

Перспективы применения митохондриально адресованных агентов для гипотермического хранения изолированных органов

Д.В. ЧЕРКАШИНА, И.А. СОСИМЧИК, О.А. СЕМЕНЧЕНКО, А.Ю. СОМОВ, А.Ю. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Prospects of Mitochondria Targeted Agent Application for Hypothermic Storage of Isolated Organs

D.V. CHERKASHINA, I.A. SOSIMCHIK, O.A. SEMENCHENKO, A.YU. SOMOV, A.YU. PETRENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

На сегодня остается актуальной проблема долгосрочного хранения изолированных органов без потери функциональной активности. Важнейшим фактором обеспечения сохранности органа является состав консервирующего раствора. Несмотря на разнообразие существующих сред для гипотермического хранения (ГХ), ни одна из них не способна предотвратить развитие ишемически-реперфузионных повреждений, ключевым звеном которых являются митохондрии. Мы предположили, что внесение в консервирующий раствор биологически активных веществ, способных селективно влиять на состояние митохондрий, позволит снизить повреждение печени в процессе ГХ и последующей нормотермической реперфузии (НР).

В качестве митохондриально адресованных агентов использовали: разобшители 2,4-динитрофенол и бенциклана фумарата, митохондриально адресованный антиоксидант SkQ₁ и цитозоль фетальных тканей мезенхимально-мезодермального происхождения. Печень крыс хранили в течение 18 или 24 ч в сахарозо-солевом растворе при 0...4°C в присутствии агентов и без них, затем подвергали НР. Разобшители отмывали перед реперфузией 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве контроля использовали свежееизолированную печень. В гомогенатах печени общепринятыми методами исследовали дыхательную активность, содержание АТФ и прооксидантно-антиоксидантное состояние. Функцию печени определяли по скорости потока желчи в процессе НР.

Хранение и НР печени в растворе без агентов приводили к разобщению окислительного фосфорилирования и снижению уровня АТФ в печени, усилению свободнорадикальных процессов и падению активности антиоксидантных ферментов, что сопровождалось угнетением желчеобразования. Присутствие в среде хранения 2,4-динитрофенола улучшало прооксидантно-антиоксидантное состояние и окислительное фосфорилирование в печени на этапе НР, увеличивая содержание АТФ и продукцию желчи. Положительные эффекты для бенциклана фумарата наблюдались только после ГХ, что, вероятно, было связано с невозможностью полного удаления разобшителя перед реперфузией. Присутствие в растворе хранения SkQ₁ или цитозоля фетальных тканей, несмотря на различные механизмы действия, сходным образом влияло на состояние печени как после ГХ, так и НР: нормализовался прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени, улучшалась функция митохондрий, повышался уровень АТФ и восстанавливалась желчеобразующая функция.

Таким образом, возможность селективно регулировать функцию митохондрий путём дополнения консервирующих растворов митохондриально адресованными агентами является перспективным подходом для prolongation сроков безопасного хранения изолированных органов.

Nowadays the problem of long-term storage of isolated organs without functional activity loss remains on top. Composition of preservation solution is the primary factor for providing of organ viability. Despite of variety of existing media for hypothermic storage (HS), none of them is capable to prevent the development of ischemia-reperfusion injuries, key member of which are mitochondria. We supposed that supplementation of preservation solution with biologically active substances, which are able to selectively affect mitochondria state permits to decrease liver damage during HS and following normothermic reperfusion (NR).

As mitochondria targeted agents were used: uncouplers 2,4-dinitrophenol and bencyclane fumarate, mitochondria targeted antioxidant SkQ₁ and cytosol of fetal tissues of mesenchymal-mesodermal origin. Rat livers were stored during 18 or 24 hrs at 0...4°C in sucrose-saline solution in the presence of agents or without them, and then subjected to NR. Uncouplers were removed before reperfusion by 1% solution of bovine serum albumin. Freshly isolated livers were used as the control. In liver homogenates respiratory activity, ATP level and pro-oxidant-antioxidant state were studied by commonly used methods. Liver function was estimated by bile flow rate during NR.

Liver storage and NR in solution without agents led to uncoupling of oxidative phosphorylation and ATP level decrease, enhancement of free radical processes and antioxidant enzyme activity diminution, which was accompanied by depression of bile production. The presence in preservation solution of 2,4-dinitrophenol improves liver pro-oxidant-antioxidant state and oxidative phosphorylation at NR stage, increasing ATP level and bile flow rate. In the case of bencyclane fumarate the positive effects were observed just after HS that probably related to inability of total removal of uncoupler before reperfusion. The presence in storage solution of SkQ₁ or fetal tissue cytosol, despite on different mechanisms of action, similarly affected liver state after HS as well as NR: pro-oxidant-antioxidant balance was normalized, mitochondria function was improved and ATP level increased, bile production was recovered.

Thus, the possibility to selectively regulate mitochondria function by means of supplementation of preservation solutions with mitochondria targeted agents is a prospective approach to prolong terms of isolated organ safe storage.

Изменения клеточных мембран при апоптозе и методы их идентификации

А.П. ДЕМЧЕНКО

Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, Киев

Changes of Cellular Membranes during Apoptosis and Methods of Their Detection

A.P. DEMCHENKO

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Апоптоз является очень сложным клеточным явлением, участвующим в различных физиологических и патологических процессах. Апоптоз – это ключевой фактор, за которым можно вести наблюдение, если живые организмы или их клетки и ткани подвергаются различным стрессам, в том числе вызванным низкими температурами. Важным является мониторинг апоптоза с использованием неинвазивных методов контроля и визуализации. Перспективным подходом в этом направлении является тестирование свойств клеточных мембран, в которых происходят характерные изменения [Демченко, 2012].

Флуоресценция известна как наиболее чувствительный и малодеструктивный метод в клеточных исследованиях. Соответствующие флуоресцентные красители могут встраиваться в мембрану и давать информацию об изменениях текучести, полярности, электростатического потенциала и т.д. [Демченко, Мелу и соавт., 2009]. Идея автора о распознавании этих апоптотических изменений привели к новому методу их идентификации. Молекула исходного красителя 3-гидроксифлавона была модифицирована таким образом, чтобы спонтанно включаться в клеточную мембрану, изменяя спектр флуоресценции [Шинкарь, Клименко и соавт., 2007]. В настоящее время один из этих красителей – F2N12S – лицензирован и распространяется фирмой «Invitrogen» (США). Большими преимуществами этого метода являются как относительно низкая цена реагентов, так и возможность изучения апоптоза с использованием спектроскопии клеточных суспензий, проточной цитометрии и конфокальной или двухфотонной микроскопии. Презентация фосфатидилсерина на внешней оболочке клеточной мембраны влияет на электростатический потенциал и гидратацию, а краситель F2N12S обеспечивает прямую идентификацию этих изменений. Данный подход развивали путем разработки нового зонда на основе нильского красного (NR12S) с аналогичной F2N12S функциональностью с эмиссией в длинноволновой области.

В докладе будет представлен сравнительный анализ новых и традиционных технологий. В связи с небольшим размером молекул зонда его связывание занимает несколько минут. Это позволяет наблюдать за развитием апоптоза на самом раннем этапе. Встраивание зонда происходит с высокой тропностью ко всем типам клеток (живые, апоптотические или мертвые), что позволяет идентифицировать эти клетки по шкале сравнения интенсивности флуоресценции, анализируя только их отличительный ратиометрический сигнал при отсутствии фонового сигнала зонда. Самокалибровка сигнала апоптоза на молекулярном уровне позволяет регистрировать степень и пространственное распределение апоптотических изменений на клеточных плазматических мембранах. Становится возможным изучение генерации и распространения сигнала апоптоза на мембранах отдельных клеток. Сочетая в себе высокое пространственно-временное разрешение, чувствительность и простоту в использовании, эта методика открыта для дальнейшего развития.

