добавляли в исследуемый раствор на этапах дегидратации, охлаждения либо на обоих этапах ГК.

Проведенные исследования показали, что полиэтиленгликоль (ПЭГ) снижает чувствительность эритроцитов человека к ГК как при медленном, так и при быстром охлаждении, причем его действие более выражено в условиях последнего. При медленном охлаждении присутствие ПЭГ на стадии дегидратации приводит практически к 100%-му лизису эритроцитов, однако с увеличением продолжительности инкубации наблюдается резкое снижение процента лизиса клеток. В случае быстрого охлаждения удаление ПЭГ перед второй стадией приводит к резкому возрастанию чувствительности клеток к ГК. При быстром охлаждении присутствие ПЭГ на второй стадии ГК проявляется в выраженном его криозащитном действии. Декстран снижает чувствительность эритроцитов человека к ГК и проявляет более эффективные защитные свойства при медленном охлаждении. При быстром охлаждении присутствие декстрана на первой стадии приводит к более резкому увеличению чувствительности эритроцитов к ГК, чем при медленном. На стадии охлаждения он вызывает снижение чувствительности эритроцитов к ГК по сравнению с его присутствием на обоих стадиях. Максимальное криозащитное действие данного криопротектора наблюдается при медленном охлаждении (не более 3 % лизиса).

Таким образом, защитное действие ПЭГ выявляется при быстром охлаждении, когда он присутствует на второй стадии ГК. Декстран проявляет криопротекторные свойства более эффективно в условиях медленного охлаждения, при этом максимальное криозащитное действие наблюдается в его присутствии на стадии охлаждения. Удаление ПЭГ перед охлаждением вызывает более значительное снижение чувствительности эритроцитов к ГК по сравнению с удалением декстрана, на основании этого можно предположить, что десорбция от мембраны ПЭГ вызывает большее повреждение, чем десорбция декстрана.

Hypertonic cryohemolysis (HC) is human erythrocytes damage, stipulated by cell exposure to either hypertonic solution of salts or non-electrolytes within the range from 45 to 20°C and following cooling down to the temperatures close to 0°C. Nowadays the factors, causing cell sensibilization to HC are determined, but the effect of cryoprotectants on the dynamics of this process development has not been studied yet.

Erythrocytes of A(II) human donor blood served as investigation object. HC was realised via transferring erythrocyte cell suspension aliquots from the samples, subjected to incubation at 37°C in 1.2M NaCl, 10mM tris buffer medium, pH 7.6 within 1-60 min (the first stage) into a 1 ml dehydration solution at 37 or 0°C for 10 min (the second stage). Cryoprotectants (polyethylene 2000 and dextran 20000) in 20% concentration were added into the studied solution at the stages of dehydration, cooling or at both HC stages.

The performed research demonstrated polyethylene glycol (PEG) as reducing human erythrocyte sensitivity to HC both under slow and rapid cooling, moreover under the latter its effect was more manifested. Under slow cooling down the PEG presence at dehydration stage results in almost 100% erythrocyte lysis, but with an increase in incubation duration a sharp decrease in percentage of cell lysis is noted. In case of rapid cooling the PEG removal before the second stage results in a sharp increase in cell sensitivity to HC. Under rapid cooling the PEG presence at the second HC stage manifests in expressed cryoprotective effect. Dextran reduces human erythrocyte sensitivity to HC and manifests more efficient protective properties under slow cooling. Under rapid cooling the dextran presence at the first stage results in sharper augmentation of erythrocyte sensitivity to HC than under slow one. At cooling stage it reduces erythrocyte sensitivity to HC in comparison with its presence at both stages. Maximum cryoprotective effect of this cryoprotectant is observed under slow cooling (not more than 3% lysis).

Thus, PEG cryoprotective effect is revealed under rapid cooling, when it is present at the second HC stage. Dextran cryoprotective properties are more efficient under slow cooling conditions, at the same time the maximum cryoprotective effect is observed at its presence at cooling stage. PEG removal prior to cooling reduces more significantly erythrocyte sensitivity to HC in comparison with dextran removal. Due to this, PEG desorption from a membrane may be assumed as causing higher damage than dextran one.

# Воздействие фракции до 5 кДа крови молочных телят (Актовегин) на перевиваемые линии клеток

А.В. ТРИФОНОВА<sup>1</sup>, А.А. ЛАВРИК<sup>2</sup>, А.К. ГУЛЕВСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт клинической и экспериментальной ветеринарной медицины, г. Харьков

## Effect of Fraction up to 5 kD of Vealer Blood (Actovegin) on Inoculated Cell Lines

A.V. TRIFONOVA<sup>1</sup>, A.A. LAVRIK<sup>2</sup>, A.K. GULEVSKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Institute of clinical and experimental veterinary medicine, Kharkov

В клинической практике длительное время успешно применяют препараты, которые являются гемодиализатами, полученными из крови молочных телят. Одним из таких препаратов является Актовегин. Он производится на основе безбелковой низкомолекулярной фракции крови молочных телят (до 5 кДа), полученной путем последовательных процессов гемолиза, ультрафильтрации и концентрации.

Цель данной работы – изучить влияние низкомолекулярной фракции крови молочных телят, содержащейся в препарате Актовегин, на процессы пролиферации клеток *in vitro*.

В работе использовали две клеточные линии: PK-15-IEKVM и ВНК-21 clone 13/04. Прирост клеток подсчитывали в камере Горяева на 3-и сутки роста культуры. Для оценки митотического режима культур клетки фиксировали в спирт-уксусной смеси и окрашивали гематоксилином Каррачи каждые 24 ч роста.

Показано, что уменьшение в питательных средах концентрации сыворотки крови до 2 и 1% приводит к снижению роста клеточных культур на 1-м пассаже соответственно на 20 и 30%. Актовегин в концентрации 0,14% стимулирует прирост клеток в среде с 2% сыворотки крови на 21±3%, в средах, содержащих 10 и 1% сыворотки крови, – на 36±3%. Актовегин при добавлении в других концентрациях незначительно увеличивает прирост клеток. Добавление Актовегина в среду, не содержащую сыворотку крови, стимулирующего эффекта не оказало. Это свидетельствует, что при наличии в питательной среде ростовых факторов низкомолекулярные вещества способны существенно повышать биоэнергетический потенциал клеток, приводящий к усилению их метаболизма и пролиферативной активности.

При изучении митотического режима клеток установлено, что уменьшение концентрации сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) в питательной среде до 2% незначительно снижает митотическую активность клеток. Добавление Актовегина в ростовую среду с 2% сыворотки крови КРС приводит к увеличению количества митозов на 47%. В то же время при культивировании клеток в среде с добавлением Актовегина отмечено увеличение количества патологических митозов с 7 до 13% от их общего количества. Характер патологических митозов свидетельствует об адаптивных перестройках клеток культуры к новому ростовому фактору.

Таким образом, доказана способность низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) крови молочных телят стимулировать прирост клеток различных линий. Это свидетельствует о перспективности включения данной низкомолекулярной фракции крови в состав ростовых сред с целью повышения эффективности использования культур клеток в биотехнологии.

In clinical practice for a long time hemodialysates derived from vealer blood have been widely used. One of these preparation is actovegin. It is produced on the base of protein-free low molecular fraction of vealers (up to 5 kD), obtained by means of consequent processes of hemolysis, ultrafiltration and concentration.

The research aim was to study the effect of low molecular fraction of vealer blood, containing in actovegin on proliferation processes of cells *in vitro*.

In the research there was used two cell lines: PK-15-IEKVM and BHK-21 clone 13/04. Cell increment was counted in Goryaev's chamber to the 3<sup>rd</sup> culture growth day. For estimation of mitotic regimen of culture the cells were fixed in alcohol-acetum mixture and stained with Karachi hematoxylin each 24 hrs of growth.

It has been shown that a reduction in nutritive media the concentrations of blood serum down to 2 and 1% results in a decrease in the growth of cell cultures at the 1<sup>st</sup> passage, correspondingly, by 20 and 30%. Actovegin under 0.14% concentration stimulates the increment of cells in the medium with 2% blood serum by 21±3% and by 36±3% in the media, containing 10 and 1% blood serum. When adding actovegin under other concentrations the cell increment slightly increased. Actovegin adding to the medium non-containing blood serum did not demonstrate stimulating effect. This testifies to the presence of growth factors in nutritive medium, low molecular substances are capable of increasing bioenergetic potential of cells and leading to the strengthening of their metabolism and proliferative activity.

When studying mitotic regimen of cells it has been found that decrease in concentration of cattle blood serum in nutritive medium down to 2% slightly reduced mitotic activity of cells. Adding of actovegin into growth medium with 2% cattle blood serum results in a rise in the number of mitoses by 47%. At the same time during cell culturing in the medium with adding actovegin there was observed an increase in the number of mitoses from 7 to 13% of their total number. The character of pathological mitoses testify to adaptive rearrangements of cell cultures to new growth factor.

Thus the ability of low molecular fraction (up to 5 kD) of vealers has been proved as stimulating the increment of cells of various lines. This testifies to prospects of this low molecular fraction inclusion into composition of growth media with the aim of rising in the application efficiency of cell cultures in biotechnology.

# Модифицирующее влияние хлорида алюминия на чувствительность эритроцитов человека к гипертоническому криогемолизу

Н.А. ДАНИЛЕНКО

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина*

## Modifying Effect of Aluminium Chloride on Human Erythrocyte Sensitivity to Hypertonic Cryohemolysis

N.A. DANILENKO

*Karazin National University, Kharkov*

Гипертонический криогемолиз – это явление лизиса эритроцитов в процессе охлаждения в гипертонических средах при положительных температурах. В реакциях клеток на температурно-осмотическое воздействие важную роль играют факторы, способные понижать и повышать устойчивость клеток к изменению температуры и осмолярности среды. В этой связи представляет интерес изучение действия веществ, влияющих на динамику развития дефектов клеточных структур при стрессовых воздействиях. Такими соединениями являются соли алюминия, которые оказывают выраженное модифицирующее действие на клетки и клеточные структуры.

