

ДОДАТОК

Тези

6-го з'їзду Українського товариства клітинної біології

Секція

Біологія стовбурових та спеціалізованих клітин і тканин

18-21 червня 2019 р.
м. Яремче, Україна

SUPPLEMENT

Conference Abstracts

6thUkrainian Congress for Cell Biology

Session

Biology of stem cells and specialized cells and tissues

June 18-21, 2019
Yaremche, Ukraine

Leaning points around biocompatibility of peritoneal dialysis solutions measured as in vitro proliferation of HepG2 and Vero cells

Hudz N.¹, Lagutina O.²¹Department of Drug Technology and Biopharmaceutics, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine²Institute for Occupational Health of National Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: nataligudz03021972@gmail.com

Issues of biocompatibility studies of solutions for peritoneal dialysis (PD) is very important from a point of view of saving peritoneum functions and finding factors influencing biocompatibility.

METHODS. The following research methods were used: analytical methods for determination of pH, glucose degradation products (GDPs) contents and cell viability using neutral red (NR), MTT and sulforhodamin B (SRB).

RESULTS. Assessing all the laboratory-made PD solutions with the HepG2 and Vero cells, there were non-significant (weak) predicted positive relationships (0.35 and 0.32) between viability and pH in the MTT-test (the more was pH, the higher was viability) and negative unpredicted relationships in the NR- (-0.88 and -0.50) and SRB-test (-0.72 and -0.38), respectively. There were non-significant unpredicted relationships (-0.12 and -0.20) between viability and GDPs concentration in the MTT-test and a strong and middle positive (the more was concentration, the higher was viability) unpredicted relationships in the NR- (0.96 and 0.50) and a middle and weak unpredicted relationships (0.66 and 0.18) in the SRB-test, respectively, with the HepG2 and Vero line. There were positive unpredicted relationships between viability of the HepG2 and Vero line and glucose concentration: 0.12 and 0.20 in the MTT-test, 0.37 and 0.14 in the NR-test and 0.37 in the two SRB-tests, respectively.

The study results established influence of numerous factors on the bioavailability of PD solutions: type of cells, test of the viability determination, pH, etc. However, only MTT-test gives a non-significant but predicted relationship between increasing both cell types viability and increasing solutions pH.

CONCLUSION. Our study has several important learning points around biocompatibility. The first is that cytotoxicity is related as much to pH and other unknown mechanisms as it is to GDPs and glucose. The second point is that GDPs or glucose did not exert an exceptionally strong effect upon PD solutions cytotoxicity.

Acknowledgement: co-author Nataliia Hudz is grateful to the International Visegrad Fund (contract No. 51700107) for providing scholarship for studies related to solutions for dialysis therapy.

Nrf2 and Keap1: a quintessential duet moonlights in endothelium



Grochot-Przeczek A.¹, Kopacz A., Kloska D.¹, Cysewski D.², Personnic N.¹, Piechota-Polanczyk A.¹, Dulak J.¹, Jozkowicz A.¹

¹Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

²Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland

e-mail: alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

Oxidative stress and premature senescence is conducive to aging and cardiovascular diseases. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) – transcription factor, the master orchestrator of adoptive response to cellular stress, has been implicated in regulation of premature senescence in fibroblasts, neural and mesenchymal stromal cells by transactivation of antioxidant gene expression. However, a molecular switch between normal, senescent and apoptotic fate remains unknown.

Recently we have shown that growth/differentiation factor 15 (GDF-15) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)-induced angiogenesis strongly depends on the presence of Nrf2 protein in endothelial cells (EC) but does not rely on its transcriptional activity. Instead, Nrf2 serves as a protein tethering Keap1 (Kelch Like ECH Associated Protein 1), its known transcriptional repressor, to allow podosome assembly and angiogenesis. We have also demonstrated that human primary ECs devoid of Nrf2, and murine Nrf2 transcriptional knockout (tKO) aortas are senescent. Surprisingly, they do not encounter oxidative stress and damage, and senescence is not a primary cause of the decrease in their angiogenic potential.

We were looking to elucidate the mechanism of Nrf2-related premature senescence of vascular system, to understand why Nrf2 deregulation does not cause oxidative stress in ECs, and to indicate a molecular switch determining EC fate. We evidenced that ECs deficient in Nrf2 protein, or with limited Nrf2 activity in shear stress conditions, exhibit excessive S-nitrosylation of proteins. It is also a characteristic feature of Nrf2 tKO murine aortas, as determined by biotin switch assay *in situ*. Mass spectrometry analysis reveals that NADPH oxidase 4 (NOX4) is S-nitrosylated exclusively in ECs devoid of Nrf2. We suppose that a functional role of S-nitrosylation is protection of ECs from death by inhibition of NOX4-mediated oxidative damage. As a result, the Nrf2-deficient ECs preserve oxidative balance but are redirected to premature senescence. The same phenotype is seen in Nrf2 tKO aortas. These effects are mediated by Keap1 repressor, a direct binding partner of Nrf2, remaining in cytoplasm unrestrained by Nrf2. S-nitrosylation, followed by senescence, can also be triggered in smooth muscle cells by EC-derived paracrine induction of iNOS.

Tu sum up, disturbed Nrf2 signaling in endothelial cells leads to the Keap1-dependent S-nitrosylation of NOX4, what hampers oxidative detriment and may provide defense in the adjacent aortic cells. Overabundance of unrestrained Keap1 in the cytoplasm determines the fate of endothelial cells.

Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool to cure cognitive impairment caused by neuroinflammation or alpha-7-nicotinic acetylcholine receptor deficiency



Skok M. V.

Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: skok@biochem.kiev.ua

Mesenchymal stem cells (MSCs) are self-renewing multipotent cells able to differentiate into multiple cell types including neurons. In addition, MSCs produce numerous trophic and growth factors affecting neurogenesis, synaptogenesis and cell survival. The efficiency of regenerative MSC therapy has been proved in many experimental models. Neuroinflammation caused by injections of bacterial lipopolysaccharide (LPS) results in memory impairment in mice accompanied by elevated amounts of amyloid beta peptide A β (1-42) and decreased levels of α 7 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the brain. Immunization of mice with α 7 nAChR extracellular domain (1-208) also results in inflammatory effect and memory impairment. Finally, mice lacking α 7 nAChRs (α 7^{-/-}) possess a pro-inflammatory phenotype and demonstrate impaired episodic memory. Taken together, these data illustrate a key role of α 7 nAChRs in neuroinflammation and memory. Our experiments were undertaken to find out if MSCs can prevent and cure the pathogenic symptoms caused by either inflammation or α 7 nAChR deficiency. We used MSCs isolated from either human umbilical cord (hMSCs) or mouse placenta (mMSCs) and the conditioned medium obtained after 2 days of MSCs culturing in serum-free medium. MSCs injected intravenously penetrated the brain of LPS-pre-treated mice and prevented episodic memory impairment, mitochondria damage, A β (1-42) accumulation and nAChR decrease in the brain caused by LPS. Moreover, MSCs could reverse the pathogenic symptoms developed 3 weeks after LPS injection. MSCs also penetrated the brains of α 7^{-/-} mice and transiently improved their episodic memory. Similar, although weaker and shorter, effects were observed after intraperitoneal injections of MSCs conditioned medium suggesting that memory improvement was caused by soluble factors produced by MSCs. Cultured MSCs produced IL-6 in response to LPS and stimulated an IL-6 increase in the brain, which coincided with the improvement of episodic memory. Injections of recombinant IL-6 also improved episodic memory of α 7^{-/-} mice accompanied by the up-regulation of α 3, α 4, β 2 and β 4 nAChR subunits in the brain. In whole, the data obtained indicate that MSCs, injected intravenously, are able to cross the blood-brain of mice loosened by inflammation and persist there for at least two weeks. They improve episodic memory of mice and make their mitochondria more resistant to apoptogenic influence. One of the soluble factors responsible for the memory improvement is IL-6.

Intravenously injected mesenchymal stem cells penetrate the brain and treat inflammation-induced brain damage and memory impairment in mice

Lykhmus O. Y.¹, Koval L. M.¹, Voytenko L. P.¹, Uspenska K. R.¹, Deryabina O. G.², Shuvalova N. I.², Kordium V. A.^{2,3}, Ustyomenko A. M.², Kyryk V. M.², Skok M. V.¹

¹Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

e-mail: olenalykhmus@gmail.com

The use of mesenchymal stem cells (MSC), which can differentiate into multiple cell types, including neurons, is an attractive idea of regenerative medicine, in particular, for neurodegenerative disorders like Alzheimer disease (AD). Neuroinflammation is regarded as one of the pathogenic factors of AD. Previously we showed that mice regularly injected with bacterial lipopolysaccharide (LPS) possessed the AD-like symptoms like episodic memory decline, elevated amounts of amyloid beta peptide A β (1-42) and decreased levels of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the brain. In the present study, we aimed to investigate whether pathogenic effect of LPS on the brain and behavior of mice can be prevented or treated by injection of MSCs or MSC-produced soluble factors. Fluorescently-labelled MSCs, injected intravenously, penetrated the brain of LPS-treated mice. MSCs co-injected with LPS prevented episodic memory impairment, A β (1-42) accumulation and nAChR decrease in the brain and brain mitochondria caused by LPS. Their mitochondria did not release increased amounts of cytochrome c under the effect of Ca²⁺ as did mitochondria of LPS-only-treated mice. Moreover, MSCs could reverse the pathogenic symptoms developed 3 weeks after LPS injection. Cultured MSCs produced IL-6 in response to LPS and MSCs effect *in vivo* was accompanied by additional stimulation of both micro- and macroglia. Xenogeneic (human) MSCs were almost as efficient as allogeneic (mouse) ones and regular injections of human MSC-conditioned medium appeared to be almost as efficient as injection of MSCs themselves. These data allow suggesting MSCs as a potential therapeutic tool to cure neuroinflammation-related cognitive pathology.

Overexpression of direct bone morphogenetic protein/Smad target gene inhibitory κ B α upon BMP7 treatment is insufficient to prevent and treat rheumatoid arthritis

Korchynskiy O.^{1,2,3,4}, Luyten F. P.⁵, Lories R.⁵, ten Dijke P.⁴

¹Institute of Cell Biology, Lviv, Ukraine

²Medical Faculty, Rzeszów University, Poland

³Thurston Arthritis Research Centre, University of North Carolina at Chapel Hill, NC, U.S.A.

⁴Department Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

⁵Skeletal Biology & Engineering Research Centre, KU Leuven, Belgium

e-mail: olexkor@hotmail.com

Loss of articular cartilage in the joints associated with bone erosions is a common problem in patients with chronic inflammatory arthritis. Several reports suggest a role for bone morphogenetic protein 7 (BMP7) in preventing joint damage and in promoting regeneration in part by mitigating the catabolic effects of tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 β (IL-1 β). The precise molecular mechanism mediating the preventive and regenerative effects of BMP7 is unknown. Our transcriptional profiling studies revealed that the activation of BMP signaling leads to increased expression of *Inhibitory* κ B α (I κ B α), which is a key negative regulator of a major proinflammatory NF- κ B pathway. We therefore explored whether anti-catabolic effects of BMPs based on BMP-induced I κ B α expression in cartilage and bone could be used to prevent joint damage in an animal model of inflammatory arthritis.

METHODS. cDNA microarrays-based gene expression profiling was used to discover novel BMP target genes. Positive hits were confirmed using Northern and Western blotting and Real-Time PCR. Luciferase reporter assays and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay were used to characterize the BMP-responsive region in I κ B α promoter. Anti-catabolic effects of BMPs and their effect on osteoblast differentiation were validated by genetic shRNAs-mediated depleting studies using pre-osteoblastic cell lines and primary human mesenchymal stem cells (hMSC). To interrogate the *in vivo* relevance of our findings we used a model of experimentally-induced arthritis in DBA/1 mice upon inoculation of BMP7-expressing adenovirus into a knee. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Research (KU Leuven, Belgium; P198/2012).

RESULTS. Real-Time PCR showed that activation of I κ B α mRNA by BMPs does not require *de novo* protein synthesis, thus suggesting I κ B α is a direct BMP target gene. Using ChIP assays, we demonstrated BMP intracellular effectors, i.e. Smad1/5 and Smad4, bound to the highly conserved proximal region of I κ B α promoter. A proximal fragment of I κ B α promoter was found to be activated by BMP2 and BMP7. EMSA assay showed that BMP7-induced I κ B α expression blocks formation of TNF α -induced NF- κ B transcriptional complex. In addition, BMP treatment was found to inhibit TNF α and LPS-induced NF- κ B transcriptional response in mouse preosteoblasts and hMSC and rescued the osteogenic \blacktriangleright

differentiation of MSC from proinflammatory inhibition. shRNA-mediated knockdown of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ expression confirmed an essential role of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in mediating of anti-catabolic effects of BMPs. However, anti-catabolic effects of BMPs *in vivo* appeared to be insufficient for effective prevention and treatment of experimental arthritis in DBA/1 mice.