Apoptosis is a very complex cellular phenomenon involved in a wide variety of physiological and pathological processes. It is the key factor that can be monitored when the living organisms or their cells and tissues are subjected to different stress conditions, including treatment by low temperatures. The ability to monitor apoptosis using noninvasive sensing and imaging techniques are a great challenge. The promising approach in this direction is testing the properties of cell membranes demonstrating characteristic changes [Demchenko, 2012].

Fluorescence is known as the most sensitive and low destructive method in cellular research. The smart designed fluorescent dyes can incorporate into the membrane and report on its changes in terms of fluidity, polarity, electrostatic potential, etc. [Demchenko, Mely *et al.* 2009]. The author's idea of recognizing these apoptotic changes has resulted in a new method of its detection. The parent 3-hydroxyflavone dye molecule is modified in such a way that it incorporates spontaneously into cell membrane providing the change of fluorescence emission color [Shynkar, Klymchenko *et al.* 2007]. One of these dyes is presently known as F2N12S and it is licensed and distributed by Invitrogen (USA) (Cat. No A35137). The great advantages of this method are both relatively low price of reagents and the ability to study apoptosis by combine using spectroscopy of cell suspensions, flow cytometry and confocal or two-photon microscopy. The phosphatidylserine exposure on the outer leaflet of cell membrane involves electrostatic potential and hydration, and the F2N12S dye allows providing direct probing of these changes. This approach was further extended by developing a new probe based on Nile Red (NR12S) with analogous to F2N12S functionalization but which emits fluorescence strongly shifted to longer wavelengths.

The presentation will provide comparative analysis of new and traditional technologies. Due to small probe molecular size, its binding occupies several minutes only. This allows observing development of apoptosis process from very early steps. Incorporation of probe occurs with high affinity to all types of cells (living, apoptotic or dead), which allows detecting these cells on comparable scale of fluorescence intensity analyzing only their distinguishing ratiometric signal with the absence of background probe signal. Self-calibration of apoptotic signal on molecular scale allows recording the degree and the spatial distribution of the apoptotic changes over the cell plasma membranes. The studying of generation and propagation of apoptotic signal over the membranes of individual cells becomes possible. Combining high spatiotemporal resolution, sensitivity, and ease of use, this methodology is opened for further development.

Влияние криоконсервирования на поведение нервных клеток плодов крыс в условиях культивирования *in vitro*

А.Н. СУКАЧ, О.В. ОЧЕНАШКО, А.С. ЛЕБЕДИНСКИЙ, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Cryopreservation Effect on Behaviour of Neuronal Cells of Rat Fetuses During *In Vitro* Culturing

A.N. SUKACH, O.V. OCHENASHKO, A.S. LEBEDINSKY, A.YU. PETRENKO

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

Исследование влияния низких температур на жизнеспособность изолированных нервных клеток (НК) имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Цель работы – изучение влияния криоконсервирования на поведение изолированных НК плодов крыс в культуре *in vitro*.

Нервные клетки получали из тканей мозга плодов крыс 15–16 суток гестации. Замораживание проводили в концентрациях 20–50 млн клеток/мл под защитой 10% ДМСО в присутствии 10% сыворотки крыс со скоростью 1 град/мин до -80°C , после чего контейнеры помещали в жидкий азот. Размороженные клетки отмывали от ДМСО центрифугированием.

В процессе культивирования деконсервированных НК важным показателем явилось формирование многоклеточных агрегатов, которое зависело как от концентрации посеянных клеток, так и от их жизнеспособности, определенной по трипановому синему. Так, при культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью менее 30% в концентрациях ниже 1 млн/мл формирования агрегатов не происходило, клетки с нейрональной морфологией отсутствовали, монослой не формировался, хотя единичные клетки прикреплялись и распластывались. Увеличение посевной концентрации этих клеток до 2–4 млн/мл характеризовалось образованием мелких агрегатов, клетки которых после прикрепления мигрировали и распластывались. Большинство клеток характеризовалось глиальной морфологией, однако присутствовали и клетки с морфологией нейронов.

При культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью 40–60% в концентрации 1 млн/мл формировалось значительное количество средних и мелких агрегатов, которые прикреплялись к подложке, после чего их клетки мигрировали и распластывались. При этом значительное количество мигрировавших клеток характеризовалось морфологией нейронов.

При культивировании деконсервированных НК с жизнеспособностью выше 70% агрегаты формировались при посевной концентрации 0,5 млн/мл. При этом в агрегаты объединялись около 70% клеток. После прикрепления от агрегатов мигрировало большое количество клеток с нейрональной морфологией. Также происходило быстрое образование монослоя клеток глии.

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении жизнеспособности дифференцированных НК плодов крыс после их криоконсервирования. При этом клетки глии являются более криоустойчивыми по сравнению с нейронами. Для восстановления повреждений и эффективного функционирования нейронов необходимо восстановление клеточного микроокружения, подобного интактной ткани, что достигается при образовании многоклеточных агрегатов.

Investigation of low temperature effect on viability of isolated neuronal cells (NCs) has both fundamental and practical value.

The research aim was to study the cryopreservation effect on behaviour of isolated NCs of rat fetuses in culture *in vitro*.

Neuronal cells were obtained from the brain tissues of rat fetuses of 15–16 gestation days. Freezing was performed in a concentration of 20–50 mln cells/ml under protection of 10% DMSO in the presence of 10% rat blood serum with the rate of 1 deg/min down to -80°C , then the containers were placed into liquid nitrogen. Thawed cells were washed out by centrifugation with DMSO.

During culturing frozen-thawed NCs an important index was the formation of multicellular aggregates, which depended both on concentration of plated cells and their viability determined by trypan blue. So during culturing of frozen-thawed NCs with viability less than 30% in concentrations less than 1 mln/ml the formation of aggregates did not occur, the cells with neuronal morphology were absent, monolayer was not formed, although single cells were attached and flattened. The increase of plating concentration of these cells up to 2–4 mln/ml was characterized by the formation of small aggregates, the cells of which migrated and flattened after attachment. Most cells were characterized with glial morphology, but the cells with the morphology of neurons were present.

During culturing of frozen-thawed NCs with viability of 40–60% in 1 mln/ml concentration a significant number of medium and small aggregates attached to the substrate was formed, afterwards their cells migrated and flattened. Most cells were characterized with the morphology of neurons.

When culturing frozen-thawed NCs with more than 70% viability the aggregates were formed at plating concentration of 0.5 mln/ml. Moreover about 70% of cells were joined into aggregates. After attaching the aggregates a great number of cells with neuronal morphology migrated. Also a rapid formation of glial cells monolayer occurred.

The results attest the preservation of viability of differentiated rat fetal NCs after their cryopreservation. Furthermore glial cells are more cryoresistant than neurons. To restore the damages and the effective functioning of neurons the recovery of the similar to intact tissue cell microenvironment is necessary, that is achieved by the formation of multi-cellular aggregates.