Цель работы – изучение влияния различных концентраций электролита (0,15-2 М NaCl) и неэлектролита (0,3-0,86 М сахарозы) на развитие гипертонического криогемолиза в присутствии хлорида алюминия (0-1 мМ).

Гипертонический криогемолиз эритроцитов в растворах электролита развивается при концентрации NaCl 0,6-1,2 М, в этом диапазоне уровень гемолиза клеток при охлаждении от 37 до 0°C возрастает с 2 до 76%. Присутствие AlCl<sub>3</sub> приводит к изменению характера кривой зависимости гипертонического криогемолиза от осмолярности среды инкубации. Ионы Al<sup>3+</sup> вызывают гемолиз эритроцитов в растворе с физиологической тоничностью (0,15 М NaCl). Уровень гипертонического криогемолиза повышается с ростом концентрации ионов Al<sup>3+</sup> и достигает 70% при 1мМ AlCl<sub>3</sub>. При повышении концентрации NaCl наблюдается постепенное снижение лизиса клеток в присутствии ионов Al<sup>3+</sup> до 0,7 М NaCl. Дальнейшее увеличение осмолярности среды инкубации сопровождается повышением чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолизу, которое имеет характер обратной зависимости от концентрации хлорида алюминия, при этом уровень лизиса клеток при действии AlCl<sub>3</sub> ниже наблюдаемого в контроле (для всех концентраций хлорида алюминия).

В растворах неэлектролита чувствительность контрольных эритроцитов к действию последующего охлаждения до 0°C развивается при 0,5-0,86 М сахарозы. Присутствие AlCl<sub>3</sub> в растворах неэлектролита вызывает значительное снижение гипертонического криогемолиза, при этом уровень регистрируемого лизиса тем ниже, чем выше концентрация ионов Al<sup>3+</sup> в среде.

Влияние хлорида алюминия на развитие гипертонического криогемолиза может быть опосредовано его воздействием на липидный матрикс и изменением структурного состояния мембраны.

Hypertonic cryohemolysis is the phenomenon of erythrocyte lysis during cooling in hypertonic media under positive temperatures. In cell response to temperature-osmotic effect of importance are the factors, capable to reduce or augment cell resistance to change in temperature and medium osmolarity. In this connection of interest is to study the influence of the substances, affecting dynamics of defect development in cell structures under stress effects. These compounds are aluminium salts, causing a manifested modifying effect on cells and their structures.

This research was aimed to study the influence of different concentrations of electrolyte (0.15-2M NaCl) and non-electrolyte (0.3-0.86M sucrose) on hypertonic cryohemolysis development at aluminium chloride presence (0-1 mM).

Hypertonic cryohemolysis of erythrocytes in electrolyte solutions is in a progress under 0.6-1.2M NaCl concentrations, within this range the level of cell hemolysis under cooling from 37 down to 0°C increases from 2 up to 76%. AlCl<sub>3</sub> presence results in a change in a curve character of hypertonic cryohemolysis dependency on incubation medium osmolarity. Al<sup>3+</sup> ions cause the erythrocyte hemolysis in solution with physiological tonicity (0.15M NaCl). The level of hypertonic cryohemolysis increases with a rise of Al<sup>3+</sup> ion concentration and achieves 70% under 1mM AlCl<sub>3</sub>. With an increase in NaCl concentration a gradual reduction of cell lysis at the Al<sup>3+</sup> ion presence down to 0.7 M NaCl is observed. Further augmentation of incubation medium osmolarity is accompanied with an increase in erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis, having a character of reverse dependency on aluminium chloride concentration. At the same time the level of cell lysis under AlCl<sub>3</sub> effect is lower than observed in the control (for all aluminium chloride concentrations).

In non-electrolyte solutions a sensitivity of control erythrocytes to the effect of following cooling down to 0°C develops under 0.5-0.86M sucrose. AlCl<sub>3</sub> presence in non-electrolyte solutions significantly reduces hypertonic cryohemolysis, at the same time the level of recorded lysis is the lower, the higher is Al<sup>3+</sup> ion concentration in the medium.

Influence of aluminium chloride on hypertonic cryohemolysis development may be mediated by its effect on lipid matrix and a change in membrane structural state.

# Влияние pH, температуры на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу

Д.И. АЛЕКСАНДРОВА<sup>1</sup>, В.А. БОНДАРЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Influence of pH, Temperature on Erythrocyte Resistance to Hypertonic Stress

D.I. ALEKSANDROVA<sup>1</sup>, V.A. BONDARENKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Karazin National University, Kharkov

Гипертонический стресс является одним из основных факторов криоповреждения. Изучение влияния на клетки таких факторов, как осмолярность среды, ионная сила, температура и pH, имеет важное значение для повышения эффективности существующих методов криоконсервирования.

Цель данной работы – исследование чувствительности эритроцитов к гипертоническому криогемолузу в зависимости от pH среды инкубации.

В работе использовали эритроциты донорской крови, которые отмывали раствором 0,15 М NaCl (pH 7,4). Растворы готовили на фосфатном буфере.

На первом этапе эритроциты инкубировали в течение 10 мин в средах, содержащих от 0,15 до 1,5 М NaCl с pH 5,5; 7,4; 9,0. На втором этапе эритроциты переносили на 10 мин в раствор 4 М NaCl с указанными значениями pH. При переносе клеток использовали принцип перекрестного изменения значения pH, т.е. значения pH изменяли на всех этапах инкубации клеток. Также варьировались температурные режимы 37-0, 0-0, 37-37°C.

В результате исследований получены следующие результаты.

При варьировании значений pH на первом этапе (на втором этапе значение pH постоянное) наблюдаются значительные изменения сохранности клеток в растворе 4М NaCl, на втором этапе (на первом этапе значение pH постоянное) – незначительные. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что исходный этап дегидратации клеток является наиболее важным при контроле степени устойчивости клеток к гипертоническому стрессу.

Во всех вариантах переноса отмечается более высокая устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку в растворе 4 М NaCl, инкубируемых на первом этапе в растворах NaCl с pH 5,5 и 7,4. Возможно, это связано с тем, что более кислое значение pH 5,5 вызывает увеличение объема клеток, а его щелочное значение приводит к уменьшению объема эритроцитов, что усиливает действие гипертонического стресса и сдвиг температуры. Перенос клеток, предварительно инкубированных в растворах со значением pH 9,0, вызывает более высокие значения гемолиза. Вероятно, при таком значении pH снижается поверхностное натяжение мембраны, в результате чего она находится в неустойчивом состоянии.

Hypertonic stress is one of the main factors of cryo-damage. Studying the effect of such factors as medium osmolarity, ion strength, temperature and pH on cells is of importance for augmenting the efficiency of current cryopreservation methods.

Our research was targeted to study the erythrocyte sensitivity to hypertonic cryohemolysis depending on incubation medium pH.

Donor blood erythrocytes, washed with 0.15M NaCl (pH 7.4) solution was used in the work. Solutions were prepared with phosphate buffer.

At the first stage erythrocytes were incubated for 10 min into the media, containing from 0.15 to 1.5M NaCl with pH 5.5; 7.4; 9.0. At the second stage erythrocytes were transferred for 10 min into 4M NaCl solution with the mentioned pH values. Principle of cross change in pH value was used during cell transfer, i.e. pH values were changed at all stages of cell incubation. Temperature regimens varied as well: 37-0, 0-0, 37-37°C.

As a result of research the following results were obtained:

When varying pH values at the first stage (pH is constant at the second one) the significant changes in cell integrity are observed in 4.0 M NaCl, at the second one (with constant pH value at the first stage) they are insignificant in 4.0 M NaCl. Basing on the results obtained we can conclude that the initial stage of cell dehydration is the most important when controlling the extent of cell resistance to hypertonic stress.

During all transfers a higher resistance of erythrocytes in 4.0 M NaCl, incubated at the first stage in NaCl solution with pH 5.5 and 7.4, is noted. It might be associated to the fact, that more acid pH value 5.5 causes an increase in cell volume, but its alkaline value results in a decrease in erythrocyte volume, that strengthens the effect of hypertonic stress and temperature shift. Transfer of the cells, pre-incubated in solutions with pH value 9.0 causes higher hemolysis values. Possibly, under such pH value there is a reduction of membrane surface tension, resulting in its unstable state.



# Сравнительное изучение влияния криоконсервированного экстракта плаценты и препарата “Овестин” на микрофлору влагалища женщин с урогенитальными расстройствами в период климактерия

О.А. ПЕРЧИК

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

## Comparative Study of Influence of Cryopreserved Placenta Extract and “Ovestin” Preparation on Vaginal Microflora in Women with Urogenital Disorders During Climacterium

O.A. PERCHIK

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

Нормальная микрофлора половых органов – важная составляющая общего здоровья женщины во все периоды ее жизни.

При наступлении климакса изменения биоценоза могут протекать как в пределах возрастной нормы, так и в виде отклонений, поэтому нормализация биоценоза влагалища женщин в климактерический период, комплексное лечение урогенитальных расстройств актуальны.

Цель работы – исследовать видовой состав микрофлоры влагалища женщин с урогенитальными расстройствами в период климактерия и проследить за его изменениями при лечении криоконсервированным экстрактом плаценты (КЭПл) и влагалищными свечами “Овестин” фирмы “Органон”.

Было обследовано 3 группы пациенток (70 женщин) в возрасте от 45 до 79 лет. В первой группе (25 женщин) применяли комплексную терапию: внутримышечные инъекции КЭПл 1,5-2,5 мл через два дня на третий (на курс – 5 инъекций) и введение во влагалище ватных тампонов, пропитанных этим же препаратом. Второй группе (20 женщин) с аналогичными жалобами были назначены свечи “Овестин”.

Контрольную группу составили 25 женщин без каких-либо проявлений патологического климакса.

Микробиологическому исследованию подвергалось слизистое отделяемое влагалища пациенток. Материал засевали на твердые питательные среды.