CONCLUSION. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ is a direct BMP/Smad target gene and its expression could have a potential to be a basis for preventive and BMP7 regenerative effects on degrading cartilage and bone. Unfortunately, our *in vivo* studies showed effects of BMP7 as insufficient to affect cartilage and bone regeneration in inflamed joints.

Banking of pooled human olfactory epithelium-derived mesenchymal stem cells for applying in cell therapy



Antonevich N. G.¹, Hancharou A. Y.¹, Rynda A. G.², Babrukevich D. V.²

¹The Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

e-mail: antonevich.n@gmail.com

Olfactory epithelium (OE) contains tissue-specific mesenchymal stem cells (MSCs), which possess broad differentiation potential and immunomodulatory activities comparable to well-studied bone marrow and adipose tissue derived MSCs. The advantage of OE as a source of MSCs for cell therapy is that biopsy can be taken from people of any age and gender under local anesthesia without any adverse consequences. Nevertheless, cell cultures vary in their therapeutic potential depending on the donor's individual health status. It has been shown that bone marrow MSCs obtained from donors with severe systemic diseases, for example, with lupus erythematosus, have aberrant profile of gene expression and reduced ability to suppress immune cells and therefore cannot be used in autologous transplantations. Obviously, in such cases transplantation of allogenic cells from healthy person is more preferable. The recent tendency in cell therapy is to produce biomedical cellular product based on pooled cultures in order to standardize cell material and avoid considerable variations in its properties. The aim of the current study was to choose the OE-MSCs with the highest immunosuppressive activity, produce pooled culture and bank them for long-term storage.

METHODS. Olfactory mucosa samples were taken from 15 patients with non-inflammatory diseases of nasal cavity. OE-MSCs were expanded using DMEM/F12 media supplemented with 10 % FBS and cryopreserved at passage 2 (P2). Cells recovered from cryopreservation were used to obtain pooled cultures OE-MSCs, OE-MSCs from three individual donors were pooled in equal proportion (1:1:1) after individual culturing at P3 and expanded as pooled cultures to P4–P5. OE-MSCs were assayed for phenotype (CD71, CD90, CD105, CD45, CD31), population doubling time (PDT). All cultures were routinely tested for microbiological contaminants (aerobic and anaerobic bacteria, fungi, herpesviruses HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-6). At P4–P5 proliferative potential and immunosuppressive activity of pooled OE-MSCs were analyzed in comparing with monocultures. Immunosuppressive activity of MSCs were measured as follow: peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from donor's blood were primed with CFSE, co-cultured with OE-MSCs (1:20) for 3 days with PHA additions, and then CD3⁺ cells were assayed. Nonparametric statistical analysis was used.

RESULTS. As was shown, all obtained OE-MSCs were CD73⁺CD90⁺CD105⁺CD31⁺CD45⁻, PDT was 32,7 (28,2–36,2) h at P3. The ability of mono OE-MSCs to inhibit mitogen-induced proliferation of CD3⁺ T cells was shown, suppression was 1.55 (1.33–1.75) times comparing to control. The MSCs cultures which inhibited T-cell proliferation more than 1.5 times (n = 6) were chosen to prepare pooled cultures (n = 4, different combination). There was not revealed significant difference in both PDT and suppression activity in relation to PHA-induced proliferation of CD3⁺ T cells between mono (n = 6) and pooled cultures (n = 4). Tested pooled culture were banked for long-term storage (5•10⁷ cells/each culture, P4).

CONCLUSION. OE-MSCs with high proliferative and immunosuppressive potential were chosen for producing of pooled OE-MSCs, pooled cell biomass was cryopreserved for prospective applying. Pooled OE-MSCs possesses immunosuppressive properties and may possibly be used in cellular immunotherapy of immune system disorders, which include autoimmune diseases, and prevention of organ and tissue rejection.

Compensatory-adaptive potential of cardiocytes under conditions of experimental cholesterol loading the animal models



Piskun R. P., Shevchuk T. I., Shkarupa V. M., Hrynchak N. M.

Pyrohov Memorial Vinnytsia National Medical University, Vinnytsya, Ukraine

e-mail: piskyn2006@gmail.com

Human cardiocytes demonstrate very low self-healing ability; they almost do not divide, therefore, restoration of a heart muscle and replacement of defected areas in patients with myocardial infarction occurs mainly with the participation of stromal cells. However, according to recent studies, it has been established that muscle cells of the myocardium are capable of proliferation, yet they cannot completely restore the damaged areas. Since cardiocytes are highly specialized cells, organs adapt to damage due to their regenerative hypertrophy by enlargement of certain organelles at ultrastructural level, namely, in mitochondria and myofibrils. In this case, organelles become hypertrophic, and cells increase in size. When rabbit models are loaded with cholesterol, pathological changes occur first in the coronary vessels in the form of narrowing their lumen,

thickening the wall, the formation of atherosclerotic plaques, which lead to the phenomena of ischemia and hypoxia, and, as a consequence, the myocardial damage is developed. In this case, we can observe changes related to all stages of the adaptive syndrome: the beginning (tension), the development of adaptive reactions characterized by remodeling of basic cardiac structures, and the completion of the process. Once compensatory and adaptive potential of the myocardium exhausts, the compensation process ends with decompensation. The objective of our work was to identify the compensatory and adaptive potential of cardiocytes under conditions of experimental dyslipoproteinemia, which was modeled by oral administration of cholesterol in animal test models. For study purposes, hearts were sampled, histological, micromorphometric and electron microscopic studies were performed.

The studies of the cardiac muscle presented with almost 3 times decrease in parenchyma-stromal ratio, indicating growing of interstitial connective tissue, that is, an increase in the number and size of collagen fibers. The cross-section area and the diameter of heart muscle cells declined by 12.04 %, while their nuclei decreased by 14.06 %. The nuclear-cytoplasmic ratio increased by almost 4 %. The observed cell damage was associated with the phenomena of destruction, necrobiosis, and dissection of muscle fibers caused by accumulation of serous fluid, and the phenomenon of cariolysis. The proportion of damaged cardiocytes increased by 7.76 times against the norm. Structural heterogeneity of cardiocytes significantly strengthened against an increase in the number of atrophic and hypertrophic cells – by 2.82 and 5.17 times, accordingly, and against almost twice decrease in the proportion of normal cells compared to animals from the intact group.

At the ultrastructural level, pathological changes were mainly associated with myofibrils and mitochondria of cardiocytes. Thus, we observed an enlightenment of cytoplasmic matrix, an enlargement of the perinuclear space, an accumulation of the lipid drops in the cytoplasm, and a decrease in the content of ribosomes. Myofibrils were laminated, with the foci of lysis and rupture. The mitochondrial matrix was clear, with a disturbance of crista density and their destruction observed.

Therefore, one of the manifestations of adaptive reaction of cardiocytes to ischemia and hypoxia in cholesterol loading model is their structural remodeling presented as an increase in the proportion of hypertrophied cells with activation of the protein synthesis system associated with an increase in the number and size of mitochondria and myofibrils, while the presence of foci of necrobiosis, destruction, and lysis of cardiocytes and their organelles indicates the phenomena of decompensation.

Cardiomyopathy in rats with Walker 256 carcinosarcoma: generation of reactive oxygen species induces damage of cardiomyocytes



Hudenko N. V.^{*}, Sarnatskaya V. V., Paziuk L. M.¹, Yusko L. O., Maslenny V. N., Nikolaev V. G.

Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

¹*Department of Cytology, Histology and Developmental Biology, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology & Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine*

e-mail: hudenkonatalia@gmail.com

Malignant tumors exert systemic influence on an organism and therefore could cause the development of paraneoplastic syndrome, which could be represented by complex changes of structure and functions of some organs, anemia and endogenous intoxication. The latter could be significantly affected by oxidative stress via activation of free radicals and imbalanced rate of generation of compounds with anti- or pro-oxidant properties. In the majority of cells defense enzymes of antioxidant system (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) reduce to minimum the damaging action of these factors, but the pool of endogenous antioxidants of cardiomyocytes is very limited and couldn't provide adequate reaction to induced oxidative stress what finally leads to degeneration and descent of cardiac muscle contractility. In this study, we have analyzed the myocardium damage caused by enhanced production of reactive oxygen species (ROS) due to the W256 progression at the background of gradual weakening of antioxidant defense of the body. The studies were performed on female Wistar rats with an average weight of 185.0 ± 13.8 g and the age of 2.5 months. After W256 transplantation, rats were distributed in 6 groups (5 rats per group) corresponding to the day after W256 transplantation, when they have been examined (1st day, 2nd day, 3rd day, 5th day, 7th day, 9th day). As intact control, healthy animals were used, the age, gender and weight of which fully corresponded to the experimental rats at the start of the study ($n = 5$). We detected the two-fold increase of ROS generation in blood plasma of experimental animals starting from the second day after W256 transplantation. At the same time, a gradual decrease of catalase activity, the index of body's antioxidant defense, was also noted – from 10.0 mmol/mL/min on the 1st day up to 7.3, 6.1 and 4.3 mmol/ml/min on the 3rd, 5th and 9th days, respectively. Dynamics of changes in morphological structure of myocardium in rats showed that on the 1st day after W256 transplantation it was equal to the control group of intact animals. At the 3rd and 5th days after transplantation the syncytial structure of the myocardium is preserved, places of dystrophic changes are detected, while the amount of fibrous connective tissue of stroma increases with the development of full-blooded vessels. On the 5th day after transplantation, the flattening and reducing of the nuclei of cardiomyocytes were noted, and the majority of nucleus had sharpened contours. Also, there was observed violation of microcirculation in a form of a sludge phenomenon and permeation of muscle fibers with erythrocytes. At the 7th and 9th days, the syncytial structure was broken and the areas of myocytolysis were detected. Polymorphism and anionic nucleosis of cardiomyocytes were intensified. We noted the presence of small vacuoles, which were diffusely located in the sarcoplasm of cardiomyocytes. Conclusion: W256 progression induce the myocardial disorganization and degenerative changes in cardiomyocytes since the 3rd day of tumor transplantation.

Reaction of rat's hepatocytes after the influence of methionine



Yanko R. V., Chaka O. G., Levashov M. I.
Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: biolag@ukr.net

Literary data on the effect of methionine on the functional activity and morphological changes in hepatocytes are rare and ambiguous, despite the fact that its role in the body is well-studied. It may be due to use in experiments the animals of different species and age, differences in the dosage of methionine, the duration of experiments, etc. Most of the available studies are devoted to studying the effect of methionine deficiency in food on the synthetic activity of the liver parenchyma. A question is unexplored as activity of hepatocytes will change after additional introduction of methionine to the standard diet. The purpose of our work is to investigate the effect of sulfuric amino acid methionine on morpho-functional changes in hepatocytes in adult rats.

The study was conducted on 24 Wistar male rats, aged 15 months. The animals, both the control and the experimental group, were in compatible terms with a standard diet. Rats of the experimental group in addition to the standard diet received methionine every day perorally during a 21 day in a dose of 250 mg/kg of body weight. Such dose of methionine may be considered prophylactic, because it does not lead to a substantial increase of methionine content in organism and the emergence of homocysteinemia. Histological preparations from the liver tissue were prepared according to the standard method. Morphometry of the liver was carried out on digital images using the computer program "Image J". The activity of succinate dehydrogenase in the suspension of hepatocyte mitochondria was determined by the Krivchenkova method. The concentration of the protein in the hepatocyte mitochondria was determined by the Lowry method.

The cross-sectional area of hepatocytes and their cytoplasm had a slight tendency to decline after completion of the methionine introduction to the experimental animals. The area of the nucleus, on the contrary, increased by 18 %. It led to an increase in the nucleus-cytoplasmic ratio by 27 % ($p < 0.05$) compared to the control values. The increase of this index indicates an increase of the cell functional activity, and may indicate the preparation of the cell to mitosis. The nucleolus of hepatocytes in the experimental animals are well visualized, mostly of medium size, with a rounded shape and clear borders. It was noted an increase the number of nucleolus in hepatocyte nucleus at 28 % ($p < 0.05$) and a nucleolus-nucleus ratio of 9 % compared to control. The nucleolus hyperplasia may indicate the activation of hepatocytes physiological regeneration at the intracellular level and the increase of their protein synthetic activity. The number of binuclear hepatocytes in the liver of experimental animals increased significantly by 16 % compared with control. Most authors believe that an increase the number of binuclear hepatocytes indicates an increase the intensity of the liver parenchyma regeneration at the intracellular level.