Исследование трансмембранных потенциалов и митохондриальной активности нервных клеток Mpf после их криоконсервации

Г.И. Морозова¹, О.А. Лопатина², Е.Л. Фирсова², Р.Я. Подчерняева²

¹Российский университет дружбы народов, г. Москва

²ФГБУ «НИИ вирусологии им Д. Ивановского» Минздравсоцразвития России, г. Москва

Study of Transmembrane Potentials and Mitochondrial Activity of Mpf Nerve Cells After Their Cryopreservation

G.I. MOROZOVA¹, O.A. LOPATINA², E.L. FIRSOVA², R.YA. PODCHERNYAEVA²

¹Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

²D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology of the Ministry of Health Care and Social Development, Moscow, Russia

После криоконсервации и в процессе восстановления физиологических условий в клетках могут возникать повреждения различного характера и разной степени выраженности, причинами которых могут быть изменения метаболических процессов, повышение проницаемости мембран, изменение энергетического состояния клетки. Эффективность деконсервации определяется способностью восстановления исходных свойств клеток. Оценка жизнеспособности клеточных культур, в том числе по состоянию мембран митохондрий, является одной из сложных задач.

В данной работе продемонстрированы возможности флуоресцентного зонда-катиона ДСМ для оценки состояния трансмембранных потенциалов (ТМП) и митохондриальной активности (МА) в нервных клетках мозга хорька (Mpf) в процессе размораживания. С целью выбора контрольных клеток в адекватном физиологическом (энергетическом) состоянии клетки исследовали через различные интервалы времени после их размораживания (3–24 ч). Культуры клеток Mpf окрашивали добавлением физиологического раствора с ДСМ к суспензии клеток до оптимальной концентрации 2,5 мкМ ДСМ и инкубировали с зондом при температуре 20 или 37°C в течение 40 или 20 мин соответственно. Препараты живых клеток (на стеклах) исследовали на микрофлуориметре ЛЮАМ И-2 (ЛОМО). Величины уровня ТМП в каждой клетке монослоя оценивали по цвету и интенсивности флуоресценции зонда ДСМ в митохондриях [Добрецов Г.Е., 1985]. Установлено, что интенсивность флуоресценции ДСМ в митохондриях клеток Mpf зависит от времени их культивирования в течение суток после размораживания: в течение 1–3 ч от начала культивирования клеток сохраняется низкий уровень ТМП. Наиболее высокий уровень ТМП, сопряженный, прежде всего, с энергизацией митохондрий, наблюдается только через 12 ч и достигает максимума через 24 ч, при этом энергетический потенциал клетки сохраняется в течение 3–4 пассажей после деконсервации. Эта динамика ТМП в клетках может отражать изменения свойств разных мембран, а именно их вязкости и (или) ионной проницаемости на фоне температурного скачка в среде после размораживания.

After cryopreservation and during the restoration of physiological conditions in cells there can be damages of various character and different degree of manifestation which likely caused by the changes in metabolic processes, increase of permeability of membranes, change of cell energetic conditions. Efficiency of freeze-thawing is determined by ability to recover initial properties of cells. The assessment of viability of cell cultures, including the state of mitochondria membranes is one of difficult tasks.

In this work the possibilities of fluorescent probe cation DSM for an assessment of the state of transmembrane potentials (TMPs) and mitochondrial activity (MA) in brain nerve cells of a ferret (Mpf) during thawing are shown. To select the control cells with an adequate physiological (energetic) state the cells were investigated in different time intervals after their thawing (3–24 hrs). Mpf cell cultures were stained by adding physiological solution with DSM probe to cell suspension up to optimal concentration of 2.5 mM DSM and incubated with a probe at either 20 or 37°C during 40 or 20 min, respectively. Preparations of living cells (on glass) were investigated with microfluorimeter LUMAM I-2 (LOMO). The values of TMPs level in each cell of a monolayer were estimated by color and intensity of fluorescence of DSM probe in mitochondria [Dobretsov G.E., 1985]. Fluorescence intensity of DSM probe in mitochondria of Mpf cells has been established to depend on time of their culturing within 24 hrs after thawing: within 1–3 hrs from the beginning of cell culturing a low TMPs level is kept. The highest level of TMPs which is first of all related to mitochondrial energization, is achieved only in 12 hrs and reaches the maximum in 24 hrs, thus the energy potential of a cell is maintained during 3–4 passages after freeze-thawing. This TMPs dynamics in cells can reflect the changes in properties of different membranes, namely: their viscosity and (or) ionic permeability on the background of temperature leap in the medium after thawing.

Оценка мембранного потенциала митохондрий в изолированных гепатоцитах после гипотермического хранения

А.Ю. Сомов¹, А.Ю. Петренко¹, А.С. Лебединский¹, В.С. Холодный¹,
О.В. Кукло¹, Ю.В. Малюкин², И.А. Боровой²

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

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

Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential in Isolated Hepatocytes after Hypothermic Storage

A.YU. SOMOV¹, A.YU. PETRENKO¹, A.S. LEBEDINSKY¹, V.S. KHOLODNYI¹,
O.V. KUKLO¹, YU.V. MALYUKIN², I.A. BOROVY²

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

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

Регистрация изменений потенциала митохондрий с помощью флуоресцентных зондов является быстрым и удобным методом неинвазивного контроля состояния органелл в составе клеток. Рассеивание мембранного потенциала митохондрий – ранний признак нарушения энергетической функции митохондрий при воздействии низких температур.

В данной работе была проведена оценка мембранного потенциала митохондрий гепатоцитов после гипотермического хранения (ГХ) с помощью флуоресцентных зондов JC-1 и родамина 123.

В экспериментах использовали изолированные гепатоциты крыс, которые хранили 24 ч в сахарозо-содержащей среде, разработанной в ИПКиК НАН Украины. Насыщение клеток красителями проводили в ходе нормотермической инкубации. Интенсивность флуоресценции клеток определяли после 1 и 24 ч с помощью конфокального микроскопа «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Германия) и планшетного флуоресцентного анализатора «Tecan GENios» (Австрия). Изучали также влияние митохондриальных агентов: разобщителя дыхания и окислительного фосфорилирования, ингибитора дыхательной цепи и АТФ-синтазы на интенсивность флуоресценции клеток при ГХ.

Выполненная работа позволила определить оптимальные условия насыщения клеток флуоресцентными красителями, провести сравнительный анализ значений потенциала митохондрий, полученных с помощью JC-1 и родамина 123. Показано, что JC-1 является наиболее информативным флуорохромом. В результате воздействия протонифора, ингибиторов дыхательной цепи на мембранный потенциал митохондрий наблюдалось изменение эмиссии JC-1, в то время как родамин 123 не позволял выявить смещения мембранного потенциала.

Применение флуоресцентных красителей, специфических к митохондриям, является перспективным направлением не только для изучения мембранного потенциала митохондрий, но и для усовершенствования уже имеющихся экспресс-методов контроля метаболического состояния клеток при гипотермии.

Recording of mitochondrial potential changes with fluorescent probe is a quick and convenient method for non-invasive control of organelles' state as components of cells. Scattering of mitochondrial membrane potential is an early sign of mitochondria energetic function disorder during low temperature exposure.

Evaluation of mitochondrial membrane potential of hepatocytes after hypothermic storage (HS) with fluorescent probes JC-1 and rhodamine 123 has been performed in this work.

Isolated rat hepatocytes, stored for 24 hrs in sucrose-containing medium developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, were used in the experiments.