В результате исследований у больных с урогенитальными расстройствами в климактерическом периоде выявлены такие нарушения биоценоза влагалища: повышение удельного веса стафилококков, стрептококков, энтерококков, наличие грибов рода *Candida*, снижение количества лактобацилл, молочнокислых стрептококков, энтерококков и энтеробактерий.

При проведении традиционной терапии препаратом “Овестин” и КЭПл наблюдалось восстановление микрофлоры влагалища до показателей контрольной группы. В группе больных, где лечение проводилось КЭПл, отмечено достоверное повышение содержания лактобацилл и молочно-кислых стрептококков. Кроме того, в результате применения КЭПл наблюдались более быстрый и устойчивый терапевтический эффект, улучшение самочувствия, повышение “качества жизни” пациенток.

Normal microflora of genital organs is an important component of general female health within the whole life.

On climacterium onset the changes in biocenosis may proceed either within the limits of age norm or may deviate. Therefore the normalisation of vaginal biocenosis in women during climacterium, combined treatment of urogenital disorders have still remained to be actual tasks.

Our research was targeted to investigate the species composition of vaginal microflora in women with urogenital disorders during climacterium and to trace its changes when treating with cryopreserved placenta extract (CPE) and “Ovestin” vaginal suppositories of “Organon” company.

There were examined 3 groups of patients (70 women) aged from 45 to 89. In the first group (25 women) a combined therapy was applied: an intramuscular CPE injection in 2 days to the 3<sup>rd</sup> (5 injections for session) and introduction of cotton tampons, saturated with this preparation. To the second group (20 women) with the same complaints the “Ovestin” suppositories were administrated. The control group comprised 25 women with no manifestations of pathological climacterium.

Mucous vaginal discharge of patients was microbiologically studied. Material was inoculated on solid nutrient media.

As a result of investigations the following disorders in vaginal biocenosis were revealed in patients with urogenital disorders during climacterium: an increase in specific weight of staphylococci, streptococci, enterococci, *Candida* fungi presence, decrease in the amount of lactobacilli, lactic streptococci, enterococci and enterobacteria. When traditionally treating with “Ovestin” and CPE a recover of vaginal microflora up to the indices of control group was observed. In the group of patients, treated with CPE a statistically significant increase in lactobacilli and lactic streptococci content was noted. In addition, as a result of CPE application a more rapid and resistant therapeutic effect, improvement of well-being, “life quality” augmentation were observed in the patients.

# Изучение язвозаживляющего действия низкомолекулярной фракции (до 5 кДа), выделенной из криогемолизата крови молочных телят, на модели хронической язвы желудка у крыс

Е.С. АБАКУМОВА, Н.Н. МОИСЕЕВА, О.Л. ДОЛГИХ, А.К. ГУЛЕВСКИЙ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Studying of Ulcer-healing Effect of Low Molecular Fraction (up to 5 kD), Isolated From Cryohemolysate of Vealer Blood on Model of Chronic Gastric Ulcer in Rats

E.S. ABAKUMOVA, N.N. MOISEYEVA, O.L. DOLGIKH, A.K. GULEVSKY  
Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

На сегодняшний день в клинической практике для профилактики и лечения язвенной болезни желудка одними из перспективных являются препараты, представляющие собой гемодиализаты.

Цель работы – получение низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из криогемолизата крови молочных телят, и изучение ее язвозаживляющего действия на модели хронической язвы желудка у крыс. Для получения данной модели использовали ацетилсалициловую кислоту, которую вводили экспериментальным животным перорально 5 раз в дозе 150 мг/кг веса на протяжении трех суток. Выделение фракции с компонентами молекулярной массы до 5 кДа проводилось методом ультрафильтрации с использованием ультрафильтрационного оборудования фирмы “Sartorius” (Германия). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Первая группа – интактные; остальным группам после формирования модели хронической язвы желудка на протяжении 12 суток внутримышечно ежедневно вводили: второй группе (контрольной) – физиологический раствор; третьей группе – низкомолекулярную фракцию; четвертой группе – Актовегин (препарат сравнения). Язвозаживляющее действие фракции изучали на 3-, 7- и 12-е сутки по следующим клиническим показателям: концентрация эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина в крови, мазки периферической крови и гистологические срезы ткани, выделенной из области язвы.

Результаты клинического исследования крови показали, что уровень лейкоцитов в периферической крови, повышенный до 17 тыс/мкл вследствие язвобразовании, достоверно снижался относительно контроля и нормализовался после введения низкомолекулярной фракции и Актовегина. Введение фракции и Актовегина способствовало нормализации уровня общего гемоглобина, сниженного у экспериментальных животных до 109 г/л по сравнению с интактным значением (128 г/л), чего не наблюдалось в контроле. На протяжении эксперимента концентрация эритроцитов в крови экспериментальных крыс не отличалась от интактной (9,3 млн/мкл). Морфологический анализ мазков периферической крови выявил нейтрофилез до 50% по сравнению с интактным значением (25%) в контроле и после введения фракции. Введение Актовегина вызывало увеличение количества моноцитов до 15% и эозинофилов до 8% по сравнению с исходными данными (7 и 3% соответственно).

Гистологическое исследование ткани, взятой на 12-е сутки из области язвы, показало более выраженные процессы восстановления поврежденных слоев стенки желудка после введения фракции и Актовегина по сравнению с контролем.

Полученные результаты позволили выявить, что язвозаживляющее действие низкомолекулярной фракции, полученной из криогемолизата крови молочных телят, подобно Актовегину, механизм которого требует дальнейшего тщательного изучения.

Up today in clinical practice for prevention and treatment of gastric ulcers some of perspective medicines have been hemolysates.

Research aim was to obtain low molecular fraction (up to 5 kD) derived from cryohemolysate of vealer blood and studying its ulcer-healing effect in model of chronic gastric ulcer in rats. For this model obtaining there was used acetyl salicylic acid which was injected to experimental animals per os 5 times within 3 days in the dose of 150 mg/kg of the weight. Isolation of the fraction with components of molecular mass up to 5 kD was performed with ultrafiltration using ultrafiltrating device (“Sartorius”, Germany). Experimental animals were divided into 4 groups. The first one comprised intact animals, the ones of other groups were intramuscularly introduced after formation of the model of chronic gastric ulcer within 12 days with: physiological solution for the second (control) group; low molecular fraction for the third one; actovegin (medicine for comparison) for the fourth. Ulcer-healing effect of the fraction was investigated to the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days on the following clinical indices: concentration of erythrocytes, leukocytes, haemoglobin in blood; smears of peripheral blood and histological tissue slices taken from ulcer site.

Results of blood clinical study have shown that the level of leukocytes in peripheral blood increased up to 17 thousand/ml as a consequence of ulcer formation statistically and significantly in respect of the control and came back to the norm after introduction of low molecular fraction and actovegin. Introduction of the fraction and actovegin contributed to normalization of total haemoglobin level reduced in experimental animals down to 109 g/l if compared with intact values (128 g/l) that was not observed in the control. During the experiment concentration of erythrocytes in blood of the rats did not differ from intact one (9.3 mln/ml). Morphological analysis of the smears of peripheral blood revealed neutrophilosis up to 50% if compared with intact value (25%) in the control and after introduction of the fraction. Injection of actovegin caused a rise in the number of monocytes (up to 15%) and eosinophyls (up to 8%) if compared with initial data (7 and 3%, correspondingly).

Histological investigation of the tissue derived to the 12th day from the ulcer site has shown more manifested processes of recovery of stomach wall impaired layers after injection of the fraction and actovegin in comparison with the control.

Obtained results enabled the revealing that ulcer-healing effect of low molecular fraction derived from cryohemolysate of vealers is similar to that for actovegin, the mechanisms of which demand following studying.

# Структурные и функциональные показатели эритроцитов кордовой и донорской крови в норме и после криоконсервирования

П.М. ЗУБОВ, О.Л. ЗУБОВА

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

## Structural and Functional Indices of Cord and Donor Blood Erythrocytes in Norm and Following Cryopreservation

P.M. ZUBOV, O.L. ZUBOVA

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

Эритроциты кордовой крови (КК) отличаются рядом структурно-функциональных особенностей от эритроцитов донорской крови (ДК), которые могут влиять на устойчивость клеток к низкотемпературному воздействию. В работе проведено сравнительное изучение структурных и функциональных показателей эритроцитов КК и ДК в норме и после действия экстремальных факторов криоконсервирования.

При исследовании мембранных белков эритроцитов с помощью метода электрофореза в ПААГ установлены отличия в качественном и количественном составе основных мембранных белков эритроцитов КК и ДК. Прежде всего, это касается спектрина (его содержание в КК на 20% меньше), зоны белков полосы 7, которые на электрофореграмме в КК проявляются как структура из трех полос. Криоконсервирование эритроцитов КК и ДК с использованием непроницающего криопротектора ПЭО-1500 по методу "холодовой" обработки (ХО) показало, что распределение полос на электрофореграмме белков не изменяется. Однако после криоконсервирования эритроцитов КК, обработанных при комнатной температуре (КТ), обнаружено снижение содержания актина и белка полосы 7 по сравнению с клетками, подвергнутыми ХО, что свидетельствует о лучшей сохранности мембрано-цитоскелетного комплекса эритроцитов. Исследование липидной асимметрии мембраны методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина V – белка, который имеет высокое сродство к фосфатидилсерину и связывается с клетками, экспрессирующими его на наружной поверхности мембраны (в норме локализован только на внутренней стороне мембраны), показало, что контрольные эритроциты характеризуются низким процентом аннексин V<sup>+</sup>-клеток. Сравнение данного показателя у эритроцитов КК и ДК свидетельствует о более высоком проценте аннексин V<sup>+</sup>-клеток КК. Обработка эритроцитов ПЭО-1500 приводит к увеличению числа аннексин V<sup>+</sup>-клеток, однако при ХО аннексин V-меченых клеток меньше. После размораживания процент меченых клеток резко возрастает и становится фактически таким же, как у соответствующих групп до замораживания после трансфузии. Отличия в проценте аннексин V<sup>+</sup>-клеток в зависимости от способа обработки ПЭО-1500 также сохранялись. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах, предварительно инкубированных в растворе ПЭО-1500 как при ХО и КТ, так и после размораживания сохраняется на уровне контрольных величин. Кроме того, по содержанию АТФ и 2,3-ДФГ эритроциты КК не отличаются от эритроцитов ДК.