The activity of succinate dehydrogenase in the suspension of hepatocytes mitochondria tended to increase after methionine introduction. The concentration of protein in the suspension of hepatocyte mitochondria in the experimental rats was significantly higher by 73 % than in the control. It may indicate on the increase of protein-synthetic function of mitochondria cells.

Thus, according to the most of the obtained indicators, we can conclude that 21-day introduction of methionine increases the functional and regenerative activity of hepatocytes.

Morphological and functional alterations in carcinosarcoma Walker-256 cells over the course of resistant phenotype formation



Lozovska Yu. V.¹, Lukianova N. Yu.¹, Andrusishina I. M.², Naleskina L. A.¹, Todor I. N.¹, Kunska L. N.¹, Chekhun V. F.¹
¹Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
²Kundiev Institute of Occupational Health, NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: Lozovskaya.2012@ukr.net

Currently, the approaches to the results of fundamental research that can be used for the individualized treatment of cancer patients, especially resistant forms of breast cancer, are revised. The studies of the mechanisms underlying the morphological and functional alterations in tumor cells (TC) accompanying the formation of drug resistance are of high priority.

AIM. To determine the specific features of TC architectonics, cell cycle and content of the essential elements in sensitive and doxorubicin resistant Walker-256 carcinosarcoma.

MATERIALS AND METHODS. Sensitive and doxorubicin resistant Walker-256 carcinosarcoma strains were used in the study. Cytoarchitectonics of TC was studied in histological specimens with the aid of Primo Star microscope (*Carl Zeiss*, Germany). Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry (Beckman Coulter Epics XL). The content of essential elements (Fe, Cu, Zn, Mg and Ca) in tumor tissue (TT) was determined by atomic emission spectrometry on the Optima 2100 DV device (*Perkin-Elmer*, USA).

RESULTS. Doxorubicin-sensitive tumors were characterized by a rather compact arrangement of rounded cells with slightly pronounced signs of polymorphism in the form of large cells and alveolar structures separated by thin fibrous layers of connective tissue. The nuclei were characterized by a homogeneous nucleoplasm with a small amount of chromatin granules with increased number of aneuploid cells. The resistant TC were characterized by a more pronounced polymorphism, a denser arrangement, a slightly larger area and an intense coloration of nuclei, with increased cell ploidy. The morphological features were in line with the patterns of cell cycle distribution. In sensitive TC, percentage of cells in the G2/M phase was higher than in resistant TC (25.51 ± 0.18 % vs. 10.14 ± 0.45 %) percentage of cells in the Go/G1 phase was respectively lower

■ (42.64 ± 1.24 % vs. 72.21 ± 0.19 %). Such changes in the patterns of DNA status were accompanied by the redistribution of the content of the essential elements involved in cell cycle regulation. The corresponding values were in sensitive TC: Fe – 25.18 ± 4.79 µg/g, Cu – 1.56 ± 0.33 µg/g, Zn – 10.98 ± 1.83 µg/g, Ca – 131.16 ± 19.34 µg/g, Mg – 349.62 ± 34.64 µg/g; Ca/Mg – 0.37 ± 0.08, Cu/Zn – 0.14 ± 0.03, and in resistant TC: Fe – 34.51 ± 5.23 µg/g, Cu – 1.98 ± 0.21 µg/g, Zn – 9.17 ± 1.75 µg/g, Ca – 60.09 ± 16.21 µg/g, Mg – 181.41 ± 9.73 µg/g; Ca/Mg – 0.61 ± 0.04, Cu/Zn – 0.18 ± 0.01.

CONCLUSIONS. The morphological and functional characteristics of tumor cells have been shown to change over the course of resistant phenotype formation. We suggest that the new biological behavior of the resistant cells seems to be connected with reprogramming of their essential homeostasis.

The work was carried out with the support of the Research Program of the Scientific Research Program of the National Academy of Sciences of Ukraine “Molecular Biological Factors of the Heterogeneity of the Malignant Cells and the Variability of the Clinical Course of Hormone Dependent Tumors” (2.2.5.411, 0117U002034).

Arginase activity and expression in blood cells in different kinds of leukemia



Gogol S., Zaletok S., Yanish Yu., Sklyarenko L.

Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: tantattoo72@gmail.com

Arginase (L-arginine amidinohydrolase, E.C.3.5.3.1) catalyses L-arginine hydrolysis into L-ornithine and urea. It was discovered in the mammalian liver as the end enzyme of urea cycle. Arginase activity (AA) was found also in other tissues not having complete urea cycle. Some researchers have found AA in malignant tissues to be higher than in normal ones. At the same time, there are only a few of the works dealing with AA in the malignant blood cells of the leukemia patients. Especially, AA in the leukemia cells of the chronic lymphoid leukemia patients was found to be twice lower than in the healthy donor lymphocytes; also was found enhanced AA in the patients with drug-resistant chronic myeloid leukemia.

AIM. To study AA and arginase protein expression (APE) in the peripheral blood lymphocytic fraction of patients with different kinds of leukemia.

OBJECT AND METHODS. AA measurement was done in the peripheral blood lymphocytic fraction of patients with chronic B-cell leukemia (B-CLL, 71 patient); acute myeloid leukemia (AML, 53 patients); acute B-cell lymphoblastic leukemia (B-ALL, 8 patient); non-Hodgkin's lymphomas (NHL, 30 patients) and of 10 donors. APE was investigated in the lymphocytes cellular extracts. AA was measured by the method of Corraliza I. et al., APE – using Western blotting analysis by the Lemmly's method.

RESULTS. Both AA and APE levels was highest in the B-CLL patients. The lowest AA level was found in the blastic cells of the B-ALL patients.

CONCLUSION. AA and APE measurements in the peripheral blood cells may be proposed as supplementary diagnostic criteria for certain types of leukemia.

Connection between cell surface receptor status of CLL B cells and their sensitivity to chemotherapy agents *ex vivo*



Shcherbina V., Gordiienko I., Ivanivskaya T., Shlapatska L.

Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: L_knolodniuk@ukr.net

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is disease with variable clinical outcome. Traditionally patients with CLL are divided into two groups based on disease symptomatic and biological features of malignant B cells. The first group consists of cases that do not require immediate treatment and for these patients strategy “watch and wait” is used. Others are characterized by rapidly progression and typical clinical manifestations. For such cases, immediate application of treatment using polychemotherapy courses is applied. Basic scheme of first-line therapy for patients with aggressive CLL include combination of fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) or bendamustine with rituximab (BR). The choice of treatment strategy is based mainly on age and genetic characteristics of the patient. In recent years medicine is become more personalized and new markers for differentiation, prognosis and the exact selection of the course of therapy are required. In this aspect, attractive candidates are cell surface receptors. The aim of our study was to explore whether sensitivity of CLL B cells to chemotherapy agents depends on expression level of cell surface receptors. The study was performed on peripheral blood mononuclear cells isolated from previously untreated patients with CLL. Flow cytometry was used for immunophenotyping CLL B cells. Metabolic activity of the CLL B cells was determined after 48h of incubation with chemotherapy agents *ex vivo* by Alamar Blue test. For our research we chose several surface receptors which are expressed in CLL: CD5, CD20, CD22, CD37, CD38, CD40, CD150 and CD180. Based on flow cytometry results all CLL samples were divided into groups according to cell surface expression level of each receptor. It was shown that CD38⁺ cases were more sensitive for bendamustine than CD38⁺ and B cells characterized by CD40^{high} expression were more sensitive for cyclophosphamide that cells with middle CD40 expression. Response of CLL B cells to fludarabine alone or in combination with cyclophosphamide were enhanced in CD150⁺CD180⁺ B cells compare to CD150⁺CD180⁻ ones. Besides, sensitivity of CD180⁺ B cells to combine effect of fludarabine with cyclophosphamide was also better than in CD180⁻. For other receptors any differences in sensitivity of CLL B cell to chemotherapy agents between groups was not observed. So, expression levels of CD38, CD40, CD150 and CD180 on B cells could be used as predictive markers for the effectiveness of chemotherapy in choosing a treatment strategy for patients with CLL.

Assessment of efficiency of cryoprotectant mixtures containing various antioxidants



Babijchuk L. O., Makashova O. Ye., Zubov P. M., Zubova O. L.

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

e-mail: Olena.makashova@gmail.com

The use of cord blood (CB) hematopoietic progenitor cells (HPCs) is firmly established in practical medicine as an effective method for treating diseases of various genesis. This has led to the development of protocols of low-temperature storage and the cryobanks network. DMSO at 7.5-10 % concentrations is the most common cryoprotectant for cryopreservation of CB nucleated cells (NCs) including HPCs. However, besides cytoprotective effects, DMSO may also cause the accumulation of reactive oxygen species (ROS) during cell cryopreservation with following initiation of apoptosis and cell death. Accordingly, the promising approaches to the cryopreservation may be supplementation of medium with antioxidants which are able to “trap” free radicals and reduce the intensity of free radical oxidation production at all stages of freezing and thawing. Among these antioxidants glutathione (GSH), N-acetyl-L-cysteine (NAC) and ascorbic acid (AA) can be used.

The purpose of the study was assessment of cell viability and quantification of CB NCs with ROS excess compared to control after their cryopreservation in medium containing DMSO and different antioxidants.

In the work for CB NCs' cryopreservation we used 7.5 % DMSO and different antioxidants (*Sigma-Aldrich*, USA) at their final concentrations as follows: AA – 0.1 mM; NAC – 10 mM; GSH – 1 mM. The viability and the number of cells with ROS excess were determined with flow cytometer FACS Calibur (BD, USA) using 7AAD and DCF fluorescent dyes, respectively.

Analysis of the NCs/HPCs viability showed that after cryopreservation under DMSO protection without antioxidants this index decreased by 30/35 %, respectively. This may be due partly to ROS production, as the level of cells with ROS excess increased by 6-8 % during freezing.

Assessment of viable CB NCs/HPCs after cryopreservation with DMSO and antioxidants showed that the supplementing 7.5 % DMSO solution with 0.1 mmol AA ensured getting of viable NCs/HPCs up to 73/77 %, respectively. When NAC was used at 10 mM concentration this index was up to 69/78 %, while in the sample without the addition of antioxidants were obtained 57/65 % of viable NCs/HPCs, respectively. Determining the amount of viable NCs/HPCs which were cryopreserved in samples with 7.5 % DMSO and 1 mM GSH after thawing showed an increase of this index by 20/21 %.

Quantification of cells with ROS excess indicated that in the group with AA application this index did not differ from the similar group when the antioxidant was not added. In samples cryopreserved with a 7.5 % DMSO supplemented with the antioxidants NAC (10 mM) or GSH (1 mM), this index decreased by 12-13 % compared to data when any antioxidant was not added.

Thus, the results indicated that antioxidants such as NAC and GSH contributed to an increase in their viability and decrease in the level of cells with ROS excess, while AA did not showed antioxidant effect during the NCs cryopreservation. Cryoprotective solutions containing GSH at a concentration of 1 mM and 7.5 % DMSO were the most effective.

Effect of cryoprotective agents and low temperatures on production of reactive oxygen species in human erythrocytes



Zemlianskykh N., Migunova R., Babijchuk L.

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

e-mail: nzemliansky@gmail.com

Cryoprotective agents (CPAs) are able to maintain the structure of protein macromolecules, membranes and cells in a state close to the native one under the stressful conditions. However, the physicochemical properties of the cryoprotectant solutions significantly differ from the physiological characteristics, that induces structural and functional changes in various subcellular systems. One of the possible manifestations of the cryoprotectant influence may be changes in the structure of hemoglobin and the consequent activation of oxidative processes. More significant changes in ROS production may occur after the cell cryopreservation because during the freeze-thawing, despite the presence of cryoprotectants, some cells are still subjected to lethal or sublethal damage.

The study was aimed to examine the CPAs and low temperature effects on the ROS production in human erythrocytes. The estimation of ROS in erythrocytes was performed by flow cytometry with FACS Calibur (*Becton Dickinson*, USA) on the fluorescence data of DCF originated from DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) after its oxidation in cells with hydrogen peroxide. The cryopreserved erythrocytes were under the protection of a mixture of 3.25 M glycerol and 0.2 M mannitol, as well as 0.2 M polyethylene glycol with m.w. 1500 (PEG). Freezing was performed in liquid nitrogen (–196 °C), while heating was carried out at 42–44 °C. The results were analyzed using the software “WinMDI 2.8”. Changes in the intensity of DCF fluorescence in erythrocytes were characterized by the value of the median of the distribution histograms. Statistical processing of the results was performed using the software “Statgraphics plus 2.1 for Win”.