Cells were saturated with dyes during normothermic incubation. Cell fluorescence intensity was determined after 1 and 24 hrs with confocal microscope Carl Zeiss LSM 510 META (Germany) and plate fluorescence analyzer Tecan GENios (Austria). We studied the effect of mitochondrial agents: decouplers of respiration and oxidative phosphorylation, inhibitor of respiratory chain and ATP synthase on the intensity of cell fluorescence during HS.

The performed research allowed determining the optimal conditions of cell saturation with fluorescent dyes and performing a comparative analysis of mitochondrial potential indices obtained with JC-1 and rhodamine 123. It has been shown that JC-1 is the most informative fluorochrome. Under exposure of protonophore inhibitors of respiratory chain on mitochondrial membrane potential the change of JC-1 emission was observed while rhodamine 123 did not allow revealing the shift of membrane potential.

Application of fluorescent dyes specific to mitochondria is a prospective trend for studying mitochondrial membrane potential and improvement of already existing express-methods for control of cell metabolic state during hypothermia.

Оценка защитного эффекта тиолсодержащих соединений на митохондриальную функцию гепатоцитов крыс в условиях криоконсервирования

М.Ю. МАЛЮКИНА, Н.С. КАВОК, И.А. БОРОВОЙ, Е.А. АВЕРЧЕНКО

Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, г. Харьков

Evaluation of Thiol-Containing Compound Protective Effect on Mitochondrial Function of Rat Hepatocytes During Cryopreservation

M.YU. MALYUKINA, N.S. KAVOK, I.A. BOROVY, E.A. AVERCHENKO

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

В литературе имеются сведения, что окислительный стресс, переживаемый клетками в процессе их выделения, может впоследствии проявляться в повышении их чувствительности к повреждающим воздействиям и, как следствие, к снижению жизнеспособности, в том числе при криоконсервировании. В настоящем исследовании оценивали защитный эффект тиолсодержащих соединений на митохондриальную функцию гепатоцитов и ее восстановление после криоконсервирования. В качестве критерия, свидетельствующего о состоянии митохондриальной функции изолированных гепатоцитов, использовали показатель $\Delta\Psi_m$ и его изменения в процессе краткосрочной гормональной стимуляции клеток фенилэфрином.

Моделирование окислительного стресса с помощью органического (50 мкМ терт-бутилгидропероксида (tert-BHP)) и неорганического (500 мкМ H_2O_2) пероксида позволило оценить степень влияния прооксидантов на $\Delta\Psi_m$, а также способность тиоловых антиоксидантов (2–10 мМ N-ацетилцистеина и 2 мМ GSH) препятствовать повреждающим эффектам прооксидантных соединений. Было установлено, что в условиях развития окислительного стресса наиболее эффективным протектором является GSH. Предынкубация клеток с GSH течение 1 часа перед внесением прооксидантов отменяет падение $\Delta\Psi_m$, вызванное их действием. При этом GSH не влияет на $\Delta\Psi_m$ в гепатоцитах и значения интенсивности флуоресценции J-агрегатов не отличаются от контрольных. В то же время предынкубация клеток с GSH увеличивает амплитуду ответа $\Delta\Psi_m$ на краткосрочное воздействие 10^{-5} М фенилэфрина ((307 ± 51)% от контроля), а также повышает выживаемость гепатоцитов по сравнению с контролем после криоконсервирования. Однако чувствительность митохондрий после криоконсервирования к стимулирующему действию фенилэфрина под влиянием антиоксидантного соединения не восстанавливалась. Таким образом, для полного восстановления митохондриальной функции наряду с обеспечением клеток антиоксидантами, по-видимому, необходимо использовать дополнительные соединения с протекторными свойствами на этапе, предшествующем криоконсервированию, и подбор соответствующего состава криоконсервирующих сред.

There are the data, demonstrating the oxidative stress, survived by cells during their isolation, as capable to be later manifested in increasing their sensitivity to damaging effects and as a result in a decreased viability, including during cryopreservation as well. In this research a protective effect of thiol-containing compounds on mitochondrial function of hepatocytes and its recovery after cryopreservation was assessed. The index of $\Delta\Psi_m$ and its changes during short-term hormonal stimulation of cells by phenylephrine was used as the criterion, testifying to mitochondrial function state in isolated hepatocytes.

Oxidative stress modeling with organic (50 μ M tert-BHP) and inorganic (500 μ M H_2O_2) peroxide enabled to estimate the prooxidant effect extent on $\Delta\Psi_m$, as well as the capability of thiol antioxidants (10 mM 2-N-acetylcysteine and 2 mM GSH) to prevent the damaging effects of prooxidant compounds. Under oxidative stress development the GSH was established to be the most efficient protectant. Cell preincubation with GSH for 1 hr before introducing prooxidants cancels the $\Delta\Psi_m$ fall, caused by their action. In this case GSH does not affect $\Delta\Psi_m$ in hepatocytes and the values of fluorescence intensity of J-aggregates do not differ from the control ones. At the same time the cell pre-incubation with GSH increases the $\Delta\Psi_m$ response amplitude to a short-term effect of 10^{-5} M phenylephrine ((307 ± 51)% of control), as well as enhances the hepatocyte survival compared to the control after cryopreservation. However, the mitochondrial sensitivity after cryopreservation to phenylephrine stimulating effect under the influence of antioxidant compound was not reduced. Thus, for a complete recovery of mitochondrial function together with providing cells with antioxidants, it is apparently necessary to use the additional compounds with protective properties at the stage, preceding the cryopreservation, and select the appropriate composition for cryopreserving media.

Количественный учет гетерогенности эмбрионов коровы для оценки эффективности способа их криоконсервирования и трансплантации

Л.В. ГОРБУНОВ¹, Н.Д. БЕЗУГЛЫЙ²

¹Институт животноводства НААН, г. Харьков

²Украинская академия аграрных наук, г. Киев

Quantitative Consideration of Bovine Embryos Heterogeneity to Evaluate Efficiency of Method for Their Cryopreservation and Transplantation

L.V. GORBUNOV¹, N.D. BEZUGLY²

¹Institute of Animal Science of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov, Ukraine

²Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kiev, Ukraine

Отсутствие метода количественного учета гетерогенности эмбрионов животных при оценке эффективности используемых способов их криоконсервирования и трансплантации является причиной низкой воспроизводимости и несопоставимости полученных результатов.

Исследовали эмбрионы коровы разного качества, находившиеся на стадии развития от ранней морулы до экспандированной бластоцисты. Все манипуляции с биообъектами – получение, поиск, вымывание и подготовка к экспериментам – проводили по общепринятым методикам [Манк М., 1990]. Эмбрионы замораживали в разработанном устройстве [Осташко Ф.И., Безуглый Н.Д., 1991]. В качестве криопротектора применяли раствор 1,2 М глицерина, 10 мин выдерживали в них эмбрионы при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Для выведения криопротектора после размораживания контейнеров использовали раствор сахарозы концентрацией 0,75 М.

В соответствии с предложенной математической моделью вероятность получения теленка от нативного эмбриона V_p зависит от его начального состояния V_0 и эффективности трансплантации W_p ($V_p = V_0 W_p$), а деконсервированного V_{dp} – также от эффективности криоконсервирования W_d ($V_{dp} = V_0 W_p W_d$). Показатели V_p и V_{dp} получали как отношение количества прижившихся эмбрионов к их начальному количеству. Эффективность криоконсервирования составила $W_d = V_{dp}/V_p$, а трансплантации – $W_p = V_p/V_0$. Начальную жизнеспособность V_0 определяли аналитически [Горбунов Л.В., Гордиенко Е.А. 2011] и по результатам краткосрочного культивирования $V_k \approx V_0$.