Таким образом, ХО эритроцитов ПЭО-1500 перед криоконсервированием способствует сохранению структуры цитоскелета эритроцитов ДК и КК в состоянии, близком к нативному, и минимально нарушает липидную асимметрию мембраны. Эти данные коррелируют с высокой сохранностью (до 99%) эритроцитов КК и ДК, криоконсервированных по методу ХО.

Cord blood (CB) erythrocytes differ by some structural and functional peculiarities from those of donor blood (DB), which may affect cell resistance to low temperature effect. A comparative study of structural and functional indices of CB and DB erythrocytes in the norm and after the effect of cryopreservation extreme factors has been carried-out in the research.

When studying erythrocyte membrane proteins using electrophoresis method in PAAG there were established the differences in qualitative and quantitative composition of main membrane proteins of CB and DB erythrocytes. This primarily concerns spectrin (its content in CB is 20% lower), band 7 protein areas, manifesting in CB electrophoregram as three band-structures. Cryopreservation of CB and DB erythrocytes with PEO-1500 non-penetrative cryoprotectant according to the method of "cold" treatment (CT) has demonstrated a band distribution in protein electrophoregram as remaining unchanged. However after cryopreserving CB erythrocytes, treated at room temperature (RT) there was revealed a decrease in actin content and band 7 protein if to compare with the cells, subjected to CT, that testified to higher integrity of membrane-cytoskeletal erythrocyte complex. Study of lipid asymmetry in membrane with flow cytometry method using annexin V – protein, having a high affinity to phosphatidyl serine and binding with cells, expressing it at external membrane surface (it is normally located internal surface only) has demonstrated that the control erythrocytes are characterized by low percentage of annexin V<sup>+</sup>-cells. Comparing this index in CB and DB erythrocytes testifies to higher percentage of annexin V<sup>+</sup>-cells. Treating erythrocytes with PEO-1500 results in an increase in the amount of annexin V<sup>+</sup>-cells, however under CT there is lower amount of annexin V<sup>+</sup>-cells. After freeze-thawing the percentage of labeled cells sharply augments and becomes almost the same as for corresponding groups prior to freezing after transfusion. Differences in percentage of annexin V<sup>+</sup>-cells depending on the way of PEO-1500 treatment were kept as well. ATP and 2,3-DPG content in erythrocytes, pre-incubated in PEO-1500 solution either under CT and RT or after freeze-thawing is preserved at the level of control values. In addition, CB erythrocytes do not differ from DB ones according to ATP and 2,3-DPG content.

Thus, CT of erythrocytes with PEO-1500 prior to cryopreservation contributes to preservation of cytoskeletal structure of DB and CB erythrocytes in the state close to a native one and causes the minimum disorders in a membrane lipid asymmetry. These data correlate with a high integrity (up to 99%) of CB and DB erythrocytes, cryopreserved according to CT method.

# Влияние температурного фактора на развитие аденокарциномы Эрлиха

О.В. САФРАНЧУК, А.Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Temperature Factor Effect on Ehrlich Adrenocarcinoma Development

O.V. SAFRANCHUK, A.N. GOLTSEV

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

Аденокарцинома Эрлиха (АКЭ) – широко используемая модель для изучения особенностей трансформированных клеток. Причиной возникновения неопластических процессов в организме могут быть нарушения сбалансированных механизмов индукции и регуляции процессов пролиферации и апоптоза. Одним из подходов подавления чрезмерной пролиферативной активности опухолевых клеток является влияние физико-химических факторов на развитие в них процессов апоптоза. В частности установлено, что в условиях гипотермии клетки АКЭ *in vitro* снижают свой пролиферативный потенциал.

Цель работы – исследовать влияние гипотермии на активность роста АКЭ *in vivo*.

В экспериментах использовали 5-месячных самок мышей линии BALB/c. Животные после внутрибрюшинного введения клеток АКЭ в дозе  $3 \times 10^6$  в 0,3 мл физиологического раствора были разделены на две группы. Первая находилась в стандартных температурных условиях вивария ИПКиК НАН Украины (18-20°C), а вторая – при 4-7°C. Активность апоптотических процессов в клетках перитонеального эксудата оценивали по процентному содержанию Хехст-положительных клеток. Манипуляции с животными выполнены согласно Международным принципам “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

При исследовании воздействия гипотермии на развитие АКЭ *in vivo* было отмечено снижение пролиферативных свойств клеток данной опухоли. Так, на 5-е сутки развития опухоли количество клеток АКЭ в брюшной полости животных опытной группы составило  $0,31 \times 10^8$ , а у животных контрольной группы –  $3,45 \times 10^8$ . Количество клеток у животных экспериментальной группы составляло  $4,86 \times 10^8$  на 10-е сутки, у контрольной  $9,7 \times 10^8$ ; на 15-е сутки –  $6,2 \times 10^8$  и  $11,05 \times 10^8$  соответственно. Наряду со снижением кинетики АКЭ увеличивалась выжи-ваемость животных опытной группы. Так, гибель всех животных опытной группы наблюдалась на 35-е сутки, а в контрольной – к 20-м суткам.

Отмечены существенные различия развития апоптотических процессов в клетках АКЭ, характер которых зависел от фазы развития патологии и температурных условий содержания животных.

Ehrlich adenocarcinoma (EAC) is widely used model to study the peculiarities of transformed cells. The reason of appearance neoplastic processes in organism could be impairments of well-balanced mechanisms of induction and regulation of proliferation and apoptosis processes. One of the approaches to suppress excessive proliferative activity of tumor cells is influence of physical and chemical factors on the development in them of apoptosis processes. In particular, it was found that under hypothermia conditions EAC cells *in vitro* reduced their proliferative potential.

The research purpose is to study the influence of hypothermia on EAC growth activity *in vivo*.

In the experiments there were used 5 months' female BALB/c mice. Animals after intra-abdominal injection of EAC cells in  $\times 10^6$  dose in 0.3 ml physiological solution were separated into two groups. The first one was at standard temperature of vivarium conditions of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (18-20°C), and another one was at 4-7°C. The activity of apoptotic process in peritoneal exudate cells was estimated on content percentage of Hoechst-positive cells. The manipulations with animals were performed in accordance with International principles of “European Convention on Vertebrate Protection, Used for Experimental and other Scientific Aims” (Strasbourg 1985).

During studying of hypothermia influence on EAC development *in vivo* there was marked the reduction of proliferative properties of this tumor cells. Thus to the 5-th day of tumor development EAC cells' quantity in abdominal cavity of experimental group animals made  $0.31 \times 10^8$ , and  $3.45 \times 10^8$  for the control group of animals. Cell quantity in experimental group of animals made  $4.86 \times 10^8$  to the 10th day and  $9.7 \times 10^8$  for the control; to the 15-th day it was  $6.2 \times 10^8$  and  $11.05 \times 10^8$ , correspondingly. Alongside with the reduction of EAC kinetics the survival of animals in experimental group has increased. Thus death of all the animals in experimental group was observed to the 35-th day, and to the 20-th day in the control one.

There were revealed the development differences of apoptotic processes in EAC cells, the character of which depended on development phase of pathology and temperature conditions of animals' keeping.



## К вопросу о гипертоническом криогемолизе эритроцитов млекопитающих

С.С. ЕРШОВ

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

## To the Question of Hypothermal Mammalian Erythrocyte Cryohemolysis

S.S. ERSHOV

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

Для эритроцитов человека характерно снижение уровня гипертонического криогемолиза при увеличении продолжительности инкубирования клеток (до 120 мин) в гипертонической среде (1,2 М NaCl) при 37°C. Аналогичные зависимости мы получили для эритроцитов собаки и лошади в отличие от клеток быка (что может быть объяснено недостаточной для эритроцитов быка тоничностью среды).

Указанный феномен исследователи связывают со снижением осмотического градиента на мембране в результате времязависимого поступления ионов Na<sup>+</sup> из окружающей среды в клетки.

Замещение во внеклеточном гипертоническом растворе ионов Na<sup>+</sup> на ионы K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> или комбинацию ионов K<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup> позволило выявить различия в реакции эритроцитов млекопитающих на охлаждение от 37 до 0°C в гипертонической среде. Для эритроцитов человека снижение уровня гипертонического криогемолиза по времени было минимальным в среде, содержащей NaCl, максимальным – в LiCl. Для клеток собаки получена фактически обратная зависимость.

Понижение начальной температуры, от которой проводилось охлаждение до 0°C, позволило наблюдать инверсию классической временной зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов человека, причем повреждаемость эритроцитов перестает снижаться со временем при начальной температуре 28-24°C.

Ингибиторный анализ активного (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза) и пассивного (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> ко-транспорт) транспорта ионов не показал статистически достоверных отличий временной зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих от контрольных величин.

Таким образом, в основе инициации и развития временной зависимости гипертонического криогемолиза эритроцитов млекопитающих лежат процессы, зависящие от температуры и ионного состава инкубационной среды, в то время как участие исследованных систем активного и пассивного калий-натриевого транспорта достоверно не установлено.

For human erythrocytes the reduction of hypertonic cryohemolysis level is typical under an increase in cell incubation duration (up to 120 min) in hypertonic medium (1.2 M NaCl) under 37°C. The similar dependency we obtained for canine and equine erythrocytes in contrast to bovine cells (that may be explained by medium insufficient tonicity for bovine erythrocytes).

Specified phenomenon the researchers associate with the decrease of osmotic gradient in membrane as the result of time-dependent Na<sup>+</sup> ions from environment into cells.

Substitution in extracellular hypertonic solution of Na<sup>+</sup> ions to Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ones or to combination of K<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup> ions enabled the revealing of differences in mammalian erythrocyte responses to cooling from 37 to 0°C in hypertonic medium. For human erythrocytes a decrease of hypertonic cryohemolysis level was minimal in the medium, containing NaCl, and maximal one in LiCl. For canine cells actually an opposite dependence was found.