Incubation of human erythrocytes in 2 M glycerol caused a slight increase in DCF fluorescence, while in a glycerol-mannitol medium the intensity of ROS production was lower than in the control samples. Such changes may be stipulated by a slowdown in the intensity of metabolic processes and protein stabilization in the glycerol presence, that affects the possibility of ROS production in cells. In addition, both components of the cryoprotectant mixture have the free radical scavenger properties, which can explain the decrease in ROS level in erythrocytes during incubation, since these substances compete with DCF for interaction with H₂O₂. Freezing of human erythrocytes in the glycerol presence, as well as its removal after thawing, do not affect the intensity of ROS production processes. ▶

❑ Incubating human erythrocytes in PEG presence led to a significant intensification of ROS production, which can reduce cell stability during freeze-thawing. After freezing the intensity of ROS production even more enhanced that attested sublethal cell lesions. However, PEG removal and the concomitant lysis of injured cells led to the normalization of ROS production processes.

Thus, changes in the rate of ROS production in erythrocytes under the CPA effect and freeze-thawing can have a significant regulatory effect on the membrane-cytoskeleton complex state and cell stability under stressful conditions of cryopreservation.

Identification of hematopoietic stem cells in cryopreserved and lyophilized human cord blood leukoconcentrates



Lutsenko O. D., Ostankov M. V., Yampolskaya Ye. Ye., Grisha I. G., Ostankova L. V., Sokil L. V., Goltsev A. M.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
 e-mail: cryopato@gmail.com

At present, the problem of using human cord blood as an alternative to bone marrow and peripheral blood as a source of hematopoietic stem cells (HSCs) attracts the interest of scientists. However, the use of cord blood in a combined treatment of diseases of different etiologies involves the use of cryopreserved or freeze-dried cells. However, the effect of cryopreservation and lyophilization on the state of HSCs subpopulations of varying levels of differentiation has still remained uncertain.

The purpose of this work was to compare the CD34⁺ HSCs content and the subpopulations of these cells with varying degrees of differentiation (CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺) in cryopreserved and lyophilized human cord blood leukoconcentrates (HCBL).

HCBL was obtained by sedimentation of erythrocytes as a result of the dextran-60 supplement to cord blood. HCBL was cryopreserved by a two-stage program using the method of Tsutsayeva A. et al. (1998) with a programmed freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of IPCC of the NAS of Ukraine). The HCBL was frozen-dried according to the method of Goltsev AM (2016) using UZV-2 device (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of IPCC of the NAS of Ukraine). The samples were rehydrated by adding physiological saline to cells. After rehydration, the resulting suspension was evaluated by the count of the nucleated and viable cells (trypan blue, propidium iodide). The number of CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺ cells, mean fluorescence intensity of CD34 before and after cryopreservation or lyophilization was evaluated with FACScalibur (BD Biosciences, USA) flow cytometer, using monoclonal antibodies – FITC Mouse Anti-Human CD34, PE Mouse Anti-Human CD38 (BD Biosciences, USA).

After HCBL cryopreservation or lyophilization, the ratio of hematopoietic precursors of varying degrees of differentiation was changed relative to the fresh one. In the cryopreserved HCBL, a relatively high number of CD34⁺CD38⁻ cells was kept and the number of CD34⁺CD38⁺ cells was elevated. In the lyophilized HCBL, more differentiated elements, CD34⁺CD38⁺, were predominant, and their number was higher than in fresh and cryopreserved material. The obtained results call for the evaluation of the clonogenic properties of either cryopreserved or freeze-dried HCBL in order to predict its therapeutic potential.

Effect of cooling on synthesis of nuclear proteins in culture cells



Strona V. I.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
 e-mail: vstrona@ukr.net

The development of adaptation reactions in a cell under the action of low temperatures and during the rehabilitation period after cooling is determined by the activation of the cell genetic apparatus. Knowledge of the mechanisms of cooling action on the genome functioning will allow to actively intervene in certain stages of cryopreservation, preparing the cells for the action of an extreme factor, i.e. deep cooling.

Studies were performed in cells of a transplanted calf kidney culture. The cell monolayer was cooled down to +4 °C. Then the culture medium was replaced with fresh (cooled down to +4 °C) one, wherein the labeled precursors of DNA, RNA, proteins (H3-thymidine, C14-otic acid, C14-chlorella protein hydrolyzate) were introduced. Cells were kept at +40 °C for 1-24 hours (continuous labeling). After a certain time, interval, the vials with cell monolayer were selected. Cells were subjected to chemical fractionation using a modified Schmidt-Tanhauser method, specific radioactivity was determined in DNA, RNA and protein fractions. The concentration of these components was calculated spectrophotometrically.

Deep hypothermia has been shown to leads to complete inhibition of DNA synthesis, which remains at a level of 0.6-0.1 % throughout the entire cooling period. At the same time, protein synthesis was 12-15 % of the control; during the cold exposure (during the day), the increase in protein synthesis in cells was not observed. RNA synthesis, which was 3-5 % of the control in the first 1-3 hours of cooling, then increased up to 15 % by 5 hours of incubating the cells at +4 °C and remains at this level for about 24 hours. The RNA content in the cells decreased in the first hours of cooling (5 hours) down to 83 %, and then, from the moment of the increase in RNA synthesis, gradually accumulated in the cells and by 7 hours of cooling, its content was 133 % of the control.

With a decrease in temperature from +37 °C down to +4 °C, the synthesis of not only cellular, but also nuclear proteins was inhibited. The specific radioactivity of proteins of isolated nuclei was 98 % of the specific radioactivity of total proteins of cells, i.e., the proteins, accumulating in the nuclei, were mainly synthesized. When the temperature dropped down to +4 °C (within 2 hours), the synthesis of nuclear proteins was 35 % of the control. The introduction of labeled amino acids into the medium with cooled cells led to a decrease in the synthesis of cellular proteins down

to 12 % of the control and an increase in the synthesis of nuclear proteins up to 58 %, i.e., more than one and a half times the level of synthesis in the process of cell cooling.

During the rehabilitation period of cooled cells (culturing at +37 °C for 24-48 hours), the normal mitotic index was not restored, the number of abnormal mitoses was increased (from 16 % in control up to 38 % after cooling).

Application of hydrated fullerene C₆₀ during hypothermic storage of blood



Falko O. V., Lipina O. V., Chizhevskiy V. V.

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

e-mail: o.v.falko@gmail.com

Donor's blood after hypothermic storage is widely used in transfusiology. To increase the efficiency of existing technologies of hypothermic blood storage and to expand their capabilities, the search for new and safe substances capable to exert a protective effect under adverse temperature conditions remains topical. Hydrated fullerene C60 (C60FWS) being nanoscale compound has a unique biological feature. Due to its special physicochemical properties, it is able to participate in biological processes as a regulator of reactive oxygen species and an acceptor of free radicals [Shcherbakov A., 2011; Ivanov V., 2009], preventing a cell damage against oxidative stress. This circumstance was a prerequisite for the study, the purpose of which was to evaluate the effect of C60FWS on human blood during hypothermic storage. Blood was collected from healthy donors' cubital vein. Sodium citrate was used as an anticoagulant. The collected blood was stabilized for 4 hrs at 20 °C, and then divided into three experimental groups: 1 – blood, with the addition of a physiological solution of sodium chloride (control); 2 and 3 – blood, with the addition of C60FWS solutions at a final concentration of $1 \cdot 10^{-5}$ M and $1 \cdot 10^{-7}$ M, respectively. The investigated solutions were added to the blood in a 1:1 ratio. C60FWS solutions were prepared with physiological sodium chloride solution. After adding fullerene solutions, the blood samples were stored at 4 °C for 7 and 14 days. Blood safety was estimated by the degree of erythrocytes hemolysis of the studied blood samples placed in hypotonic solutions of sodium chloride. Below the experimental data on the hemolysis value of erythrocytes (%) for a hypotonic solution of sodium chloride with 0.5 % concentration are presented. It was shown that the level of erythrocytes hemolysis increasing depended on the period of hypothermic storage of blood and the concentration of fullerene solution. Storage of the control blood samples at 4 °C for 7 days led to a rise in the hemolysis rate of erythrocytes from 10.0 ± 0.1 % up to 40.2 ± 13.4 %, and the longer storage (14 days) revealed an increase in the erythrocytes hemolysis rate up to 67.6 ± 9.3 %. The fullerene C60FWS addition as a protective component to the blood led to a slowdown in the hemolysis rate of erythrocytes during its hypothermic storage. It was shown that after hypothermic blood storage for 7 days in the presence of a C60FWS solution (group 2) at a final concentration of $1 \cdot 10^{-5}$ M, the erythrocytes hemolysis rate was 12.5 ± 0.3 % (in the control 43.8 ± 3.7 %). The study of blood samples after an increase in their storage time up to 14 days revealed that the hemolysis rate of erythrocytes made 24.3 ± 4.4 %, which was almost 3 times lower than in the control samples (67.6 ± 9.3 %). Hypothermic storage of blood at a decreased final concentration of fullerene C60FWS to $1 \cdot 10^{-7}$ M showed that on day 7 of storage the hemolysis rate of erythrocytes was 15.3 ± 0.5 %, and on day 14 it made 48.5 ± 4.7 %. Thus, the use of a solution of hydrated fullerene C60FWS in hypothermic storage of human blood contributed to its preservation, as evidenced by a decrease in the erythrocytes hemolysis rate.

Whether nanocrystalline cerium dioxide and hydrated fullerene aqueous solutions affect *Spirulina platensis* cell culture toxically?



Goloiad M. O.

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

e-mail: o.v.falko@gmail.com

Over the past 20 years, the rapid development of nanotechnology has allowed the creation of innovative nanomaterials with fundamentally new properties and huge potential to be used in biology, medicine and pharmaceuticals. However, the problem of the toxicity of these compounds remains a serious problem. Undoubtedly, the controversy and misunderstanding in this regard are due to the fact that the study of biological properties of aqueous solutions of nanoparticles does not always fully take into account the conditions of synthesis, methods for stabilizing them in colloidal systems, particle size, transport path ways to biological targets, etc. We used in our researches water-soluble form of hydrated unmodified fullerene C60 FWS, namely, the concentrate «Fullerene C60 hydrated» (C60FWS) with initial concentration of 144 mg/L (10^{-4} M) and a solution of nanoparticles of nanocrystalline cerium dioxide (NCD) in final concentration of 0.02 g/L with a particle size of 2 nm obtained by wet synthesis [Kavok N. et al., 2017]. We believe that one of the promising biological objects for studying the toxic effects of nanocrystalline materials may be *Spirulina* microalgae. An essential point in favor of it application as a test object is the ability of blue-green algae to act as a sensitive bioindicator of the first link of trophic chain in toxicological studies of environmental pollution [Bryantseva Yu. et al., 2005]. To determine the effect of the studied nanoparticles on *Spirulina platensis* cells, we used a functional loading method, namely, the transfer of cells to a distilled water from the nutritional Zarrouk's medium (with up to 11.5 pH). After wash-out from the nutrient medium, the microalgae were divided into the following experimental groups: 1- storage in distilled water; 2- storage in distilled water with the addition of C60 FWS; 3 – storage in distilled water with

the addition of NCD; 4 – storage in Zarrouk's culture medium. The morphofunctional state of *Sp. platensis* cell culture was assessed using the methods of vitals staining, counting and recording of the spectra of own fluorescence of cells, as well as the growth of microalgae biomass. The obtained results indicate that aqueous solutions of cerium dioxide with a particle size of 2 nm and a concentration of 0.02 g/L as well as hydrated fullerene C60 FWS with a concentration of no higher than $2 \cdot 10^{-5}$ M do not exert a toxic effect on cells of *Sp. platensis*. It is known that solutions of fullerene and nanocrystalline cerium dioxide, due to their special physical and chemical properties, can participate in biological processes as a regulator of oxygen reactive species and the acceptors of free radicals [Shcherbakov A. et al., 2011], this outlines the ways of possible application of these nanoscale compounds in a variety of biotechnological processes.

Influence of nanocrystalline cerium dioxide on viability of *Escherichia coli* bacteria after hypothermic storage



Vysekantsev I. P., Buriak I. A., Falko O. V., Chyzhevskiy V. V.