Для проверки предложенной математической модели проанализированы данные [Кот В.С., Горбунов Л.В., 2001]. Приживляемость нативных (деконсервированных) эмбрионов удовлетворительного $21,6 \pm 5,9\%$ $n = 245$ ($19,1 \pm 6,2\%$ $n = 85$) и отличного качества $53,2 \pm 3,2\%$ $n = 324$ ($51,2 \pm 3,4\%$ $n = 300$) отличается приблизительно на 32%. Регрессионные зависимости показателей состояния нативных и деконсервированных эмбрионов коров от их качества составили: для жизнеспособности $V_0(i) = -0,05i^2 + 0,33i + 0,41$ и $V_d(i) = -0,136i^2 + 0,785i - 0,225$; приживляемости $V(i) = -0,028i^2 + 0,27i - 0,026$ и $V_{dp}(i) = -0,027i^2 + 0,268i - 0,05$. Коэффициент аппроксимации $R^2 = 0,999$, где $i = 1$ для эмбрионов удовлетворительного качества, $i = 2$ хорошего и $i = 3$ отличного. Для обеспечения сопоставимости результатов эффективности W_p и W_d вычисления производили при условии $i = 3$. Обобщенные показатели составили: для эффективностей криоконсервирования $96,2 \pm 4,2$ и трансплантации $54,8 \pm 5,7\%$, начальной жизнеспособности эмбрионов коровы $97,1 \pm 1,0\%$. Расхождения значений, полученные опытным и расчетным способом, для эмбрионов разного качества составляют приблизительно 5%.

The absence of method for quantitative consideration of animal embryo heterogeneity during evaluation of the efficiency of the applied methods of their cryopreservation and transplantation is the cause of low reproductibility and comparability of the obtained results.

We investigated bovine embryos of different quality at the development stage from early morula to expanded blastocyst. All manipulations with bioobjects such as obtaining, search, washing and preparation to the experiments were carried-out by standard methods [Mank M., 1990]. The embryos were frozen with the developed device [Ostashko F.I., Bezugly N.D., 1991]. As a cryoprotectant we used 1.2 M solution of glycerol, kept the embryos for 10 min in it at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. To remove the cryoprotectant after thawing of containers we used sucrose solution with 0.75 M concentration.

According to the proposed mathematical model of the probability to obtain a calf from a native embryo V depends on its initial state V_0 and efficacy of transplantation W_p ($V = V_0 W_p$), and frozen-thawed V_{dp} does on the efficiency of cryopreservation W_d ($V_{dp} = V_0 W_p W_d$). The indices V_p and V_{dp} were obtained as the ratio of survived embryos to their initial number. The efficacy of cryopreservation has made $W_d = V_{dp}/V_p$, and transplantation has been $W_p = V_p/V_0$. Initial viability V_0 was determined analytically [Gorbunov L.V., Gordienko E.A. 2011] and by the results of short-term culturing $V_k \approx V_0$.

When testing the proposed mathematical model the data [Kot V.S., Gorbunov L.V., 2001] have been analyzed. Grafting of native (frozen-thawed) embryos of satisfactory $21.6 \pm 5.9\%$ $n = 245$ ($19.1 \pm 6.2\%$ $n = 85$) and excellent quality $53.2 \pm 3.2\%$ $n = 324$ ($51.2 \pm 3.4\%$ $n = 300$) differs by about 32%. Regression dependences of indices of native and frozen-thawed bovine embryos' state on their quality were: for viability $V_0(i) = -0.05i^2 + 0.33i + 0.41$ and $V_d(i) = -0.136i^2 + 0.785i - 0.225$; for grafting $V(i) = -0.028i^2 + 0.27i - 0.026$ and $V_{dp}(i) = -0.027i^2 + 0.268i - 0.05$. Approximation coefficient $R^2 = 0.999$ where $i = 1$ is for the embryos of poor quality, $i = 2$ is for good one and $i = 3$ is for excellent one. To ensure the comparability of the results of W_p and W_d efficiency the calculations were done when $i = 3$. The summarized indices made: for efficiency of cryopreservation 96.2 ± 4.2 and transplantation $54.8 \pm 5.7\%$, the initial viability of bovine embryos $97.1 \pm 1.0\%$. Differences in the values obtained experimentally and those calculated for embryos of different quality are about 5%.

Сравнительная характеристика витрифицированных бластоцист разных сроков развития

М.П. ПЕТРУШКО^{1,2}, В.И. ПИНЯЕВ^{1,2}, Н.Н. ЧУБ¹, С.С. ПРАВДИНА²

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

²ВРТ-клиника репродуктивной медицины, г. Харьков

Comparative Characteristics of Vitrified Blastocysts of Different Development Stages

M.P. PETRUSHKO^{1,2}, V.I. PINYAEV^{1,2}, N.N. CHUB¹, S.S. PRAVDINA²

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

²ART-Clinic for Reproductive Medicine, Kharkov, Ukraine

Витрификация – эффективный метод криоконсервирования эмбрионов, имеющий преимущества по сравнению с медленным замораживанием: не требуется специального оборудования, методика занимает мало времени и демонстрирует хорошие показатели имплантации эмбрионов.

Пути совершенствования метода связаны прежде всего с оптимизацией состава криопротекторов, их концентраций и временем пребывания в них эмбрионов, разработкой методов увеличения скорости падения температуры при погружении эмбрионов в жидкий азот.

Немаловажным аспектом является правильный выбор стадии развития эмбриона для витрификации.

Цель данной работы – изучение выживаемости морул, ранних бластоцист и экспандированных бластоцист человека в программах лечения бесплодия вспомогательными репродуктивными технологиями.

В общей сложности было витрифицировано 63 эмбриона.

Общая выживаемость составила 50/63 (79,4%), из них частота выживаемости морул, ранних и экспандированных бластоцист – 85, 86 и 65% соответственно.

Различия выживаемости бластоцист разных стадий развития подчеркивают важность выполнения селекции эмбрионов перед криоконсервированием для выбора эмбриона с наилучшим потенциалом.

Длительное культивирование бластоцист снижает их успешную витрификацию, очевидно, из-за иных физиологических потребностей. Наличие бластоцеля негативно влияет на выживаемость экспандированных бластоцист, что требует проведения их коллапсирования перед витрификацией.

Vitrification is an effective method of cryopreserving the embryos, having the advantages over slow freezing: no special equipment is required, the method takes a little time and provides good results for embryo implantation.

The ways to improve the method are primarily related to the optimization of cryoprotectants, their concentrations and duration of embryos' incubation, the development of methods to increase the rate of temperature fall by immersing the embryos into liquid nitrogen.

An important aspect is the choice of embryo development stage for vitrification.

The research aim was to study the survival of human morulae, early blastocysts and expanded blastocysts in the programs of treating infertility with assisted reproductive techniques.

Totally 63 embryos were vitrified.

Overall survival was 50/63 (79.4%), in particular the survival rates of morulae, early blastocysts and expanded ones were 85, 86 and 65%, respectively.

Differences in blastocyst survival at various stages of development emphasize the importance of implementing the choice of embryos prior to cryopreservation to select the embryo with the highest potential.

Long-term culturing of blastocysts reduces the success of vitrification, apparently because of other physiological needs. Blastocoel presence affects negatively the survival of expanded blastocysts, which requires their collapsing prior to vitrification.