Reducing an initial temperature, from the one at which the cooling was started down to 0°C, enabled the observing of inversion of classical time dependence of human erythrocyte hypertonic cryohemolysis, moreover the damage of erythrocytes stopped the reducing from the time of initial temperature 28-24°C. Inhibitor analysis of active (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and passive (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transport) of the ion transport did not show statistical and significant differences of time dependence of mammalian erythrocyte hypertonic cryohemolysis on the control values.

Thus, into the base of initiation and development of time dependence of mammalian erythrocyte hypertonic cryohemolysis are laid the processes, depending on temperature and ion composition of incubation medium, meanwhile the participation of studied systems of active and passive potassium-sodium transport have not been statistically and significantly found.

## Инициация внеклеточного кристаллообразования при замораживании спермиев быка

А.Г. МИШЕНКО, Л.В. ГОРБУНОВ  
Институт животноводства УААН, г. Харьков

## Initiation of Extracellular Crystal Formation When Freezing Bovine Sperm

A.G. MISCHENKO, L.V. GORBUNOV  
Animal Breeding Institute, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

Установлено, что инициация внеклеточного кристаллообразования повышает сохранность деконсервированного биологического материала (Олейник С.Т., 1987). Так, при охлаждении спермиев рыбы с целью минимизации переохлаждения применяют ступенчатое охлаждение (Копейка Е.Ф., 1986). Спермии быка замораживают без использования иницирующих рост кристаллов элементов (Осташко Ф.И., 1990), вследствие чего увеличивается величина переохлаждения образца и понижается сохранность деконсервированного биообъекта.

Цель работы – исследование влияния инициации внеклеточного кристаллообразования на подвижность деконсервированных спермиев быка и последующая разработка контейнера для их содержания при замораживании-оттаивании.

При замораживании спермиев быка инициация внеклеточного кристаллообразования происходила посредством создания интенсивного теплоотвода в нижней части образца по металлическому иглообразному стержню. Стержни, иницирующие рост кристаллов, одним концом касались охлаждаемой среды, а другим – дна термоблока, который располагался в горловине сосуда Дьюара. Установлено, что при инициации роста кристаллов подвижность деконсервированных спермиев быка увеличивается с  $35,6 \pm 2,5$  до  $45,9 \pm 2,5\%$  вследствие уменьшения переохлаждения и интенсивности выброса скрытой теплоты кристаллизации.

На основе полученных результатов разработан технологический контейнер конусообразной формы для размещения спермиев животных при низкотемпературном консервировании. Такая форма применяется для усиления степени инициации кристаллообразования. Определены условия заполнения-извлечения биоматериала, при которых воздействия на спермии величин гидродинамического давления и напряжения сдвига минимальны. Установлено, что подвижность спермиев быка понижается на  $21,7 \pm 2,5\%$ , при увеличении скорости заполнения-извлечения – с 1 до 2 мл/с и уменьшении диаметра нижнего отверстия контейнера – с 0,5 до 0,3 мм.

Разработанный контейнер удобен для заполнения-извлечения биоматериала в процессе криоконсервирования, а также соблюдения правил асептики.

It has been established that initiation of extracellular crystal formation increases the survival of frozen-thawed biological material (Olejnik S.T., 1987). So, during cooling of fish sperm to minimize overcooling there was used stepwise cooling (Kopejka E.F., 1986). Bovine sperm is frozen with no use of initiating crystal growth elements (Ostashko F.I., 1990), as the consequence of that the value of overcooled sample increases and the survival of frozen-thawed object reduces.

The research aim was to study the effect of initiation of extracellular crystal formation on the motility of frozen-thawed bovine sperm and following designing of the container for their maintenance during freeze-thawing.

When freezing bovine sperm the initiation of extracellular crystal formation occurred by the creation of intensive heat-conducting in the sample bottom along side of metal needle-like rod. One end of the rods initiating the crystal growth reached a medium to be cooled and another one did the thermal block bottom, the block was located in Dewar vessel neck. It has been found that during initiation of crystal growth the motility of frozen-thawed bovine sperm increases from  $35.6 \pm 2.5$  to  $45.9 \pm 2.5\%$  due to a decrease in overcooling and intensity of latent crystallization heat release.

On the base of the results obtained there has been developed technological container of cone-like shape to place the animal's sperm under low temperature preservation. This shape is used for strengthening the initiation degree of crystal formation. There have been determined the conditions of filling and removing of biological material under which the effects on sperm of the values of hydrodynamic pressure and shift tension are minimal. It has been found that motility of bovine sperm reduces by  $21.7 \pm 2.5\%$  with a rise in the rate of filling-removing from 1 to 2 ml/sec and reduction of diameter of container lower aperture from 0.5 to 0.3 mm.

Designed container is easy to be used for filling and removing of biological material during cryopreservation as well as meeting the aseptic requirements.

# Система паспортизации перевиваемых клеточных линий, хранящихся в низкотемпературных банках

А.А. ЛАВРИК, Б.Т. СТЕГНИЙ, В.С. БЕЛОКОНЬ

Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков

## Certification System for Recultured Cell Lines, Stored at Low Temperature Banks

A.A. LAVRIK, B.T. STEGNIY, V.S. BELOKON

Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov

В серии технических докладов ВОЗ определены требования к линиям клеток, используемым в производственных и научно-исследовательских целях. Гарантом выполнения этих требований во всем мире стала система организации низкотемпературных банков клеток, где каждая культура должна иметь паспорт качества. Основными такими параметрами являются чистота от контаминирующих агентов, аутентичность и стабильность, однако методическая основа исследований этих параметров до сих пор не стандартизирована и не достаточна для полной оценки биологических параметров культуры.

Цель работы – совершенствование системы паспортизации перевиваемых линий клеток с использованием молекулярных и цитогенетических методов исследования.

Для индикации микоплазменной контаминации в сравнении с серологическими методами исследований в ИЭКВМ был внедрен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение праймеров к роду *Mycoplasma* (AmpliSens, Россия) показало высокую чувствительность детекции микоплазменной контаминации с помощью ПЦР. Используемые в качестве контроля 4 вида микоплазм (*Mycoplasma inners*, *Mycoplasma gallinarum* B-733, *Mycoplasma* 2795 и *Acholeplasma laidlawii*) также подтвердили высокую специфичность метода ПЦР. Данными видами были экспериментально контаминированы перевиваемые линии клеток ВНК-21 и FLK-SBBL. С помощью ПЦР были успешно идентифицированы эти контаминанты, тогда как при серологическом методе был получен сомнительный результат, который зависел от количества микоплазм в исследуемой пробе.

При исследовании стабильности кариотипа перевиваемых клеточных культур, хранящихся в криобанке ИЭКВМ, использовали классический цитогенетический метод и метод учета митотического режима клеток, который с этой целью применялся в системе паспортизации культур впервые. Было исследовано 17 перевиваемых линий клеток, имеющих различное видовое происхождение (SPEV, PK-15-IECVM, PTP, LEK, MDBK, PT, MDCK, ВНК-21/ 2-17, ВНК clone 13/04, Vero, CV, NGUK, F-81, PO-2, PO-2/04, RK-13 и PS-FGM). В большинстве случаев наличие модального класса (группы) хромосом в клетках исследуемых культур прямо коррелировало с минимальным процентом патологических митозов (не выше 20% от делящихся клеток). Оба критерия свидетельствуют о стабильном кариотипе клеток. В то же время наблюдались исключения, когда в культурах PTP и MDCK наличие модальной группы хромосом сочеталось с повышенным количеством патологических митозов (>20%).

Таким образом, было показано, что для оценки стабильности кариотипа клеточных линий применение одного классического цитогенетического метода недостаточно, поэтому необходимо использовать с этой целью метод оценки митотического режима клеток. Также доказана эффективность метода ПЦР для идентификации микоплазменной контаминации клеточных культур, что требует его внедрения в систему паспортизации клеток.

In the series of the WHO technical reports there were defined the requirements to cell lines, used in production and for scientific-research purposes. The guarantee of meeting these requirements all over the world became the system for establishing low temperature banks of cells, where the quality for each culture should be certified. These main parameters are such as: purity from contaminating agents, authenticity and stability, but the methodical grounds for studying these parameters have not been standardized yet and are insufficient for a complete estimation of culture biological parameters.

This research was targeted to improve the certification system for recultured cell lines with using molecular and cytogenetic research methods.

The PCR method was introduced into the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine to indicate mycoplasma contamination in comparison with serological research methods. Applying the primers to *Mycoplasma* genera (AmpliSens, Russia) has demonstrated a high sensitivity to mycoplasma contamination using PCR. Used as the control 4 mycoplasma species (*Mycoplasma inners*, *Mycoplasma gallinarum* B-733, *Mycoplasma* 2795 and *Acholeplasma laidlawii*) confirmed a high specificity of PCR method as well. Recultured ВНК-21 and FLK-SBBL cell lines were experimentally contaminated with these species. These contaminants were successfully identified using PCR, meanwhile at a serological method a controversial result, depending on mycoplasma amount in studied sample was obtained.

When investigating the karyotype stability of recultured cell cultures, stored at the cryobank of Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine there were used the standard cytogenetic method and that for counting mitotic cell regimen, which was firstly applied with this aim in certification system. We investigated 17 recultured cell lines, having different specific origin (SPEV, PK-15-IECVM, PTP, LEK, MDBK, PT, MDCK, ВНК-21/ 2-17, ВНК clone 13/04, Vero, CV, NGUK, F-81, PO-2, PO-2/04, RK-13 and PS-FGM). In the majority of cases the presence of modal class (group) of chromosomes in cells of studied cultures directly correlated with a minimum percentage of pathological mitosis (not higher than 20% of dividing cells). Both criteria testify to a stable cell karyotype. At the same time the exclusions, where in PTP and MDCK cultures the presence of modal group of chromosomes was combined with an increased amount of pathological mitoses (>20%).