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

e-mail: buriakiryna@gmail.com

To date, the most effective way of storage of different cells is cryopreservation and hypothermic storage in multicomponent media. During the effect of low temperatures, the cells are exposed to various physical and chemical factors that can cause their irreversible injury. One of these factors is oxidative stress. Reducing the negative effect of oxidative stress on cells can be achieved by adding the antioxidants to the protective medium. The use of nanocrystalline cerium dioxide (NCD), which is known to significantly exceed the degree of antioxidant activity if compared with existing antioxidants (ascorbic acid, tocopherol, amino acids, etc.) is prospective. We have shown the effectiveness of NCD application in the studies on cryopreservation of mouse fibroblasts and microalgae *Spirulina platensis*. It is known that the mandatory condition for biomedical application of various chemicals is the absence of their toxicity to different biological objects. Microorganisms are the convenient test objects for the study of toxicity. The purpose of this work was to determine the effect of NCD in a concentration of 0.2 g/L on cells of *Escherichia coli* (*E. coli* B) bacteria during their hypothermic storage. Bacteria of *E. coli* B were grown for 24 hours under standard conditions. Afterwards the suspensions of microorganisms were prepared with sterile physiological saline of sodium chloride (NaCl). The cell concentration was 10^8 CFU/ml. To evaluate the effect of NCD on *E. coli* B bacteria, NaCl (control) or NCD (experimental) solution were added to the suspension. The final concentration of NCD in the suspension made 0.2 g/L. Control and experimental specimens were placed in a refrigerating chamber and stored at 4 °C for 5 days. The viability of bacteria in the samples was evaluated by the indices of colony formation on agar plates. It was established that during hypothermic storage for 5 days the viability of *E. coli* B, both in the control and experimental samples, did not significantly change and remained at the initial level. Thus, nanocrystalline cerium dioxide at a concentration of 0.2 g/L did not affect the viability of *E. coli* B bacteria during their hypothermic storage at 4 °C for 5 days. This indicates the possibility of using nanocrystalline cerium dioxide at the mentioned concentration for cryopreservation of cells, including microorganisms. In further studies, we are planning the experiments on cryopreservation of *E. coli* cells under the protection of nanocrystalline cerium dioxide.

Ca²⁺ signals in response to ATP in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia



Fafula R. V., Meskalo O. I., Vorobets Z. D.

Department of Medical Biology, Department of Biophysics, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

e-mail: roman_fafula@ukr.net; kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

Calcium ions play a vital role in regulating of physiological processes in spermatozoa, in particular in motility and viability of ejaculated spermatozoa. Intracellular calcium level ($[Ca^{2+}]_i$) is important in the initiating process of sperm hyperactivation, capacitation, acrosome reaction and gamete interaction. Decreased fertility potential of spermatozoa is closely associated with the disturbances of Ca^{2+} -homeostasis. Metabolic active form of ATP (strongly charged anion ATP⁴⁻) is present in the female reproductive tract and may play important role the fertilization process. It is critically important for sperm cells since it is the main energy source and substrate for the second messenger cAMP in spermatozoa. Extracellular ATP (ATP_e) plays a key role as a signaling molecule.

Since $[Ca^{2+}]_i$ is main determinant of many physiological processes occurring in sperm, we set out to describe the Ca^{2+} -signals in response to ATP_e in spermatozoa of fertile (normozoospermia) and infertility men (oligo- and asthenozoospermia).

ATP_e-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ in spermatozoa were studied using 2 μM fluorescent probe Fluo-4. ATP_e caused a rapid transient elevation in $[Ca^{2+}]_i$. We found that kinetics and magnitude of the $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by ATP_e were different in normo and pathospermic cells. Specifically, the average value of peak amplitudes of $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by 5 mM ATP_e in oligozoospermic samples was not significantly different from normozoospermic samples. In asthenozoospermic samples the ATP_e-induced peak amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ changes was in 1.5 fold lower ($p < 0.05$) compared to that in normozoospermic samples. ATP_e-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in sperm cell has a concentration-dependent manner in both normozoospermic and pathozoospermic samples. In oligozoospermic samples the $[Ca^{2+}]_i$ transient response was 2.5 fold ($p < 0.05$) slower than in normozoospermic samples. Differences in ATP_e-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients between astheno- and normozoospermic samples were also significant ($p < 0.05$) although less pronounced.

Thus, the data presented here reveal that ATPe-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ in asthenozoospermic samples was inhibited. In oligozoospermic samples ATPe-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was not significantly different from normozoospermic samples, but kinetics of $[Ca^{2+}]_i$ transients was significantly slower compared to normozoospermic samples.

Obtained results clearly demonstrates ATPe-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ transients are disturbed in pathozoospermic samples which may be detrimental to sperm activation and may result in fertilization failure or abnormality. Taken into account the importance reproductive techniques, specifically for *in vitro* fertilisation and intrauterine insemination present study suggest that modulation of $[Ca^{2+}]_i$ signals and sperm function by ATPe may be beneficial for artificial reproductive techniques used in reproductive biology and medicine.

Biological role of GSTs against oxidative stress in spermatozoa of infertile men



Fafula R. V., Onufrovych O. K., Iefremova U. P., Vorobets Z. D.

Department of Medical Biology, Department of Biophysics, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

e-mail: roman_fafula@ukr.net; kaf_medicalbiology@meduniv.lviv.ua

Oxidative damage to the sperm membranes leads to reduced ejaculate quality and has been considered as one of cause of male subfertility or infertility. Since spermatozoa contain a large amount of polyunsaturated fatty acids in spermal membranes which might easily be oxidized by ROS, they are particularly vulnerable to oxidative stress. The appropriate balance between ROS generation and their neutralization is crucially important for protection of spermatozoa against oxidative damage and is maintained by antioxidant systems. Among antioxidant enzymes crucial role belong to glutathione S-transferases (GSTs). It is known that GSTs catalyze the conjugation of GSH to a variety of electrophilic compounds and have crucial role as cell housekeepers involved in the detoxification of both endogenous and exogenous substances. Regarding the GSTs that have been studied in sperm cells, little is known about their role in pathozoospermic patients.

In order to demonstrate the functional role of GSTs in sperm cells, we used a H_2O_2 -induced stress on human ejaculated spermatozoa obtained from both normo- and pathospermic patients.

We report here the effect of GSTs inhibitor ethacrynic acid on sperm motility and viability. Pharmacological inhibition of sperm GSTs activity (using its potent inhibitor ethacrynic acid) leads to spermal membrane damage, rejected in the loss of motility and decrease of viability. The fact that GSTs were primarily responsible for protection of spermatozoa from H_2O_2 -induced oxidative stress became evident when in the presence of ethacrynic acid, sperm motility and viability was drastically decreased in incubation medium containing H_2O_2 in both normo- and pathozoospermic samples. Presence of GSH in incubation medium attenuated this inhibitory effect only in normozoospermic samples, but not in asthenozoospermic samples.

For similar treatment conditions TBARS levels increased significantly leading to decrease in sperm motility and viability. The strong positive correlation between sperm motility ($r = 0.72$; $p < 0.05$) / sperm viability ($r = 0.64$; $p < 0.05$) and TBARS accumulation confirms that lipid peroxide-induced membrane damages are involved in disturbances of sperm function. It is suggested that these functional impairments are related to the intensification of lipid peroxidation as expressed by TBARS levels in spermal membranes after GSTs inhibitor treatment.

Finally, we checked the inhibition profiles of GSTs by ethacrynic acid in sperm cells obtained from normo- and pathozoospermic samples. It was shown that ethacrynic acid in the concentration range of 0.01-10 mM suppresses GSTs activity of spermatozoa in dose-dependent manner. The inhibition curves in spermatozoa obtained from astheno-, oligo- and oligoasthenozoospermic samples were not significantly different from normozoospermic patients. The inhibition constant and Hill's coefficient were not significantly different in sperm cells obtained from normo- and pathozoospermic samples.

This study provides evidence that sperm GSTs are important in the defense mechanism against oxidative stress. Evaluation of GSTs activity in sperm cells of infertile men can be helpful in fertility assessment and for the evaluation of treatment by antioxidants.

Effect of resveratrol treatment on meiotic maturation of oocytes, viability and DNA integrity of follicular cells



Sribna V.¹, Kaleyukova O.¹, Karvatskiy I.², Savchuk V.², Stupchuk M.¹, Blashkiv T.¹, Voznesenskaya T.¹

¹Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

e-mail: voz@biph.kiev.ua

Premature ovarian failure (POF), which is an ovarian function disorder affecting women under 40 years of age, is actively studied. This disease is becoming widespread due to the delay in maternity and is currently a medical and social problem. In accordance with contemporary concepts about the development of POF, the leading role is given to the deletion of autoimmune pathology.

Until now, it is unclear whether the development of the autoimmune process is a primary cause of this disease or it is the result of chronic pathology. Glomerulonephritis, in particular glomerulonephritis of immune etiology, represents a serious problem for reproductive health of women. The reproductive function may be affected by both, the glomerular disease itself and glucocorticoid and cytostatic therapy. ■

Among the known antioxidants, Resveratrol (RES) has received numerous approvals when used in various disease patterns, including oocytes. According to recent studies, the effect of RES on reproductive function in women under conditions of experimental glomerulonephritis has not been studied yet, which makes this research relevant today.

The aim of the given study was to estimate under conditions of experimental glomerulonephritis the effect of Resveratrol treatment on oocyte passage of meiotic maturation stages – metaphase I and metaphase II, on the viability and integrity of DNA of cells of the follicular environment of oocytes as well as pre- and post-implantational embryonic mortality in mice.

Experiments (two series) have been conducted on CBA/lac mice (coloring wool – agouti; genotype - +, H-2k): 64 females (10 weeks, 20-22 g) and 12 males (25 weeks, 25-27 g).

Experimental glomerulonephritis in mice was achieved by immunization of white laboratory mice of the first generation with a kidney antigen suspension derived from a parent. Animal immunization was carried out at the rate of 10 μ L of suspension per 10 g of body weight according to the following scheme: 3 times intra-abdominal 1 time per day; re-immunization was carried out after 3 weeks with a single intra-abdominal treatment of the same dose.

Resveratrol (R5010, *Sigma-Aldrich*, USA) was intra-peritoneally treatment 4 times: 1 time per day for 1 hour before immunization of animals with suspension of kidney antigen; as well as in 3 weeks once with the same dose (50 mg/kg, 0.3 mL).

In this work we have found that under conditions of experimental glomerulonephritis the treatment of Resveratrol results in an increase in the percentage of oocytes that successfully undergo meiotic maturation, decrease in the percentage of apoptotic and necrotic cells of the follicular environment of oocytes and a decrease of the post-implantation mortality rate of embryos in mice.

Новітні вимоги до контролю якості CD34/CD45⁺-вмісних лікарських засобів



Кишинець Н. В., Меркулова Ю. В., Тимченко О. В.

ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», Харків, Україна

e-mail: nelkish@gmail.com

Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин – висока медична технологія, яка в останні роки набуває швидкого розвитку завдяки позитивним результатам лікування злоякісних та інших, вкрай тяжких, гематологічних захворювань та потенційній можливості медикаментозної терапії солідних пухлин. Цитометрична оцінка кількості клітин попередників за умови трансплантації мобілізованих периферичних стовбурових клітин, пуповинної крові або кісткового мозку є обов'язковою процедурою фармакопейного аналізу CD34/CD45⁺-вмісних лікарських засобів, бо саме від кількості CD34-клітин залежить успішне відновлення основних показників крові під час аутологічної та аlogenної трансплантації кровотворної тканини. Найчастіше для цього використовується поєднання маркера стовбурових клітин CD34 та загальнолейкоцитарного антигена CD45.

Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ), кількісне визначення клітин CD34/CD45⁺, які містяться в продуктах гемопоезу, проводять за допомогою імунологічного мічення з подальшим визначенням методом проточної цитометрії за одноплатформною технологією із використанням калібрувальних флуоросфер, за необхідності після лізису еритроцитів проби (ДФУ, стаття 2.7.23 «Підрахунок гемопоетичних клітин CD34/CD45⁺» та стаття 2.7.24 «Проточна цитометрія»).

Метод, що включено до ДФУ, специфічний щодо всіх типів гемопоетичних препаратів та цільної крові. Результати випробування за даним методом наводяться у вигляді відсотка клітин CD34/CD45⁺ та абсолютної кількості на мікролітр або на кілограм маси тіла реципієнта. Доведено, що запропонований метод характеризується високою чутливістю і, закономірно, дає можливість контролювати лікарські засоби з дуже малим відсотковим вмістом клітин CD34/CD45⁺. У валідаційних дослідженнях підтверджена точність та внутрішньолабораторна прецизійність цитометричного методу. Правильність та прецизійність методу, його чутливість та специфічність забезпечують клінічно значущі та достовірні результати, а швидкість виконання дозволяє проводити аналіз та отримувати результати у реальному часі. Таку валідаційну характеристику, як міжлабораторна відтворюваність, що має гарантувати надійність результатів фармакопейного випробування CD34/CD45⁺-вмісних лікарських засобів, відповідно до вимог ДФУ, рекомендується перевіряти у межах програми з професійного тестування.