Влияние различных этапов криоконсервирования методом витрификации на морфофункциональные и электрические параметры ранних эмбрионов мыши

Е.И. СМОЛЯНИНОВА¹, О.А. СТРИХА¹, В.А. ШИГИМАГА², Е.Г. ЛИСИНА², Л.И. ПОПИВНЕНКО¹

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

²Институт животноводства НААН Украины, Харьковская область

Effect of Different Cryopreservation Stages Involved Vitrification on Morphofunctional and Electrical Parameters of Early Mice Embryos

E.I. SMOLYANINOVA¹, O.A. STRIKHA¹, V.A. SHIGIMAGA², E.G. LISINA², L.I. POPIVNIENKO¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

²Institute of Animal Science of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kharkov region, Ukraine

Криоконсервирование ранних эмбрионов млекопитающих методом витрификации является в настоящее время одним из самых распространенных методов, применяемых в современных вспомогательных репродуктивных технологиях. Оптимизация режимных параметров существующих протоколов тесно связана с исследованиями по влиянию сред криоконсервирования на жизнеспособность и морфофункциональные свойства эмбрионов. При этом важную роль играет как композиционный состав криозащитных сред, так и выбор исследуемых клеточных параметров.

Целью настоящей работы было исследование влияния протокола криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на морфофункциональную сохранность и электрическую проводимость 2-клеточных эмбрионов мыши. Криоконсервирование осуществляли по методу Исаченко В.В. и др. (1994 г.) с модификацией некоторых параметров [Смолянинова Е.И. и др., 2007]. Морфофункциональную сохранность эмбрионов оценивали визуально и после культивирования *in vitro* в среде М2 в CO₂-инкубаторе. Электрическую проводимость эмбрионов определяли методом импульсной кондуктометрии в процессе экспозиции эмбрионов в растворе 0,3 М сахарозы. Показано, что основным этапом, влияющим на морфофункциональную сохранность 2-клеточных эмбрионов мыши, является длительность экспозиции эмбрионов в среде замораживания. При увеличении времени экспозиции в среде замораживания от 1,5 до 3 мин существенно уменьшило количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты *in vitro* (89,7 ± 4,0 и 75,5 ± 6,3% соответственно). Значения электрической проводимости как контрольных, так и криоконсервированных эмбрионов мыши составили ((1,54 ± 0,11)–(6,12 ± 0,34)) × 10⁻³ См/м. Однако экспозиция в течение 3 мин в среде замораживания и последующее замораживание-оттаивание приводили к необратимому электрическому пробое плазматических мембран эмбрионов, что свидетельствует о нарушениях мембранного аппарата в результате сдвига ионного гомеостаза клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что электрические параметры клеток тесно связаны с их функциональным состоянием и отражают изменения в клеточном метаболизме как в норме, так и под воздействием внешних факторов, в том числе и криоконсервирования.

Cryopreservation of mammalian early embryos by vitrification is currently one of the most common methods used in modern assisted reproductive technologies. Optimization of operating parameters of the existing protocols is closely associated with the research of cryopreservation media effect on viability and morphofunctional properties of the embryos. Moreover a compositional content of cryoprotective media and the choice of the studied cell parameters play an important role.

The research aim was to investigate the effect of cryopreservation protocol involving vitrification in ethylene glycol-sucrose medium on morphofunctional integrity and electrical conductivity of mice two-cell embryos. Cryopreservation was performed by the method of Isachenko V.V. *et al.* (1994) with the modification of certain parameters [Smolyaninova E.I. *et al.*, 2007]. Morphofunctional integrity of embryos was visually evaluated also after culturing *in vitro* in medium M2 in CO₂ incubator. Electrical conductivity of the embryos was determined by pulse conductometry during exposure on embryos in 0.3 M sucrose solution. It has been shown that the main stage affecting morphofunctional integrity of mice two-cell embryos is the duration of exposure on embryos in freezing medium. The increase of exposure time in freezing medium from 1.5 up to 3 min significantly reduced the number of embryos approaching the stage of blastocyst *in vitro* (89.7 ± 4.0 and 75.5 ± 6.3%, respectively). The values of electrical conductivity of the control as well as cryopreserved mice embryos were ((1.54 ± 0.11)–(6.12 ± 0.34)) × 10⁻³ S/m. But 3 min long exposure in the freezing medium and the following freeze-thawing resulted in a non-reversible breakdown of embryo plasma membranes that indicated the presence of damages in the membrane apparatus due to disorder of the cell ionic homeostasis. The obtained results testify to the fact that the cell electrical parameters are closely associated with their functional state and reflect the changes in cellular metabolism in the norm and under the influence of external factors including cryopreservation.

Апоптоз кумулюсных клеток при экстракорпоральном созревании девитрифицированных ооцитов коров

Т.И. КУЗЬМИНА, Н.О. НОВИКОВА, Д.А.НОВИЧКОВА

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург – Пушкин

Apoptosis in Cumulus Cells at In Vitro Maturation of Devitrified Bovine Oocytes

T.I. KUZMINA, N.O. NOVIKOVA, D.A. NOVICHKOVA

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals of Russian Academy of Agricultural Sciences, St.-Petersburg – Pushkin, Russia

Криорезистентность женских гамет – актуальная проблема интенсификации внедрения достижений клеточных репродуктивных технологий в медицину, животноводство, сохранения генофонда млекопитающих. Множество факторов детерминирует криотолерантность донорских ооцитов, в том числе характер ооцит-кумулясных взаимодействий при культивировании девитрифицированных ооцитов. Цель настоящего исследования – сравнительный анализ морфологии и статуса хроматина клеток кумулюса нативных и девитрифицированных ооцитов коров.

Выделение ооцит-кумулясных комплексов, их морфологическую оценку, культивирование проводили в соответствии с методами, описанными нами ранее [Kuzmina *et al.*, 2007]. Апоптоз в кумулюсе ооцитов определяли методом TUNEL [Alm *et al.*, 2000]. Статус хроматина ооцитов оценивали по методу Тарковского [Tarkowski A.K., 1966]. Для витрификации ооциты обрабатывали поэтапно тремя растворами (1 – 0,7 М ДМСО и 0,9 М этиленгликоля (ЭГ); 2 – 1,4 М ДМСО и 1,8 М ЭГ; 3 – 2,8 М ДМСО, 3,6 М ЭГ и 0,65 М трегалозы), приготовленными на среде 199 («Sigma», США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma»), помещали в соломины и затем в жидкий азот.

О зрелости ооцита свидетельствуют визуальные признаки изменения морфологии кумулюса, в том числе степень экспансии кумулюсных клеток. После 24 часов культивирования доля девитрифицированных ооцитов с низкой степенью экспансии клеток кумулюса составила 40%, что оказалось значительно выше, чем в группе нативных ооцитов (11%, $P < 0,001$). Показано, что уровень апоптозов в кумулюсе нативных и девитрифицированных ооцитов возрастал после культивирования (26 и 43%; 38 и 51%, соответственно), 41% девитрифицированных достигли стадии метафазы-II. Выявлены критические периоды прохождения мейоза в девитрифицированных ооцитах при культивировании *in vitro* (метафаза-I – анафаза). Кумулюсные клетки 52% девитрифицированных ооцитов сохраняли способность к экспансии при последующем экстракорпоральном культивировании.

Таким образом, анализ статуса хроматина кумулюса девитрифицированных ооцитов (степень экспансии кумулюса, уровень клеток с признаками апоптоза) – перспективный маркер при разработке моделей витрификации и систем дозревания донорских ооцитов животных *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

Cryoresistance of female gametes is an actual problem of intensification of introducing the achievements of cell reproductive technologies in medicine, animal breeding, preservation of mammalian gene pool. A variety of the factors determines a cryotolerance of donor oocytes, including the character of the oocyte-cumulus interactions when culturing devitrified oocytes.