Thus, the application of one standard cytogenetic method has been demonstrated to be insufficient for estimating karyotype stability of cell lines, therefore using the method of cell mitotic regimen evaluation for this purpose is needed. The PCR method efficiency to identify mycoplasma contamination in cell cultures is also proved, that requires its introduction into the system of cell certification.

## Криоконсервирование клеток костного мозга собак под защитой проникающих и непроникающих криопротекторов

Л.А. ВОДОПЬЯНОВА, Г.Ф. ЖЕГУНОВ

*Харьковская государственная зооветеринарная академия*

## Cryopreservation of Canine Bone Marrow Cells Under Protection of Penetrating and Non-penetrating Cryoprotectants

L.A. VODOPYANOVA, G. F. ZHEGUNOV

*Kharkov State Zooveterinary Academy*

Цель работы – исследование сохранности клеток костного мозга собак после криоконсервирования без применения криопротекторов и при использовании растворов ДМСО 5, 7, 10%; ПЭО-400 10, 15, 20% и глицерина 10, 20, 30%. Перечисленные криопротекторы не оказывали существенного влияния на сохранность клеток костного мозга собак во время экспозиции перед замораживанием. Показатели сохранности клеток существенно не отличались от данных, полученных при использовании свежеполученной суспензии клеток.

Сохранность клеток в присутствии ДМСО 7% составляла до 83%. Установлено, что ПЭО-400 и глицерин менее эффективны. В присутствии глицерина сохраняется только 59% клеток костного мозга, а ПЭО – до 74%. Наименьший показатель сохранности клеток КМ 45% получен в пробах, замороженных под защитой 30%-го раствора глицерина.

Один из критериев жизнеспособности клетки – состояние ее энергетической системы. Инкубация клеток костного мозга собак с растворами криопротекторов снижает содержание гликогена в клетках. Причем, чем выше концентрация и длительнее инкубация, тем ниже средний гистохимический коэффициент (СГК).

После замораживания-отогрева содержание гликогена в клетках значительно снижается. В меньшей степени этот процесс выражен в недифференцированных бластах и миелобластах.

Наиболее эффективным из примененных криопротекторов оказался ДМСО в концентрации 7%, но показатели СГК в клетках, криоконсервированных под защитой растворов ДМСО и ПЭО-400, отличались незначительно.

Глицерин как криопротектор во всех использованных концентрациях был малоэффективен.

Дальнейшее изучение содержания энергетического материала в элементах гемопоэза позволит получить необходимые данные для понимания метаболических особенностей кроветворных клеток при действии криопротекторов и низких температур. На этой основе возможна разработка эффективного способа долгосрочного хранения и использования костного мозга.

The research aim is to study the survival rate for the cells of canine bone marrow after cryopreservation with no use of cryoprotectants and when using DMSO solutions of 5, 7, 10%; PEO-400 10, 15, 20% and glycerol 10, 20, 30%. Listed cryoprotectants did not render considerable effect on the integrity of canine bone marrow cells during exposure prior to freezing. The indices of cells integrity did not significantly differ from the data obtained when fresh cell suspension was used.

Cell integrity in 7% DMSO presence made up to 83%. It has been found that PEO-400 and glycerol are less effective. In glycerol presence only 59% bone marrow cells are preserved and PEO does up to 74%. The lowest index of bone marrow integrity 45% was obtained in the samples frozen with 30% glycerol solution.

One of the criteria of cell viability is the state of its energetic system. Incubation of the cells of canine bone marrow with the solutions of cryoprotectants decreases the content of glycogen in the cells.

Moreover the higher concentration and longer incubation, the lower mean histochemical coefficient (MHC).

After freeze-thawing the content of glycogen in the cells significantly reduces. In non-differentiated blasts and myeloblasts this process is less manifested.

DMSO under concentration of 7% occurred to be the most efficient, but the indices of MHC in the cells cryopreserved under protection of DMSO and PEO-400 differed insignificantly.

Glycerol as cryoprotectants under all studied concentrations was inefficient.

Further investigation of the content of energetic material in hemopoiesis elements enables to obtain needed data for understanding metabolic peculiarities of hemopoietic cells under the effect cryoprotectants and low temperatures. On this base the development of effective way of long-term storage and use of bone marrow is possible.



# Влияние анионов лиотропного ряда в среде дегидратации на гипертонический лизис эритроцитов человека

О.К. ПАКУЛОВА

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

## Influence of Lyotropic Series Anions in Dehydration Medium on Hypertonic Lysis of Human Erythrocytes

O.K. PAKULOVA

V.N. Karazin National University, Kharkov

Установлено, что чувствительность эритроцитов к действию гипертонического шока зависит от состояния цитоплазматического геля и мембраны. Устойчивость этих структур определяется состоянием липидов и белков мембраны, количеством и прочностью контактов между липидным бислоем и цитоскелетным гелем и внутри последнего, а также его способностью взаимодействовать с водой.

Известно, что физико-химические и биологические процессы контролируются свойствами растворителя, которые определяются природой растворенных веществ (лиотропия). Ионы в зависимости от положения в лиотропном ряду по-разному действуют на такие параметры, как агрегатное состояние гелей высокомолекулярных соединений, структуру воды и пр. Наибольшее влияние на состояние гелей оказывают анионы.

Цель работы – выяснить, влияют ли анионы лиотропного ряда на гипертонический лизис эритроцитов человека (4 М NaCl при pH 7,4). Предварительная дегидратация осуществлялась в ряду концентраций (0,15-1,2 М) различных солей Na (NaF, NaCl, NaBr, AcNa, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) при температуре 37 и 0°C.

Для всех исследуемых анионов и температурных режимов зависимость имела сходный характер (увеличение сохранности эритроцитов при перенесении в гипертоническую среду из растворов 600-900 мОсмоль/кг и наибольшее повреждение – при дегидратации в средах 1500 мОсмоль/кг и выше).

Наряду с этим, клетки, предынкубированные с анионами Br<sup>-</sup> и F<sup>-</sup> (в изотонической области при 37°C), повреждались 4 М NaCl в меньшей степени, чем после предынкубации с Ac<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup>. При низких температурах картина изменялась на противоположную.

Предынкубация с анионами Br<sup>-</sup> (независимо от температуры) смещала точку максимальной устойчивости клеток до 600 мОсмоль/кг. При 0°C максимум повреждения (66,6-67,1%) таких клеток приходился на меньшую осмолярность (1200-1500 мОсмоль/кг). Напротив, эритроциты, которые дегидратировались в средах с анионами Ac<sup>-</sup>, имели минимальный уровень повреждения (25,8 %), который соответствовал точке 0,9 М.

Повреждение эритроцитов, предобработанных с анионами Ac<sup>-</sup> и Cl<sup>-</sup>, имело максимальную зависимость от температуры в любой области осмолярности, тогда как в случае с Br<sup>-</sup> и F<sup>-</sup> эта зависимость была минимальной.

Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли осмолярности среды на этапе предынкубации в контроле чувствительности эритроцитов к гипертоническому шоку (4 М NaCl), особенно при 37°C. Однако, при нулевых температурах существенно влияние анионов лиотропного ряда. Механизм этого воздействия требует дальнейшего исследования.

Erythrocyte sensitivity to the effect of hypertonic stress was established to depend on the state of cytoplasmic gel and membrane. Resistance of these structures is determined by the state of membrane lipids and proteins, the amount and stability of contacts between lipid bilayer and cytoskeletal gel and inside the latter, as well as by its capability of interacting with water.

Physical-chemical and biological processes are known to be controlled by the properties of a solvent, which are determined by the nature of dissolved substances (lyotropy). Depending on a position in lyotropic series the ions differently affect such parameters as an aggregate state of gels of high-molecular compounds, water structure etc. The highest influence on gel state is caused by anions.

The aim was to find-out whether anions of lyotropic series affect hypertonic lysis of human erythrocytes (4M NaCl at pH 7.8). Pre-dehydration was realised in concentration series (0.15-1.2M) of various Na salts (NaF, NaCl, NaBr, AcNa, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at 37 and 0°C.

For all studied anions and temperature regimens the dependency was of the same character (an increase in erythrocyte integrity when transferring into hypertonic medium from 600-900 mOsmol/kg solutions and the highest damage under dehydration in the media of 1500 mOsmol/kg and higher).

Along with this, the cells, pre-incubated with Br<sup>-</sup> and F<sup>-</sup> anions (in isotonic range at 37°C) were less damaged with 4M NaCl than after pre-incubation with Ac<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup>. Under low temperatures the picture changed to an opposite one.

Pre-incubation with Br<sup>-</sup> anions (independently on temperature) shifted the point of maximum cell resistance towards 600 mOsmol/kg. At 0°C the damage maximum (66.6-67.1%) of these cells was accounted for lower osmolarity (1200-1500 mOsm/kg). In contrast, the erythrocytes, dehydrated in Ac<sup>-</sup> anion-media had the maximum damage level (25.8%), corresponding to the 0.9 M point.

Damage of erythrocytes, pre-treated with Ac<sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> anions had the maximum dependency on temperature in any range of osmolarity, meanwhile in case of Br<sup>-</sup> and F<sup>-</sup> it was minimum.

The data obtained testify to a leading role of medium osmolarity at pre-incubation stage in controlling the erythrocyte sensitivity to hypertonic stress (4 M NaCl) especially at 37°C. However, under zero temperatures the influence of lyotropic series anions is significant. Mechanism of this effect needs further research.

# Модулирование состояния прооксидантно-антиоксидантной системы головного мозга ксенопрепаратами при экспериментальном хроническом алкогольном отравлении

Г.А. КОВАЛЕВ, Д.В. ЧЕРКАШИНА

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

## Modulating the State of Prooxidant-Antioxidant Brain System With Xenopreparations Under Experimental Chronic Alcohol Poisoning

G.A. KOVALEV, D.V. CHERKASHINA

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

Чрезмерная активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) является универсальным механизмом деградации биомембран при многих патологических процессах, в том числе алкоголь-индуцированных поражениях головного мозга. Для лечения патологии головного мозга алкогольного генеза актуальна разработка новых терапевтических подходов с использованием ксенопрепаратов, эффективность которых уже доказана при лечении многих заболеваний.