Вплив гіпотермічної інкубації в консервуючих розчинах на експресію епітопу Gal- α -1,3-Gal у тканині аорти неонатальних поросят



Богуславський К. І., Алабедалькарім Н. М.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: alkarimru@gmail.com

Епітоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) є галактозним залишком, який входить до складу глікокаліксу клітинних мембран. Біосинтез цієї структури поширений у тваринному світі, однак є відсутнім в організмі людини. Висока експресія α -Gal епітопу приводить до гіпергострого відторгнення тканин свині при ксенотрансплантації. У зв'язку з цим виготовлення біопротезів на основі тканин тваринного походження потребує видалення α -Gal-епітопу. На сьогоднішній день існують технологічні прийоми елімінації епітопу з біологічної тканини, однак всі вони мають свої недоліки, тому актуальним є розробка нових способів зниження експресії α -Gal-епітопу.

Мета роботи – вивчення експресії α -Gal-епітопу після інкубації тканини аорти неонатальних поросят у розчинах, які використовуються у клінічній практиці для гіпотермічного зберігання (ГЗ) органів при трансплантації, а саме – розчинів НТК (Custodiol) та Коллінза в модифікації (Євро-Коллінз).

Фрагменти аорти (ФА) поміщали на 2, 7 та 24 години при 4 °C в розчини НТК або Євро-Коллінз. Після цього ФА фіксували та застосовували стандартну методику приготування кріостатних зрізів та забарвлення за протоколом прямого імунофлуоресцентного мічення з FITC-кон'югованим ізолектином BSI-B4, який специфічно зв'язується з α -Gal-епітопом. Ядра клітин у тканині контрастували Hoechst 33342. В якості контролю використовували нативні ФА. Флуоресценцію аналізували на мікроскопі Carl Zeiss Axio Observer Z1. Аналіз фотографій здійснювали за допомогою програм для обробки зображень Zeiss LSM та Photoshop. Для аналізу відбирали мікрофотографії, що були отримані за однакового збільшення, інтенсивності збуджуючого лазера, розміру пінхолу. Відносну інтенсивність флуоресценції зразків розраховували після перетворення мікрофотографій, що були отримані під час запису в каналі зеленої флуоресценції, на бітову карту (bitmap-аналіз). Вимірювали середньозважений рівень яскравості зображення і нормалізували його щодо яскравості фону, який брали за нульову точку. Показник інтегральної щільності, визначений за допомогою Hoechst 33342, використовували як показник кількості ядер клітин у тканині аорти.

Нативні ФА характеризувалися стійким міченням з ізолектином BSI-B4. Морфометричний аналіз дозволив встановити, що відносна інтенсивність флуоресценції значуще не змінюється при гіпотермічній інкубації ФА в розчині НТК на всіх випробуваних термінах. На відміну від цього, в розчині Євро-Коллінз вже після 2 ч ГЗ спостерігається зменшення інтенсивності ФА на 50 % в порівнянні з нативними зразками. При подальшій інкубації даний показник знижується на 70 %.

Таким чином, нами встановлено зменшення експресії α -Gal-епітопу в тканині аорти неонатальних поросят після ГЗ в розчині Євро-Коллінз, що в подальшому дає можливість розробки протоколів перфузії і короткострокового зберігання органів тваринного походження для використання їх з метою виготовлення біопротезів.

Вивчення впливу пропілтіоурацилу на морфологічні характеристики фолікулярного епітелію щитовидної залози щурів лінії SHR



Побеленський К. О.¹, Легач Є. І.¹, Побеленський О. М.², Побеленська Л. А.², Бондаренко Т. П.¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

e-mail: pobelensky@gmail.com

Згідно статистики поширеність вузлових утворень щитовидної залози (ЩЗ) різної етіології, які виявляються методом ультразвукової діагностики, перевищує 50 %. Поряд з цим зростає група пацієнтів, які мають патології ЩЗ на фоні серцево-судинних захворювань. Враховуючи це, актуальним є вивчення патоморфологічних показників формування вузлового зобу на моделях, які відтворюють найбільш поширені серцево-судинні патології. Таку можливість надає використання спеціальних ліній лабораторних тварин, зокрема спонтанно-гіпертензивних щурів лінії SHR. Вважається, що за динамікою підвищення артеріального тиску, наявністю характерних морфологічних змін в серці та кровоносних судинах перебіг артеріальної гіпертензії у цих тварин відповідає ознакам гіпертонічної хвороби у людини (Conrad et al., 1995). З іншого боку, загальноприйнятим є моделювання гіперплазії та вузлових утворень ЩЗ у щурів шляхом введення пропілтіоурацилу (Polychronakos et al., 1989), однак досі не було вивчено особливостей розвитку цього процесу у щурів лінії SHR. Мета роботи – вивчення впливу пропілтіоурацилу (ПТУ) на морфологічні характеристики фолікулярного епітелію ЩЗ щурів лінії SHR на різних термінах.

Експеримент проводили на самках щурів лінії SHR віком 6 місяців та вагою 250–280 г. Тваринам давали розчин 0,1 % ПТУ у питній воді протягом всього експерименту, при цьому спонтанна загибель тварин склала 45 %. В якості контролю використовували інтактних щурів. Тварин забивали на 17, 25, 31, 39 та 47 добу. Тканину ЩЗ піддавали фіксації у формаліні, гістологічній проводці та забарвленню гематоксиліном/еозиним за стандартною методикою. Мікрофотографії здійснювали за допомогою світлооптичного мікроскопу Am-Score XYL-403 з камерою. Вимірювання висоти епітелію фолікулів ЩЗ на мікрофотографіях серійних зрізів проводили з використанням програми AxioVision Rel. 4.8.

Мікрофотографії зрізів тканини ЩЗ у контролі демонстрували фолікули різних розмірів, які були вистелені кубічним епітелієм та містили вакуолізований ацидофільний колоїд. Середня висота епітелію фолікулів дорівнювала $5,5 \pm 2,1$ мкм. Фолікули ЩЗ тварин експериментальної групи були вистелені кубічним або циліндричним епітелієм, деякі з них мали більш ніж один шар клітин, завдяки чому ці ділянки тканини характеризувалися ущільненим фолікулярним малюнком. Висота епітелію в цій групі значуще зростала в порівнянні з контролем. На 17 добу вона дорівнювала $12,36 \pm 2,4$ мкм, на 25 – $12,5 \pm 2,9$ мкм, на 31 – $18,38 \pm 2,2$, на 39 – $14,9 \pm 1,8$, на 47 – $13,9 \pm 3,1$ мкм. Таким чином, при введенні 0,1 % розчину ПТУ у раціон щурів лінії SHR морфологічні ознаки розвитку гіперплазії ЩЗ спостерігаються вже починаючи з третього тижня.



Дослідження метаболічної активності фібробластів після 2D та 3D культивування



Моїсєєв А. І., Божок Г. А.*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
e-mail: bozhokgaru@gmail.com

Відомо, що альтернативою моношаровій культурі в якості інформативних модельних систем можуть бути мультиклітинні сфероїди (МС), в яких умови функціонування фібробластів максимально наближені до умов *in vivo*. Тому дослідження безпосередньо впливу об'ємного культивування клітин на їхні метаболічні показники у порівнянні з моношаровою культурою є актуальним завданням.

Дослідження виконані на перещеплюваній лінії клітин L929, отриманої після 4 пасажів з кріоконсервованої культури, що зберігалася при температурі -196°C . Клітини культивували в живильному середовищі DMEM/F12 з додаванням антибіотиків (200 Од/мл бензилпеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину та 10 % фетальної телячої сироватки) при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 . Мультиклітинні сфероїди (МС) отримували на чашках Петрі з площею поверхні росту $22,1\text{ см}^2$, які попередньо обробляли 2 % розчином агару для утворення низькоадгезивної поверхні. Посівна концентрація фібробластів для моношарової та об'ємної культури становила $2 \cdot 10^5$ кл/мл. Культивування проводили протягом 7 діб, на 3-ю добу здійснювали заміну середовища. Спектр низькомолекулярних речовин білково-пептидної природи, що містяться в зразках середовищ після 7 діб культивування, оцінювали за допомогою рідинної гель-хроматографії. У якості контролю використовували живильне середовище на основі DMEM/F12 та 10 % фетальної телячої сироватки.

Встановлено, що хроматографічні профілі усіх середовищ (контрольного і після 2D і 3D культивування) мали по 10-11 основних піків в діапазоні молекулярних мас (498-12000 Да). Пептидний склад контрольованого середовища значно відрізнявся від культивування клітин в 2D і 3D умовах за кількісним і якісним складом пептидів з молекулярними масами (5657-5691 Да); (3184 Да); (1045-1067) та (490-498 Да).

Дослідження щодо кількісного і якісного складу середовищ у залежності від умов культивування встановили відмінності пептидного складу середовищ у діапазоні молекулярних мас (4345-3791 Да), (1600 Да); (705-718 Да); (490-498 Да). Доведено, що в умовах 3D культивування кількість пептидів з молекулярною масою (1067-1045 Да) та (705-718 Да) збільшувалась в 4 і 7,2 рази відповідно відносно даних показників після моношарового культивування. Необхідно також відзначити той факт, що після культивування фібробластів в умовах 3D встановлена поява нових піків у діапазоні молекулярною масою 1600 Да, які не були визначені в контролі і після 2D культивування. Для решти піків після порівняльного аналізу встановлено характерне зменшення вмісту речовин після 7-добового культивування фібробластів як в 2D, так і в 3D форматі відносно показників контрольованого середовища.

Таким чином, методом рідинної гель-хроматографії в проведених дослідженнях були встановлені відмінності кількісного і якісного складу речовин білково-пептидної природи в середовищах моношарового і тривимірного культивування фібробластів. Особливу увагу привертають результати щодо розбіжності за кількістю пептидів в залежності від умов культивування в діапазоні молекулярних мас (705-1067 Да), що може бути наслідком активного синтезу біологічно активних речовин, зокрема ростових факторів.

Таким чином, результати роботи свідчать про суттєві відмінності синтетичних процесів клітин в залежності від умов культивування і частково пояснювати перевагу щодо функціонального потенціалу клітин після об'ємного культивування відносно моношарової культури фібробластів в проведених нами раніше дослідженнях.

Однак для поглиблення розуміння щодо метаболічних особливостей фібробластів після об'ємного культивування необхідні подальші дослідження цього питання, зокрема з'ясування речовин у молекулярному діапазоні мас (705-1607 Да).

Життєздатність та проліферативна активність кріоконсервованої культури клітин дермальної папіли кроликів



Новікова О. Ю., Бондаренко Т. П., Божок Г. А.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
e-mail: ksuhanew7@gmail.com

Клітини дермальної папіли (КДП) волосяного фолікула (ВФ) є популяцією плюрипотентних клітин – похідних нервового гребеня. Була показана можливість культивування й спрямованої індукції даного типу клітин *in vitro* (Driskell et al., 2011). У зв'язку з широкими перспективами застосування КДП у регенеративній медицині на сьогодні є актуальною розробка способів їх довготривалого зберігання. На даний момент існують одиничні роботи, в яких кріоконсервуванню піддавали експланти ВФ або мультиклітинні сфероїди, що утворюються при культивуванні КДП (Kajiura et al., 2015). Проте досі не було зроблено спроб кріоконсервування моношарової культури КДП.

Мета дослідження – вивчення впливу складу кріопротекторного середовища на основі ДМСО на життєздатність та проліферативну активність КДП кроликів при кріоконсервуванні з повільною швидкістю охолодження.

Культуру КДП отримували з вібрис новонароджених кроликів за методом (Sieber-Blum, 2004). Культивування клітин здійснювалось на середовищі DMEM/F12 з 10 % фетальної телячої сироватки (ФТС). Були отримані моношарові культури клітин 1 пасажу, одна половина з яких була піддана кріоконсервуванню, а друга слугувала в якості нативного контролю. Використовувались такі комбінації кріозахисних середовищ, приготованих на основі середовища DMEM/F12: 1) 5 % ФТС+5 % ДМСО; 2) 7 % ФТС+7 % ДМСО; 3) 7 % ДМСО; 4) 10 % ДМСО. Швидкість охолодження складала $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C , потім зразки занурювали в рідкий азот. Через тиждень зберігання зразки були

█ деконсервовані і поміщені в середовище ДМЕМ/F12 з додаванням 2 % B27, а нативна культура в цей же час була субкультивована в аналогічне середовище.

Життєздатність оцінювали методом фарбування з трипановим синім. На третю добу росту здійснювався підрахунок концентрації клітин. Показник проліферативної активності КДП вираховувався як відношення отриманої концентрації клітин до вихідної.