The research aim was to comparatively analyze morphology and chromatin status of cumulus cells of native and devitrified oocytes.

Isolation of oocyte-cumulus complexes, their morphological assessment, culturing were carried-out according to the methods described previously [Kuzmina *et al.*, 2007]. Apoptosis in oocytes' cumulus was determined by TUNEL [Alm *et al.*, 2000]. Chromatin status of oocytes was evaluated by the method of Tarkowski [Tarkowski A.K., 1966]. For vitrification the oocytes were treated stepwise with three solutions (1 – 0.7 M DMSO and 0.9 M ethylene glycol (EG); 2 – 1.4 M DMSO and 1.8 M EG; 3 – 2.8 M DMSO, 3.6 M EG and 0.65 M trehalose), prepared on the base of medium 199 (Sigma, USA) containing 10% fetal bovine serum (Sigma), then placed into straws and plunged into liquid nitrogen.

The maturity of oocytes is confirmed by visual signs of cumulus morphology changes, including the expansion rate of cumulus cells. After 24-hr-long culturing of devitrified oocytes with low expansion rate of cumulus cells was 40%, which was significantly higher than in native oocytes (11%, $P < 0.001$). It has been shown that the apoptoses level in cumulus of native and devitrified oocytes increased after culturing (26 and 43%; 38 and 51%, respectively), 41% of devitrified ones reached metaphase-II. There were identified critical periods of passing meiosis in devitrified oocytes when culturing *in vitro* (metaphase-I – anaphase). Cumulus cells of 52% devitrified oocytes retained the ability to expand during following culturing *in vitro*.

Thus, the analysis of cumulus chromatin status of devitrified oocytes (cumulus expansion rate, the level of cells with apoptosis signs) is a promising marker for the development of vitrification models and systems of donor oocytes maturation of animals *in vitro*.

The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 10-04-00389 ofi-a).

Изучение наноструктуры красных клеток крови при интоксикации. АСМ-исследования

Е.К. КОЗЛОВА, В.В. МОРОЗ, А.М. ЧЕРНЫШ

Научно-исследовательский институт общей реаниматологии (НИИОР)
им. В.А. Неговского, РАМН, г. Москва

Study of Red Blood Cell Nanostructure during Intoxication. AFM Investigation

E.K. KOZLOVA, V.V. MOROZ, A.M. CHERNYSH

V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology (SRIGR)
of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

При интоксикации организма изменяется функциональное состояние клеток крови. Для выработки правильной тактики лечения необходимо знать механизм возникновения патологических нарушений в красных клетках крови.

Цель работы – изучить изменение наноструктуры мембран эритроцитов при интоксикации крови *in vitro* в результате действия фармакологических и химических препаратов высокой концентрации.

Монослои клеток готовили из крови здоровых доноров с помощью устройства «V-Sampler» («Microscopy Vision», Австралия). Все доноры дали добровольное согласие на исследование своей крови в соответствии с нормами этического комитета НИИОР. В микроветы (200 мкл) с кровью и ЭДТА добавляли растворы гемина, фуросемида, хлорпромазина, $ZnSO_4$. Эти вещества оказывают воздействие на белки мембран эритроцитов. Концентрация веществ изменялась в крови *in vitro* от 0,1 до 5 мМ. Изображения клеток, мембран, их фрагментов получали с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ) («NTEGRA Prima», «NT-MDT», РФ) в полуконтактном и контактном режимах. Для получения детального изображения наноструктуры использовали пространственное Фурье преобразование.

С помощью АСМ получены изображения мембран клеток. Проведен количественный анализ параметров наноструктуры до и после воздействия. Экспериментально установлено, что при действии указанных препаратов возникали специфические структуры на поверхности мембран красных клеток крови. В зависимости от концентрации препаратов их диаметр варьировался от 70 до 1000 нм, а высота от 10 до 100 нм. Форма возникающих упорядоченных структур специфична для каждого препарата. Действие гемина приводило к возникновению доменов с зернистой структурой, хлорпромазина – щелевидных структур, фуросемида – кольцевых образований, ионов цинка – сетевых структур. В опытах проводили коррекцию наноструктуры с помощью альбумина и перфторуглеродной эмульсии.

Интоксикация крови *in vitro* существенно влияет на наноструктуру мембран эритроцитов. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с нарушением собственных параметров мембраны (flickering, спектриновый матрикс, белковые кластеры). Изучение наноструктуры важно для установления механизма влияния физических и химических факторов на мембраны клеток крови.

Functional state of blood cells changes during organism intoxication. To develop a proper therapeutic approach we should know the mechanism of appearing pathological disorders in red blood cells.

The research aim was to study the changes of erythrocyte membrane nanostructure during blood intoxication *in vitro* under effect of pharmacological and chemical preparations of high concentration.

Cell monolayers were prepared from blood of healthy donors with V-Sampler (Microscopy Vision, Australia). All the donors consented for investigation of their blood according to the Guidelines of SRIGR Ethics Committee. Microvettes (200 μ l) with blood and EDTA were supplemented with solutions of hemin, furosemide, chlorpromazine, $ZnSO_4$. These substances affect the erythrocyte protein membranes. Concentration of substances was changed in blood *in vitro* from 0.1 up to 5 mM. Images of cells, membranes, their fragments were obtained with atomic force microscopy (AFM) (NTEGRA Prima, NT-MDT, Russia) in semi-contact and contact regimens. To obtain a detailed representation of nanostructure we used space Fourier transform.

The images of cell membranes were obtained with AFM. Quantitative analysis of nanostructure parameters prior to and after exposure has been performed. We experimentally proved that specific structures appeared on a membrane surface of red blood cells during effect of mentioned preparations. Depending on concentration of preparations their diameter varied from 70 up to 1,000 nm, and the height did from 10 up to 100 nm. The shape of appearing ordered structures was specific for each preparation. Hemin effect induced the appearance of domains with granular structure, chlorpromazine did with fissured structures, for furosemide it was ring formations, zinc ions were with net structures. During experiments we corrected nanostructure with albumin and perfluoridecarbon emulsion.

Blood intoxication *in vitro* significantly affects the erythrocyte membrane nanostructure. The observed changes may be associated with disorder of own membrane parameters (flickering, spectrin matrix, protein clusters). Study of nanostructure is important to reveal the mechanism of physico-chemical factors effect on blood cell membranes.

Биологические свойства криоконсервированных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах

И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, О.М. БАБИНЕЦ, В.Ф. МАРЦЕНЮК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Biological Properties of Cryopreserved Probiotics Immobilized on Enterosorbents

I.P. VYSEKANTSEV, O.M. BABINETS, V.F. MARTSENYUK

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

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

В настоящее время активно проводят исследования по разработке пробиотических препаратов IV поколения – микроорганизмов-пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах и в виде биопленки на твердых носителях. Такие исследования позволят получить поликомпонентные препараты-синбиотики, обладающие суммарным терапевтическим эффектом, в основе которого лежат биологические свойства микроорганизмов-пробиотиков и физико-химические свойства носителей.

В ИПКиК НАН Украины проводятся исследования по созданию препаратов микроорганизмов-пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах. В экспериментах, проведенных с пробиотиками *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus*, установлено, что наибольшей сорбционной активностью в отношении микробных клеток обладают углеродсодержащие энтеросорбенты. По иммобилизационным свойствам в наших экспериментах были выбраны коммерческие препараты «Сорбекс» и «СУМС-1».