Цель работы – изучение влияния ксенопрепаратов на интенсивность протекания процессов ПОЛ в головном мозге при экспериментальном хроническом алкогольном отравлении.

В работе использовали 3-месячных белых беспородных крыс-самок, хроническое отравление алкоголем моделировали, как описано нами ранее (Ковалев Г.А., Петренко А.Ю., 2005), после чего животных переводили на малую дозу алкоголя (15%-й раствор этанола как единственный источник жидкости). В качестве ксенопрепаратов использовали экстракт головного мозга (ЭГМ) новорожденных поросят, препарат “Фетатек” (бесклеточный цитозоль эмбриональных тканей человека мезодермального происхождения), криоконсервированные клетки эмбрионального мозга (КЭМ) человека 9-12 недель гестации. Оценку прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга проводили через две недели. Для описания прооксидантного статуса клеток головного мозга определяли базальный уровень ТБК-активных продуктов и интенсивность индуцированного ПОЛ. Состояние антиоксидантной системы головного мозга оценивали по изменению активности её основных ферментативных составляющих – каталазы и глутатионпероксидазы.

По сравнению с контролем введение экстракта головного мозга или “Фетатек” приводило к снижению базального уровня ТБК-активных продуктов в 1,4 раза, использование КЭМ – в 2,1 раза. Интенсивность индуцированного ПОЛ под влиянием экстракта головного мозга уменьшалась в 3 раза, под влиянием “Фетатек” или КЭМ – в 1,6 и 2,7 раза соответственно. Глутатионпероксидазная активность возрастала при введении ЭГМ в 1,3 раза, “Фетатек” – в 1,4 раза, использовании КЭМ – достоверно не изменялась. Каталазная активность при введении любого из ксенопрепаратов достоверно не изменялась. Таким образом, базальный уровень ТБК-активных продуктов наиболее выражено снижался под влиянием КЭМ, максимальное уменьшение активности индуцированного ПОЛ происходило под влиянием ЭГМ и КЭМ, стимуляция глутатионпероксидазной активности наблюдалась под влиянием “Фетатек” и ЭГМ. Полученные результаты могут быть основой для разработки новых методов лечения алкоголь-индуцированных поражений головного мозга.

An excessive activation of lipid peroxidation (LPO) processes is a broad-based mechanism of biomembrane degradation under many pathological processes, including alcohol-induced brain damages. Development of new therapeutic approaches using xenopreparations, which efficiency has been already proved in treating many diseases, has been actual task for treating brain pathology of alcohol genesis.

The research was aimed to study the influence of xenopreparations on LPO course intensity in brain under experimental chronic alcohol poisoning.

In the research we used 3 months' white breedless female rats, chronic alcohol poisoning was modeled as we previously reported (Kovalev G.A., Petrenko A.Yu., 2005), then alcohol dose for animals was changed for a low one (15% ethanol solution as the only source of liquid). As xenopreparations we used newborn piglet brain cryoextract, “Fetatek” preparation (cell-free cytosol of human embryonic tissues of mesodermal origin), cryopreserved human embryonic brain cells (EBCs) of 9-12 gestation weeks. Estimation of prooxidant-antioxidant brain balance was carried-out following 2 weeks. In order to describe a prooxidant status for brain cells a basal level of TBA-active products and the induced LPO intensity have been determined. State of brain antioxidant system was estimated by a change in activity of its main enzyme components: catalase and glutathione peroxidase.

If to compare with the control the introduction of brain extract or “Fetatek” resulted in a decrease in basal level of TBA-active products in 1.4 and in 2.1 times for EBCs. Induced LPO intensity under brain extract effect reduced thrice and it was in 1.6 and 2.7 times lower under “Fetatek” or EBCs effect, correspondingly. Glutathione peroxidase activity increased in 1.3 times during brain extract introduction, in 1.4 times for “Fetatek” and did not statistically and significantly change during EBCs use. There was no statistically significant change in catalase activity when introducing any of the xenopreparations. Thus, the most manifested basal level of TBA-active products reduced under EBCs influence, the maximum decrease in the induced LPO activity occurred under brain extract and EBCs influence, the stimulation of glutathione peroxidase activity was observed under “Fetatek” and brain extract effect. The results obtained may serve the base for designing new approaches to treat alcohol-induced brain damages.

# Оценка эффективности технологий криоконсервирования ооцитов млекопитающих в широком диапазоне скоростей теплообмена

А.С. САЛИНА, Л.В. ГОРБУНОВ  
Институт животноводства УААН, г. Харьков

## Estimation of Cryopreservation Technology Efficiency for Mammalian Oocytes within a Wide Range of Heat Exchange Rates

A.S. SALINA, L.V. GORBUNOV  
Animal Breeding Institute, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

При использовании абсолютного показателя оценки сохранности деконсервированных ооцитов для получения достоверного результата необходимо большое количество биоматериала ( $n \geq 100$ ), что усложняет установление эффективной технологии криоконсервирования и исследование всех ее этапов. Для решения этой проблемы предложен метод нейтрализации разного качества биообъекта при помощи перехода к относительным величинам (Горбунов Л.В., Салина А.С., 2005).

Цель работы – сравнительный анализ методов криоконсервирования ооцитов коров и мышей в широком диапазоне скоростей теплообмена на основе использования относительных величин.

Объектом исследования служили ооциты коров и мышей, полученные по общепринятым методикам. Замораживание проводили при медленных, высоких и сверхвысоких скоростях. Сохранность замороженно-оттаянных ооцитов определяли морфологически, а также по результатам культивирования и оплодотворения *in vitro*. Показатели выживаемости клеток устанавливали по специально разработанным прикладным программам.

Для оценки эффективности существующих технологий криоконсервирования по абсолютным показателям проведен анализ литературных и собственных данных, при котором наблюдался разброс значений сохранности. Переход к относительным показателям дает возможность оценивать не только эффективность технологии в целом, но и отдельные ее элементы. Показано, что относительный показатель выживаемости (ПВ), отражающий эффективность способа культивирования, изменяется от  $13,8 \pm 8,8$  до  $82,5 \pm 1,7\%$  и имеет также большой разброс (68,7%), обусловленный применением разных культуральных сред. Аналогичную высокую вариабельность (92,0%) имеет ПВ, характеризующий влияние криопротекторов на биообъект (от  $5,3 \pm 1,8$  до  $97,3 \pm 2,0\%$ ), что можно объяснить длительностью пребывания клеток в растворе криопротектора.

Показатель выживаемости, определяющий эффективность способа криоконсервирования (от  $11,6 \pm 2,6\%$  до  $100 \pm 4,6\%$ ), имеет разброс 88,4%, который обусловлен вариацией скорости охлаждения ( $0,1 \div 10000^\circ\text{C}/\text{мин}$ ), отношением скорости оттаивания к скорости замораживания ( $v_{\text{от}}/v_{\text{з}} = 0,8 \div 2,7$ ). При замораживании ооцитов коровы в закрытых вытянутых пластиковых капиллярах диаметром 1 мм ( $v_{\text{з}} = 6000^\circ\text{C}/\text{мин}$ ,  $v_{\text{от}}/v_{\text{з}} = 1,2$ ), тогда как сохранность составляет  $9,1 \pm 8,7\%$  (Салина А.С. и соавт., 2006), мы получили ПВ 100% из-за низкой эффективности технологии культивирования.

При сопоставлении показателей эффективности отдельных составляющих этапов технологии установлено, что ПВ, определяющий эффективность способа криоконсервирования, соответствует максимальному уровню 100%, при выборе криопротектора – 97,3%, после применения культуральных сред – 90,0%. Следовательно, возможна дальнейшая оптимизация процессов подбора культуральных сред и криопротектора.

Use of absolute index to estimate the survival of frozen-thawed oocytes for obtaining statistically significant result a large amount of biological material is necessary ( $n \geq 100$ ), that complicates the creation of effective cryopreservation technology and studying all its stages. To solve this task there has been proposed the method of neutralizing various qualities of biological objects with using relative values (Gorbunov L.V., Salina A.S., 2005).

The research goal is a comparative analysis of cryopreservation methods of mouse and cow oocytes within the range of heat exchange rates by means of application of relative values.

Mouse and cow oocytes, derived according to traditional methods, served as research objects. Freezing was conducted at low, high and ultrahigh rates. The survival of frozen-thawed oocytes was examined morphologically as well as using the results of culturing and fertilization *in vitro*. Cell survival indices were found with specially designed applied programmes.

To estimate the efficiency of existing cryopreservation technologies on absolute indices there has been analyzed the literature and own data, herewith the data were found as having a certain variation. Using of relative indices gives the possibility to assess not only the efficiency of a technology in a whole but also of its separate elements. It has been shown that relative survival index (SI) reflecting the efficiency of the culturing method changes from  $13.8 \pm 8.8$  to  $82.5 \pm 1.7\%$  and also has a big dispersion (68.7%), stipulated by the application of different culturing media. The same high variability (92.0%) is also inherent to SI, characterizing the effect of cryoprotectants on biological object (from  $5.3 \pm 1.8\%$  to  $97.3 \pm 2.0\%$ ) that could be explained by the duration of cell staying in the solution of cryoprotectant.

Survival index, determining the efficiency of cryopreservation method (from  $11.6 \pm 2.6\%$  to  $100 \pm 4.6\%$ ) has a dispersion of 88.4% which is stipulated by the variation of cooling rate ( $0.1 \div 10,000^\circ\text{C}/\text{min}$ ), ratio of thawing rate to freezing rate ( $v_{\text{th}}/v_{\text{f}} = 0.8 \div 2.7$ ). When freezing cow oocytes in closed elongated plastic capillaries with 1mm diameter ( $v_{\text{f}} = 6,000$ ,  $v_{\text{th}}/v_{\text{f}} = 1.2$ ), meanwhile the survival makes  $9.1 \pm 8.7\%$  (Salina A.S. et al., 2006) because of low efficiency of culturing technology we obtained 100% SI.