Встановлена тенденція збільшення життєздатності КДП при кріоконсервуванні в середовищі з додаванням ФТС, що дало змогу знизити концентрацію ДМСО. Показник життєздатності клітин для середовища 1 склав 96 %, для середовища 2 – 92 %, для середовища 3 – 79 % і для середовища 4 – 84 %. Індекс проліферативної активності нативної культури становив 8,97. Кріоконсервовані культури мали деяке зниження даного показника, який перебував у межах від 7,60 (середовище 1) до 8,10 (середовище 4).

Таким чином, незначне зменшення проліферативної активності свідчить про відсутність серйозних летальних пошкоджень, здатних вплинути на швидкість ділення КДП після кріоконсервування. У той же час збільшення життєздатності клітин після заморожування-відігріву в середовищі 1 є перспективним чинником для подальшої розробки режимів кріоконсервування, які основані на використанні кріозахисних середовищ зі зменшеною концентрацією ДМСО.

Вплив біологічно активних продуктів культури мантийних гліоцитів на морфологічні показники сечового міхура щурів з інфравезикальною обструкцією



Глоба В. Ю., Бондаренко Т. П., Легач Є. І.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: globa.1978@gmail.com

Інфравезикальна обструкція (ІВО) викликає стійке перевантаження уродинаміки, що в кінцевому підсумку призводить до розвитку гіпертрофії сечового міхура (СМ) і його дисфункції (Aikawa K. et al., 2012). Сьогодні розробляються нові методи регенеративної медицини для лікування незворотних ушкоджень нижніх сечових шляхів (Imamura T. et al., 2013). Нейротрофічні фактори, які виробляють похідні глії, можуть сприяти процесам диференціювання нейронів, виживання і поширення аксонів нервових клітин (Hansebout C. et al., 2012).

Метою представленої роботи було вивчення морфологічних показників СМ щурів з ІВО після введення кондиціонованого середовища, отриманого від нативної та кріоконсервованої культур мантийних гліоцитів (МГ) і базового середовища культивування.

Культуру МГ отримували з спінальних гангліїв неонатальних поросят. Клітини висівали в концентрації $5 \cdot 10^5$ клітин/мл на чашки Петрі (*Orange Scientific*, Бельгія) і культивували протягом 20 днів при 37 °С, 5 % CO₂. Частину культури МГ кріоконсервували з додаванням 10 % ДМСО зі швидкістю охолодження 1 °С за хвилину до -40 °С з подальшим зануренням в рідкий азот. Після відігріву і відмивання від ДМСО клітини культивували по вищеприписаній методиці. Базове середовище культивування містило α -MEM, 10 % ФТС (*BioSera*, Франція) і антибіотики. Середовище від 15-20 днів культивування збирали в стерильні пробірки і аліквотували по 0,2 мл. ІВО моделювали на білих безпородних щурах – самицях (6 міс.) лігатурним методом. Після зняття лігатури через 1,5 міс. тваринам внутрішньоочередово вводили по 0,2 мл біологічно активних речовин на протязі 10 днів. Потім тварин виводили з експерименту. При морфометричному аналізі оцінювали товщину перехідного епітелію, товщину м'язового шару, загальну товщину стінки СМ, індекс співвідношення м'язовий шар/стінка на гістологічних препаратах. Експериментальні групи: 1 – введення базового середовища культивування, 2 – введення кондиціонованого середовища від нативних МГ, 3 – введення кондиціонованого середовища від кріоконсервованих МГ, 4 – без лікування, 5 – інтактний контроль.

В 1-й, 2-й, 3-й групах вимірювання перехідного епітелію СМ показали його збільшення на 41,3 %, 94 % та 48,6 % відповідно, в порівнянні з інтактним контролем і 4-ю групою. При морфометрії товщина м'язового шару СМ збільшилася у всіх групах на 65,8 %, 61,2 %, 52,8 % і 83,2 % відповідно, в порівнянні з контрольною групою. Цікаво, що в 2-й і 3-й групах спостерігалось найбільш наближені значення цього показника у відношенні до контролю.

Результати експерименту виявили, що біологічно активні продукти культури мантийних гліоцитів здатні чинити вплив на морфометричні показники, особливо на проліферацію перехідного епітелію та вираженість гіпертрофії сечового міхура на тлі інфравезикальної обструкції.

Особливості структурно-функціональної організації стовбурових ракових клітин залежно від локалізації і розмірів пухлини



Бондарович М. О., Челомбитько О. В., Останкова Л. В., Гольцев А. М.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: cryopato@gmail.com

Розвиток і метастазування раку молочної залози (РМЗ) значною мірою залежить від рівня структурно-функціональної організації стовбурових ракових клітин (СРК). Відомо, що найбільш канцерогенними в розвитку РМЗ є СРК CD44^{hi}. В групу прогеніторних, але більше диференційованих, входять CD44⁺24⁻ і CD133⁺-клітини. Визначення вмісту СРК в молочної залозі (МЗ) і пухлині має важливе теоретичне і практичне значення. █

❏ **МЕТА РОБОТИ** – визначити особливості структурно-функціональної організації СРК в МЗ і пухлині.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Експерименти проведені на мишах-самках лінії СЗН і СВА 13 - місячного віку, масою 18-20 г. Тварини були розподілені на групи: 1. СВА (контроль); 2. СЗН без пухлини; 3. СЗН з пухлиною (1-1,5 см²); 4. СЗН з пухлиною (3-4 см²). Кількість CD44^{hi}, CD44^{hi}24⁻ і CD133⁺ клітин визначали в МЗ та в пухлині методом проточної цитофлуориметрії (FACSCalibur, США) з використанням моно-клинальних антитіл (BD Pharmingen, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. В МЗ мишей групи 2 без клінічних ознак РМЗ збільшувалася кількість клітин CD44^{hi}24⁻ (в 2 рази) і CD133⁺ (в 3 рази), а також спостерігалася експансія CD44^{hi} клітин. Поява пухлини у мишей групи 3 супроводжувалася підвищенням кількості CD44^{hi}24⁻ клітин і значущим зниженням вмісту CD133⁺ клітин в МЗ. При цьому концентрація CD44^{hi} клітин в МЗ залишалася на рівні групи 2. Збільшення кількості CD133⁺ клітин в МЗ мишей групи 2 та зниження в МЗ і пухлині у тварин групи 3 свідчать про неоднозначний вплив цієї субпопуляції на розвиток пухлини. При дослідженні вмісту СРК у тварин групи 4 було показано, що відносна кількість клітин CD44^{hi}24⁻ в МЗ знижувалася в порівнянні з групою 3, а з групою 2 значущих розходжень не виявлено. У той же час кількість CD133⁺ -клітин залишалася на рівні значень групи 3, а вміст CD44^{hi} клітин був вірогідно нижче, ніж в групах 2 і 3. В пухлині мишей груп 3 і 4 відзначено вірогідно нижчий вміст клітин з фенотипом CD44^{hi}24⁻, CD133⁺, ніж в МЗ. При цьому вірогідної кореляції між розміром пухлини і вмістом клітин з цим фенотипом не виявлено. Відносна кількість найбільш канцерогенних CD44^{hi}-клітин у пухлині збільшувалася по мірі її росту і була в 3 рази вищою у мишей групи 4 порівняно з групою 3. Це може бути пов'язано зі збільшенням вмісту індукованого гіпоксією фактора (HIF-1) в тканинах.

ВИСНОВКИ. Встановлено факт кількісної і якісної експансії СРК залежно від місця локалізації і розміру пухлини.

Експресія нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней



Алі С. Г., Божок Г. А.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: bozhokgaru@gmail.com

На теперішній час у медико-біологічних дослідженнях сформувався запит на використання в експериментах так званих трансляційних моделей на великих тваринах (translational large animal model) задля максимального наближення до фізіологічних характеристик людини. У цьому відношенні свиня розглядається як один з придатних видів модельних тварин. Культури клітин зі спінальних гангліїв (СГ) є перспективним джерелом нейральних клітин-похідних нервового гребеня (Li et al., 2007; Tongtako et al., 2017). Однак досі не було зроблено спроби отримання та вивчення основних фенотипових характеристик клітинних культур, отриманих зі СГ свиней. **Мета дослідження** – вивчити експресію нейральних маркерів у культурі клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних свиней.

В експериментах використовували СГ поросят віку P0-P1. Суспензію клітин отримували ферментативним методом. Клітини висівали в концентрації 0,5•10⁴ клітин/мл і культивували в чашках Петрі з поверхнею, обробленою полі-D-лізіном, при 37 °С в атмосфері з 5 % CO₂ у живильному середовищі α-MEM з додаванням 2 % НейроМакс та антибіотиків. На 8-му добу культивування спостерігалось утворення мультиклітинних сфероїдів, які пересівали та продовжували культивувати у середовищі α-MEM з 10 % фетальної телячої сироватки. Після отримання конфлуентного моношару зразки культур фіксували та забарвлювали за протоколом непрямого імунофлуоресцентного мічення з першими антитілами до глутамін-синтетази (ГС), S-100 та α-III-тубуліну (ТубВ3), а також відповідними другими антитілами, кон'югованими з флуоресцентною міткою. Мікрофотозйомку здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопу Carl Zeiss Axio Observer Z1. Аналіз зображень проводили з використанням програми Axio Vision Rel. 4.8.

Встановлено, що в культурі клітин, отриманої зі СГ неонатальних свиней, спостерігається висока експресія одного з основних специфічних маркерів сателітних гліальних клітин (СГК) – глутамін-синтетази. Позитивне мічення антитілами до ГС було відмічено у більш ніж 95 % клітин, які мали морфологічні ознаки СГК: малий розмір, веретеноподібну форму клітини, незначний шар цитоплазми, щільне інтенсивно базофільне ядро та два коротких відростки. Нами не було виявлено специфічного забарвлення жодних клітин з антитілами до S-100. Однак цікаво, що у певної частини клітин спостерігалася експресія ТубВ3, при цьому позитивно забарвлювалися клітини іншого морфологічного типу: великі розпластані мультиполярні клітини з великим ядром овальної форми.

Порівнюючи власні результати з даними, які були отримані у культурі клітин зі СГ мишей (Tongtako et al., 2017), можна відзначити, що клітини СГ неонатальних свиней, як і мишей, експресують ГС. Однак, на відміну від культури зі СГ мишей, в культурі клітин зі СГ свиней спостерігається експресія ТубВ3. При цьому морфологічно тип клітин, який позитивно реагує з антитілами до ТубВ3, не належить до нейронів. Це може бути ознакою присутності у культурі клітин зі СГ свиней прогеніторних клітин-похідних нервового гребеня, які за певних умов диференціювання здібні експресувати ТубВ3 (Li et al., 2007).

Вплив трансплантації клітин кордової крові на розвиток постінсультних процесів у головному мозку щурів

Лебединець В. В.^{1,3}, Останков М. В.¹, Лебединець Д. В.^{2,3}, Дубрава Т. Г.¹

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України;

²Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна;

³Центральна клінічна лікарня Укрзалізниці, Харків, Україна

e-mail: cryopato@gmail.com

Клітинна терапія із застосуванням кордової крові (КК) вважається перспективним підходом для корекції наслідків ряду патологій, у тому числі й ішемічному інсульті. Лікування ішемічного інсульту препаратами КК принципово відрізняється від традиційної медикаментозної терапії, для якої характерні симптоматичний підхід і короткочасність впливу. В той час як застосування КК в терапії інсульту, у випадку успішної інтеграції в тканину реципієнта, може робити позитивний ефект протягом тривалого часу. Тому використання кордової крові як терапевтичного агента при ішемічному інсульті дає надію на відновлення структури і функції головного мозку, втрачених в результаті розвитку патологічного процесу.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – оцінити морфологічні зміни в головному мозку, моторні й когнітивні навички у щурів при ішемічному інсульті на тлі лікування кріоконсервованою (кККЛ) або ліофілізованою кордовою кров'ю людини (лККЛ).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар 6 міс. віку, масою 210-250 г. Моделювали ішемічний інсульт оклюзією середньої мозкової артерії (СМАО). Через 6 годин після СМАО щурам одноразово внутрішньоочеревинно вводили кККЛ або лККЛ по 0,5 мл в дозі $5 \cdot 10^6$ клітин. Церебролізін розчиняли у фізіологічному розчині і вводили внутрішньоочеревинно по 0,1 мл/100 г маси тварини. Гістологічні препарати мозку готували за стандартною методикою, серійні зрізи 5-7 мкм фарбували гематоксилін-еозином і люксолом. Морфометрію виконували після мікроскопії й створення цифрового зображення за допомогою мікроскопа Zeiss Primo Star, $\times 100$, 400, 900. Неврологічний статус оцінювали по поводженню тварин у тестах «відкрите поле» і «хрестоподібний лабіринт».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. На моделі ішемічного інсульту у щурів було показано, що введення лККЛ, також як і кККЛ, прискорює плин реакції асептичного запалення, сприяє виживанню нейронів у зоні ішемічної півтини, поліпшенню васкуляризації ішемізованої зони й збереженню цілісності судинного сплетіння. Терапія ішемічного інсульту введенням лККЛ або кККЛ дозволяє зберегти вірогідно більшу кількість життєздатних нейронів у нервовій тканині, прилеглою безпосередньо до зони травматичної півтини, а також сприяє більш швидкому й повному відновленню моторних і когнітивних навичок у щурів з ішемічним інсульту в порівнянні із застосуванням церебролізіну.