Изучена сохранность комплексов «носитель-клетки» после криоконсервирования. Выявлено, что они в процессе криоконсервирования повреждаются больше, чем свободные клетки, суспендированные в жидких средах. Максимальную сохранность этих комплексов обеспечивало охлаждение со скоростью 1 град/мин до -40°C с последующим погружением в жидкий азот. После охлаждения с более высокими скоростями сохранность комплексов достоверно уменьшалась.

Иммобилизация на сорбентах и криоконсервирование не изменяли видовую чувствительность микроорганизмов к желчи, антифунгальным и антибактериальным препаратам. Сохранялись также спектры сахаролитической активности и антагонистические свойства по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

В экспериментах по коррекции химиотерапевтического дисбиоза у лабораторных крыс и иммуносупрессированных мышей установлено, что при введении комплексов иммобилизованных пробиотиков более быстро восстанавливается микробиоценоз толстой кишки, происходит эрадикация патогенной кишечной микрофлоры, которая транслоцировалась после иммуносупрессии во внутренние органы мышей. Достоверно увеличивались сроки персистенции в кишечнике транзитного пробиотика *S. boulardii* и в более ранние сроки происходила колонизация пристеночного слоя кишки бактериями *B. bifidum*, *L. bulgaricus*. Криоконсервирование не влияло на указанные биологические свойства иммобилизованных микроорганизмов.

Nowadays researches for development of probiotic preparations of the 4th generation as microorganisms-probiotics immobilized on sorbents and as biofilms on solid carriers have been actively performed. These studies will allow to obtain multicomponent preparations-synbiotics, having a total therapeutic effect, which is based on biological properties of probiotic microorganisms and physico-chemical properties of the carriers.

At the IPC&C of the NAS of Ukraine there are performed the researches for development of microorganisms-probiotics preparations immobilized on enterosorbents. In the experiments carried-out with the probiotics *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus* there was found that carbon-containing enterosorbents had the highest sorption activity as for bacterial cells. In our experiments there were selected commercial preparations Sorbeks and SUMS-1 possessing immobilization properties.

The survival of complexes 'carrier-cells' after cryopreservation was studied. It was revealed that during cryopreservation they were damaged more than free cells suspended in liquid media. Maximum integrity of these complexes provided cooling with the rate of 1 deg/min down to -40°C with the following plunging into liquid nitrogen. After cooling with higher rates the integrity of the complexes was significantly decreased.

Immobilization on sorbents and cryopreservation did not change the sensitivity of microorganisms to bile, antifungal and antibacterial preparations. As well the spectra of saccharolytic activity and antagonistic properties in relation to pathogenic and opportunistic pathogenic microorganisms were preserved.

In the experiments for correction of chemotherapeutic dysbiosis in laboratory rats and immunosuppressed mice it was found that the introduction of complexes of immobilized probiotics contributed to more rapid recovery of colonic microbiosis. There was eradication of pathogenic intestinal microflora, translocated after immunosuppression into murine internal organs. Persistence terms of transient probiotic *S. boulardii* were significantly increased in intestine and in earlier periods the colonization of the boundary layer in intestinal bacteria *B. bifidum*, *L. bulgaricus* occurred. Cryopreservation did not affect these biological properties of the immobilized microorganisms.

Применение метилцеллюлозы для криоконсервирования перевиваемых клеток в бессывороточной среде

С.В. КОШИЙ, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, В.Ф. МАРЦЕНЮК, Т.М. ГУРИНА, Л.В. СОКОЛ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Use of Methylcellulose for Cryopreservation of Inoculated Cells in Serum-Free Medium

S.V. KOSHCHYI, A.N. GOLTSEV, I.P. VYSEKANTSEV, V.F. MARTSENYUK, T.M. GURINA, L.V. SOKOL
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Сыворотка крови является обязательным компонентом консервирующих сред, предназначенных для криоконсервирования перевиваемых клеток эукариот. Однако в ряде случаев возникает потребность в получении перевиваемых клеток, криоконсервированных в бессывороточных средах. Высказано предположение, что сыворотку крови в среде криоконсервирования можно заменить метилцеллюлозой (МЦ).

Полимер интересен тем, что, с одной стороны, он применяется в виде биологически нейтрального геля как матрикс для культивирования клеток, с другой – в концентрации 0,1% входит в состав культуральных бессывороточных сред и стимулирует пролиферацию клеток.

Целью работы было изучение защитного эффекта МЦ, вводимой в среду консервирования вместо сыворотки крови, при криоконсервировании перевиваемых клеточных культур. Исследования проводили с тремя культурами перевиваемых клеток: мышинными фибробластами линии L929, эпителиальными клетками почки эмбриона свиньи сублиний СПЭВ-5 и СПЭВ-0,5. Фибробласты L929 и эпителиальные клетки СПЭВ-5 культивировали в среде 199 с добавлением 10 и 5% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота соответственно. Эпителиальные клетки СПЭВ-0,5 были адаптированы к росту в среде 199 с добавлением 0,5% ЭС и 0,1% МЦ. Клетки замораживали в среде 199, содержащей 0,1–1,5% МЦ, с добавлением 5% ДМСО и без него. Образцы охлаждали со скоростью 1 град/мин до –40°C и погружали в жидкий азот. Сохранность клеток оценивали по их окрашиванию 0,4% раствором трипанового синего и способности к адгезии к культуральному стеклу.

Установлено, что среда консервирования, содержащая МЦ и ДМСО, обеспечивает высокие показатели количества сохранных клеток. Максимальную сохранность отмечали в образцах с клетками сублинии СПЭВ-0,5. После замораживания в среде 199 с добавлением МЦ, но без ДМСО, клетки всех трех культур погибли.

Blood serum is a mandatory component of cryopreservation media aimed to cryopreservation of inoculated cells of eukaryotes. However, in some cases there is a necessity to obtain the inoculated cells cryopreserved in serum-free media. It is suggested that serum in the cryopreservation medium can be replaced with methylcellulose (MC).

This polymer is interesting because, on the one hand, it is used as a biologically neutral gel as a matrix for cell culturing, on another hand it is the component of the cultural and serum-free media in 0.1% concentration and stimulates a cell proliferation.

The research aim was to study the protective effect of MC introduced in the cryopreservation medium instead of serum during cryopreservation of inoculated cell cultures. The investigations were performed with 3 cultures of inoculated cells: murine fibroblasts of line L929, epithelial cells of the pig fetal kidney of sublines SPEV-5 and SPEV-0,5. L929 fibroblasts and SPEV-5 epithelial cells were cultured in medium 199 supplemented with 10 and 5% fetal bovine serum (FBS), respectively. SPEV-0,5 epithelial cells were adapted to the growth in medium 199 supplemented with 0.5% FBS and 0.1% MC. The cells were frozen in medium 199 containing 0.1–1.5% MC and in the presence or without 5% DMSO. The samples were cooled with the rate of 1 deg/min down to –40°C and plunged into liquid nitrogen. Cell survival was evaluated by staining with 0.4% trypan blue solution and the ability for adhesion to the culture glass.

We have established that the cryopreservation medium containing MC and DMSO provides high indices of survived cells. Maximal survival was observed in the samples with the cells of SPEV-0.5 subline. After freezing in medium 199 supplemented with MC, but without DMSO the cells of all three cultures died.