When comparing the efficiency indices of separate components of technology it has been found that the SI determining the efficiency of cryopreservation protocol corresponds to a maximum level 100%, when selecting a cryoprotectant it makes 97.3%, after use of culturing media this was 90.0%. Therefore there is a possibility to further optimization of selection processes of cultural media and cryoprotectant.

# Экспериментальный атеросклероз и лейкоцитарный клиренс липидов при аллогенной трансплантации криоконсервированной плаценты

И.И. КОНДАКОВ

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

## Experimental Atherosclerosis and Leukocyte Clearance of Lipids Under Allogenic Transplantation of Cryopreserved Placenta

I.I. KONDAKOV

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

Цель данного исследования – изучение влияния введения аллогенной криоконсервированной плаценты (АКП) на динамику показателей липидного обмена и морфологические особенности лейкоцитов периферической крови при экспериментальном атеросклерозе и спонтанном регрессе атеросклероза у кроликов.

Введение фрагментов криоконсервированной плаценты (КП) на пике развития холестериновой модели атеросклероза (27 неделя) к 33 неделе приводила к нормализации показателей липидного обмена, что выражалось в трехкратном снижении уровня общего холестерина и двукратном снижении уровня триглицеридов (ТГ) при нормализации концентрации липопротеидов высокой плотности (ЛПВП).

Нормализация липидного обмена в группе животных с введением фрагментов КП сопровождалась быстрым, в течение 2-х недель, уменьшением числа липидсодержащих лейкоцитов. В группе животных со спонтанным регрессом атеросклероза нормализация липидного спектра происходила в течение 3-х недель с повышением числа липидсодержащих лейкоцитов.

При корреляционном анализе возможных взаимосвязей числа липиднагруженных клеток и показателей липидного обмена в группе животных с КП установлено, что достоверные и значимые взаимосвязи существовали с ТГ, ЛПВП, ЛПНП. Уровень общего холестерина (ОХС) оказывал меньшее влияние на развитие патологического процесса.

Установлено, что наличие липидных включений в цитоплазме лейкоцитов свидетельствует о существовании механизма клиренса липидов из крови.

Увеличение числа липидсодержащих лейкоцитов при экспериментальном атеросклерозе является проявлением реакции ретикулоэндотелиальной системы на нарастание в крови содержания уровня общего холестерина, а не его атерогенных фракций.

При введении аллогенной криоконсервированной плаценты высокая корреляционная взаимосвязь между числом липидсодержащих лейкоцитов и ТГ, ЛПВП, ОХС указывает на участие лейкоцитов в ускоренной утилизации атерогенных фракций холестерина из крови.

Триггерный эффект лейкоцитов крови в утилизации избытка холестерина, наравне с печенью, при экспериментальном атеросклерозе у кроликов может быть использован для лечения семейной дислипидемии и наследственной дислипидемии.

This research aim was to study the influence of introduction of allogenic cryopreserved placenta (ACP) on dynamics of lipid metabolism indices and morphological peculiarities of peripheral blood leukocytes under experimental atherosclerosis and spontaneous one regress in rabbits.

Introduction of cryopreserved placenta (CP) fragments on the peak of development of atherosclerosis cholesterol model (27<sup>th</sup> week) resulted in normalisation of lipid metabolism indices to the 33<sup>rd</sup> week, that was manifested in a 3-fold decrease in total cholesterol level and 2-fold reduction of triglyceride (TG) level under normalisation of high density lipoproteins (HDL) concentration.

Normalisation of lipid metabolism in animal group with CP fragment introduction was accompanied with a rapid, reduction of lipid-containing leukocytes amount within 2 weeks. In animal group with spontaneous atherosclerosis regress the normalisation of lipid spectrum occurs within 3 weeks with an increase in the amount of lipid-containing leukocytes.

Using correlative analysis for feasible interactions between the amount of lipid-charged cells and indices of lipid metabolism in the animal group with CP fragments introduction the statistically significant interactions were established as existing with TG, HDL, low density lipoproteins. The total cholesterol level (TCL) affected in a less extent the pathologic process development.

The presence of lipid inclusions into leukocyte cytoplasm was established to testify to the existence of mechanism of lipid clearance out of blood.

Increase in the amount of lipid-containing leukocytes under experimental atherosclerosis is the manifestation of reaction of reticuloendothelial system to the augmentation of total cholesterol level in blood, but not its atherogenic fractions.

When introducing allogenic cryopreserved placenta a high correlative interaction between the number of lipid-containing leukocytes and TG, HDL, TCL indicates to the participation of leukocytes into accelerated utilisation of atherogenic cholesterol fractions out of blood.

Trigger effect of blood leukocytes in utilisation of cholesterol surplus together with liver under experimental atherosclerosis in rabbits can be used for treating familial dislipidemia and hereditary dislipoproteinemia.



# Влияние разного качества эмбрионов млекопитающих на показатели оцениваемой технологии криоконсервирования

Ю.Г. Мищенко, Л.В. Горбунов  
Институт животноводства УААН, г. Харьков

## Influence of Mammalian Embryos With Different Quality on Indices of Cryopreservation Technology Under Study

Yu. G. Mischenko, L. V. Gorbunov  
Animal Breeding Institute, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov

Наиболее распространенным критерием оценки и оптимизации различных технологий замораживания эмбрионов млекопитающих является уровень сохранности деконсервированного биообъекта. Однако эта величина характеризуется широкой вариабельностью ( $C_v \approx 10 \div 200\%$ ) вследствие влияния на нее разного качества (удовлетворительное, хорошее, отличное) и стадии развития (ранняя морула/расширенная бластоциста) биообъекта. Снизить коэффициент вариации, а также провести учет разного качества эмбрионов можно при переходе от качественного метода проведения статистического анализа к количественному (Горбунов Л.В, Салина А.С., 2005).

Цель работы – определить степень влияния разного качества эмбрионов мыши и коровы на показатели оцениваемой технологии криоконсервирования.

Для определения сохранности деконсервированных эмбрионов млекопитающих применяли качественный метод, а для учета разного качества биообъекта – количественный способ оценки их жизнеспособности. Анализ разного качества нативных эмбрионов млекопитающих установил, что показатель их жизнеспособности в зависимости от доли биообъекта разного качества в анализируемой выборке варьирует в пределах 77-90% ( $n=100$ ). Аналогичная ситуация характерна и для деконсервированных эмбрионов: при относительно одинаковом уровне сохранности биообъекта (90%) показатель жизнеспособности значительно изменяется (68÷82%).

При оценке технологии криоконсервирования эмбрионов млекопитающих установлено, что величина относительной погрешности, определенная по показателю сохранности биообъекта, превышает допустимый уровень (5%) и изменяется от 18,1 до 19,3% в зависимости от наличия эмбрионов с различным качеством. Подобная закономерность проявляется не только при оценке средних показателей, но и при установлении их среднеквадратических отклонений. В зависимости от стадии развития деконсервированных эмбрионов мыши и коровы среднеквадратическое отклонение показателя сохранности колеблется от 11,8 до 49,9%, а жизнеспособности – от 5,5 до 11,6%. Варьирование величин жизнеспособности культивированных *in vivo* эмбрионов коровы разного качества и разной стадии развития составляет 5÷28 и 18÷22% ( $n=456$ ) соответственно.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил, что количественный (жизнеспособность) и качественный (сохранность) показатели стадии развития эмбрионов коровы достоверно не влияют на исследуемые величины  $F < F_{\text{табл}}$ , а качество биообъекта существенно влияет на показатели сохранности и жизнеспособности деконсервированного биообъекта с высокой степенью вероятности  $F > F_{\text{табл}}$  ( $P \geq 0,99$ ). При этом чувствительность количественного метода оценки разного качества эмбрионов в 5÷10 раз выше, чем общепринятого (качественного).

The most widely spread criterion of evaluation and optimization of different technologies of mammalian embryo freezing is the survival of frozen-thawed biological object. However this value is characterized with a variability ( $C_v \approx 10 \div 200\%$ ) due to the effect of biological object different quality (satisfactory, good, excellent) and its development stages (early morula/ extended blastocyst). To decrease the variation factor and also to take into account the embryos with varying quality is possible during the transition from qualitative method of statistical analysis to quantitative one (Gorbunov L.V., Salina A.S., 2005).

The research aim is to find out the influence rate for mouse and cow embryos of different quality on the parameters of the estimated cryopreservation technology.

For examining the survival of frozen-thawed mammalian embryo, qualitative methods were applied and to account the biological objects of different quality there was used a vital ability quantitative revealing. Analysis of different quality mammalian embryos has revealed the index in their viability depending on the share of biological object of changing quality in the sample under research as varying within the limits of 77-90 % ( $n=100$ ). The same situation is characteristic for frozen-thawed embryos: at relatively the same level of biological object preservation (90%) a viability index vastly changes (68÷82%).

When estimating a cryopreservation technology for mammalian embryos it has been found that a relative value of an error found on the index biological object survival, exceeds an admissible level (5%) and changes from 18.1 to 19.3% depending on the presence of embryos of different qualities. This regularity appears not only in assessment of the mean values, but in the finding their least square deviation. Depending on development stages of mouse and cow frozen-thawed embryos the least square deviation of survival parameters varies from 11.8 to 49.9%, and from 5.5 to 11.6% for a vital ability. Variation of viability values for *in vivo* cultured cow embryos of different quality and various development stages made 5÷28 and 18÷22% ( $n=456$ ), correspondingly.

Two-factor dispersion analysis established, that quantitative (viability) and qualitative (preservation) parameters of cow embryo stages statistically and significantly did not influence the  $F < F_{\text{табл}}$  values under study and biological object quality greatly changed the survival and viability parameters for frozen-thawed biological object with a high probability degree  $F > F_{\text{табл}}$  ( $P \geq 0.99$ ). Herewith the sensitivity of quantitative method for estimation of different quality embryos is in 5÷10 times higher, if compared with traditional one (qualitative).