ВИСНОВОК. Результати експериментального дослідження застосування лККЛ, також як і кККЛ, можуть бути використані для розробки нових терапевтичних підходів, заснованих на принципах клітинної терапії, для лікування пацієнтів з ішемічним інсульту.

Адоптивне застосування толерогенних дендритних клітин – альтернативний терапевтичний підхід до лікування ревматоїдного артриту

Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Ямпольська К. Є., Бабенко Н. М., Гаєвська Ю. О., Бондарович М. О.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

e-mail: yampi@ukr.net

Проблема лікування аутоімунних захворювань (АІЗ), зокрема ревматоїдного артриту (РА), є однією з найбільш актуальних у біомедицині впродовж багатьох років. Важливою складовою патогенезу РА є дисрегуляція функції імунної системи з порушенням толерантності до власних антигенів і розвитком аутоімунних реакцій. Відомо, що значима роль у пригніченні аутоімунної відповіді належить регуляторним Т-клітинам (Трег), вміст і функція яких знижена при РА. Перспективним методом корекції таких порушень є індукція антиген-специфічної толерантності, у формуванні якої важливе місце займають толерогенні дендритні клітини (толДК).

Метою дослідження було вивчити вплив толДК на стан Т-регуляторної ланки імунітету у мишей з ад'ювантним артритом на різних етапах його розвитку.

Експерименти виконували на мишах лінії СВА/Н масою 20-24 г. Толерогенні ДК отримували з мононуклеарних клітин (МНК) кісткового мозку при культивуванні у середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональною телячою сироваткою, ГМ-КСФ, ІЛ-4 та дексаметазоном. Ад'ювантний артрит (АА) індукували у мишей субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда. Оцінку інтенсивності запального процесу здійснювали по динаміці набряку суглоба, що характеризується індексом артриту. Вміст серомукоїда в сироватці крові визначали турбодиметричним методом. Кількість сіалових кислот визначали по методу Гессе й оцінювали в умовних одиницях. Аутологічні толДК, у дозі $5 \cdot 10^5$ клітин/мишу вводили внутрішньовенно на 7-у, 14-у і 21-у добу розвитку АА. Як контроль тваринам з АА вводили дексаметазон (КРКА, Словенія) 0,022 мг/мишу і МНК $5 \cdot 10^5$ клітин/мишу. Через 7 дів після введення толДК визначали клінічні показники та вміст Трег, які ідентифікували у селезінках тварин за допомогою моноклональних антимишачих антитіл: CD4, CD25, FOXP3 (BD, США).

Встановлено, що рівень терапевтичної ефективності толДК визначався строком їх введення. У гострий період розвитку артриту (7-а доба) терапія ДК виявилася неефективною. Найбільший імунокоригуючий ефект проявляли толДК, введені на 14-у добу розвитку патології, що сприяло підвищенню кількості Трег-клітин ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) і нормалізації клінічного статусу тварин (показників сіалових кислот, серомукоїдів та індексу артриту). Даний факт є підтвердженням можливості використання толДК, отриманих *ex vivo* для лікування АА.

Терапевтичні ефекти генетично модифікованих мезенхімальних стовбурових клітин з посиленою експресією гена інтерлейкіну-10



Топорова О.І.³, Боцул О.², Дерябіна О.³, Фіщенко В.², Похоленко Я.^{1,3}, Маммадов Л.², Яремін С.², Фіщенко О.², Шульга М.⁴, Точилівський А.⁵, Кордюм В.^{1,3}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

²Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна

⁴Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна

⁵Віотехсом, Київ, Україна

e-mail: topp@meta.ua

Частота захворювань і травматичних ушкоджень колінного суглоба з подальшим розвитком його дисфункції настільки велика, що є не тільки медичною, а й соціально-економічною проблемою. Створено багато технологій як консервативного, так і оперативного лікування. Однак ключова проблема – пошук методу ефективного відновлення суглобового хряща – остаточно не вирішена. В останні роки проводяться численні клінічні випробування терапії стовбуровими клітинами. Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є основним типом клітин, які використовуються лікарями в ортопедії. Оскільки показано, що застосування стовбурових клітин значно прискорює процес відновлення і помітно зменшує запалення, метою роботи було посилити протизапальну терапевтичну дію МСК людини за рахунок переносу гена протизапального інтерлейкіну-10.

МСК виділяли з пуповин людини методом експлантів. FACS-аналіз експресії поверхневих маркерів МСК з використанням моноклональних антитіл проти CD105, CD90, CD73 виконано на сортері BD FACSAria із застосуванням програмного забезпечення BD FACSDiva. Клітини 2-го пасажу трансфікували комплексами ДНК плазмідного вектора та реагента TurboFect. Створена плазміда містить біцистронну експресійну касету, що регулюється конститутивним промотором і забезпечує одночасну експресію цільового (IL-10) та маркерного (eGFP) генів. Показано, що через 48 год після трансфекції рівень синтезу трансгенного цитокіну на два порядки перевищує вихідний рівень синтезу власного інтерлейкіну-10.

Шурам з механічним ураженням суглобового хряща проведено внутрішньосуглобові ін'єкції $1 \cdot 10^5$ нативних МСК та генетично модифікованих МСК/IL-10. Гістологічний аналіз пошкоджених тканин після трансплантації клітин показав, що утворення зрілих хондроцитів, виражений ендостальний і периостальний хондрогенез, утворення зрілої ендостальної і периостальної хрящової тканини у щурів, які отримали МСК з посиленим синтезом антизапального інтерлейкіну-10 людини, відбувається в більш короткий термін. В обох експериментальних групах на відміну від контрольних тварин, яким не трансплантували МСК, не відмічалось надмірної продукції осифікуючого матриксу, не спостерігалась активація остеокластів ще до початку формування повноцінної кісткової тканини і були відсутні дистрофічні зміни хондроцитів і хондробластів.

Кріоконсервовані клітини фетальної печінки в лікуванні експериментального atopічного дерматиту



Леонова Л. А., Останков М. В., Бондарович М. О., Ямпольська Є. Є., Останкова Л. В.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: cryopato@gmail.com

Серед шкірних захворювань atopічний дерматит (АД) займає особливе місце серед алергічних захворювань через нез'ясований етіопатогенез, хронічний перебіг й пов'язані із цим терапевтичні проблеми. Ступінь важкості перебігу та порушення показників імунного статусу (ІС) у пацієнтів є основою для розробки методів терапії АД. Регуляція імунних механізмів, що лежать в основі розвитку АД, відкриває нові можливості в розробці патогенетичних методів терапії цього захворювання.

МЕТА РОБОТИ – оцінити вплив кріоконсервованих клітин фетальної печінки (кКФП) на показники клітинної та гуморальної ланок імунітету у щурів з АД.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Були обстежені щури лінії Вістар у віці 6 місяців масою 180-200 г. Ініціювали АД нанесенням на шкіру спини ($3 \times 3 \text{ см}^2$) 5 % спиртово-ацетонового розчину динітрохлорбензолу протягом 21 доби. Кріоконсервували КФП за методом Гольцева А. М. і співавт. (1992 р.). Щури були розподілені на групи: 1. Здорові (контроль); 2. АД; 3. АД + преднізолон; 4. АД + кКФП по 0,5 мл, $5 \cdot 10^6$ клітин. Імунологічне обстеження включало оцінку показників концентрації субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) в біоптатах шкіри методом проточної цитофлюориметрії. В сироватці крові оцінювали показники: імуноглобулінів (IgA, IgE, IgG); цитокінового статусу – інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10), ІФН- γ методом імуноферментного аналізу, та ЦІК – спектрофотометричним методом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Алергічна реакція при АД виникає в органі-мішені, шкірі і має Т- клітинний імунний механізм. Так, в шкірі щурів з АД спостерігалася інфільтрація Т- лімфоцитами, які секретували прозапальні цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 і ІФН- γ), відбувалося ушкодження епітелію, що є наслідком алергічного запалення тканини. Застосування кКФП знижувало тканинну гіперреактивність, відбувалося пригнічення ознак алергічного запалення, перебудови характеру клітинної й цитокінової відповіді. Лікування введенням

кКФП супроводжувалося зростанням загальної кількості Т-лімфоцитів, зменшенням кількості Т-хелперів і підвищенням Т-супресорів, що привело до нормалізації імнорегуляторного індексу, а також зниження кількості В-лімфоцитів та NK на 7-у добу. В сироватці крові спостерігали зростання ІЛ-2 та зниження ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 і ІФН- γ ; підвищення рівня ІgА, та зниження ІgЕ, ІgG та ЦІК. Терапія преднізолоном до такого ефекту не призводила.

ВИСНОВОК. Експериментально доведено, що використання кріоконсервованих клітин фетальної печінки позитивно впливає на показники клітинної та гуморальної ланок імунітету при лікуванні atopічного дерматиту.

Клітинна терапія експериментального генітального герпесу кордовою кров'ю людини



Стецишин В. Г., Останкова Л. В., Луценко О. Д., Гриша І. Г., Гаєвська Ю. О.
 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
 e-mail: cryopato@gmail.com

Встановлено, що сучасна терапія генітального герпесу (ГГ) припускає пригнічення окремих ланок репродукції вірусу простого герпеса-1 (ВПГ-1). Водночас розвиток ГГ впливає на імунну систему (ІС) хворого. Тому актуальною проблемою лікування ГГ є необхідність застосування препаратів із системною імуномодулюючою активністю.

МЕТА РОБОТИ – оцінити ефективність імуномодулюючої терапії експериментального ГГ кріоконсервованою (кККЛ) та ліофілізованою (лККЛ) кордовою кров'ю людини.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Експерименти виконані на 6-місячних щурах-самках лінії Вістар, масою 180-200 г. Моделювали ГГ внутрішньоочеревинним введенням 1 мл ВПГ-1 (титр 1:20 000) протягом 5 діб. Кріоконсервували ККЛ за методом Цуцаєвої А. А. і співавт. (1998 р.). Ліофілізували ККЛ за методом Гольцева А. М. і співавт. (2016 р). Регідратували лККЛ фізіологічним розчином (1:1). На 5-у добу після індукції ГГ щурам внутрішньоочеревинно вводили кККЛ або лККЛ по 0,5 мл в дозі $5 \cdot 10^6$ клітин. Ін'єкцію ацикловіра (АЦВ) в дозі 50 мг/кг проводили 1раз/добу протягом 3-х діб. Групи тварин: 1. Здорові (контроль); 2. ГГ; 3. ГГ + АЦВ; 4. ГГ + кККЛ; 5. ГГ + лККЛ; 6. ГГ + кККЛ + АЦВ; 7. ГГ + лККЛ + АЦВ. Визначали кількість Т-лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25) імунофлуоресцентним методом; рівень цитокінів (ІЛ-10, ФНО- α , ІФН- γ), концентрацію імуноглобулінів ІgM, ІgА методом ІФА; та клінічний аналіз крові. Ефективність лікування ГГ оцінювали на 7, 14 та 21-у добу від початку терапії.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані свідчать про виражений імуномодулюючий вплив як лККЛ, так і кККЛ на ІС щурів з ГГ. Проведене комплексне лікування щурів групи 6 і 7 більшою мірою, ніж групи 4 і 5, сприяло усуненню диспропорції в показниках Т-клітинної ланки імунітету. Починаючи з 7-ї доби у тварин групи 6 і 7 спостерігали відновлення імнорегуляторної функції Т-клітин і продукції протизапальних цитокінів; зниженню гіперактивності ЦІК, продукції специфічних імуноглобулінів ІgM, ІgА та нейтрофільних гранулоцитів. У щурів групи 4 і 5 показники клітинної та гуморальної ланки імунітету відповідали значенням контрольних тварин на 14-у добу.

ВИСНОВОК. Розроблено й патогенетично обґрунтовано застосування комплексного методу лікування експериментального генітального герпесу введенням кріоконсервованих або ліофілізованих клітин кордової крові з ацикловіром.



ARTICLE ON THE SITE
 TRANSPLANTOLOGY.ORG