

Моделирование перинатального гипоксически-ишемического повреждения и экспериментальное лечение криоконсервированными эмбриональными нервными клетками

А.В. ДУНАЕВСКАЯ, В.В. ПАРФЕНОВА, Е.И. ГОНЧАРУК, Н.А. ВОЛКОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modeling of Hypoxic-Ischemic Damage of Newborns and Experimental Therapy with Embryonic Neuronal Cells

A.V. DUNAYEVSKAYA, V.V. PARFENOVA, N.A. VOLKOVA, E.I. GONCHARUK
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Церебральная гипоксия-ишемия новорожденных остается основной причиной смертности и таких тяжелых повреждений развития нервной системы новорожденных, как детский церебральный паралич, умственная отсталость, эпилепсия, а также малые дисфункции мозга. Несмотря на технологические усовершенствования, позволяющие улучшить акушерскую и неонатальную помощь, а также глубокое понимание патофизиологии перинатальной асфиксии, заболеваемость гипоксически-ишемической энцефалопатией остается без изменений последние несколько десятилетий. Отсутствие эффективной терапии перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатии обусловило необходимость развития новых методов. В настоящее время растет интерес к терапевтическому потенциалу стволовых клеток в лечении дисфункций центральной нервной системы у взрослых. Актуально изучение использования нервных стволовых клеток в коррекции дефектов мозговой ткани у новорожденных. Вторым перспективным направлением в лечении церебральной гипоксии-ишемии новорожденных является гипотермия. Для фундаментального изучения этих методов лечения необходима адекватная простая модель гипоксии новорожденных.

В эксперимент были включены 16 крысят (женские и мужские особи) из двух пометов. Гипоксическое повреждение было инициировано в первый постнатальный день. Животные были разделены на 3 группы: 1 – животные с гипоксией средней тяжести, 2 – с тяжелой гипоксией и 3 – без гипоксии (контроль). Крысят держали в экспериментальных камерах с объемом 6 мл без доступа кислорода при температуре 37°C. Животным был дан легкий эфирный наркоз. После гипоксии крысят возвращали к самке на семь дней. На 8-й день жизни была проведена трансплантация суспензии эмбриональных нервных клеток в субдуральное и/или арахноидальное пространство через родничок. Для трансплантации использовали суспензию криоконсервированных нервных клеток эмбриона человека 7-12 недель гестации. Жизнеспособность клеток составляла $42,6 \pm 2,5\%$, концентрация $\sim 32 \times 10^6$ клеток/мл.

Когда крысята достигли 4-недельного возраста, мы исследовали действие ранней постнатальной гипоксии на наиболее чувствительные структуры мозга (неокортекс, гиппокамп, мозжечок) в водном тесте Морриса (изучение пространственной памяти) и изучали кортикальную и мозжечковую целостность в ротационном тесте (определение моторно-координационных нарушений). В тесте Морриса животных помещали в круглый бассейн с водой, в котором находилась платформа. Животные с повреждением гиппокампа не

Cerebral hypoxia-ischemia of the newborn remains a major cause of mortality and such severe neurodevelopmental disability as children's cerebral palsy, mental retardation, epilepsy and slight brain dysfunctions. Despite the advances in technology allowing better obstetric and neonatal care and a deeper understanding of the pathophysiology of perinatal asphyxia, the incidence of hypoxic-ischemic encephalopathy in neonates has remained essentially unchanged over the last few decades. Given the absence of effective therapies for stroke and perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy, it is important to derive new strategies. There has been a growing interest in the therapeutic potential of neural stem cells progenitors for therapy in central nervous system dysfunctions at adults. So now the attempts to use neural stem cells in the correction of cerebral tissue defect at newborns are very actual. The second perspective direction in treatment of cerebral hypoxia-ischemia of the newborns is hypothermia. It needs an adequate simple hypoxic model of newborns for fundamental study of these treatment methods.

Sixteen male and female rat pups from two litters were included in the experiments. The hypoxic damage of pups was initiated on 1st postnatal day. Three animals groups were used: 1 – moderate hypoxia, 2 – severe hypoxia and 3 – with no hypoxia (control). The animals were kept in experimental chamber with 6 ml volume without air access at 37°C. The pups were lightly anesthetized with ether. After hypoxia the pups were returned to their dam for recovery period in 7 days. On the 8th postnatal day the transplantation of neural cells was carried out into subdural and/or arachnoidal space via fontanelle. The suspension of cryopreserved human neural cells of embryos with 7-12 week gestation was used. Viability of cells was $42.6 \pm 2.5\%$, concentration $\sim 32 \times 10^6$ cell/ml. When rats were 4 week old we tested effect of early postnatal hypoxia on the most sensitive brain area (neocortex, hippocampus, cerebellum) in test of spatial memory in a Morris water maze and study cortical and cerebellum integrity in rotation test for determination of motor-coordination disorders. In the Morris water maze the animals are placed into a circular water tank with a visible or an invisible platform. The rats after hippocampal damage are not able to find the invisible platform. The histology changes of their brain were studied by hematoxylin-eosin staining. Brain structure was evaluated at 2 h and 37 days recovery from perinatal hypoxia.

Our study shown newborn rats after hypoxia modeling had problem with spatial memory, the relearning of a new platform location in water maze and motor-coordination in rotation test. Histological examination in 2 h after hypoxia shown a diffuse damage of neocortex and the expressed gliosis niduses after severe hypoxia. Histological asses-

могли найти невидимой платформы. Гистологические изменения мозга исследовали через 2 часа и через 37 дней после гипоксии с помощью окрашивания гематоксилином-эозином.

Наши исследования показали, что у новорожденных крысят после моделирования гипоксии наблюдалось нарушение пространственной памяти и двигательной координации в ротационном тесте. Гистологические изменения через 2 ч после гипоксии показали диффузное поражение неокортекса и выраженный ядерный глиоз после тяжелой гипоксии. Гистологическая оценка на 37-й день после гипоксии показала склерозирование оболочек мозга с многочисленными очагами склероза и воспаления. Пролiferация микроглии более выражена в подкорковых зонах. В группе животных, которым проводили трансплантацию эмбриональных нервных клеток, обнаружены резкая эухроматизация ядер в клетках зоны глиального матрикса, расширение зоны, что свидетельствует об интенсивных процессах роста и дифференцировки всех компонентов глии.

Полученные данные подтверждают, что наша модель перинатальной гипоксии индуцирует повреждение таких наиболее чувствительных структур головного мозга, как неокортекс, мозжечок и гипокамп. Мы полагаем, что трансплантация криоконсервированных нервных клеток эмбриона стимулирует репарацию мозга новорожденных крыс после перенесенной гипоксии.

sment on 37th day after hypoxia have demonstrated that brain shells were scleroid with numerous scars and inflammation. The proliferation of microglia is more expressed in subcortical zones. At animals group after transplantation of neural human embryo cells the zone of germinal matrix is more expanded and marked euchromatisation of cell nuclei is observed. Thus there are active processes of growing and differentiation in germinal matrix.

We conclude that our model of perinatal hypoxia induces damage of the most sensitive brain structures such as neocortex, cerebellum and hippocampus. Our data suggested that transplantation of cryopreserved neural embryo cells stimulates reparation at rat brain after perinatal hypoxia.

Низкотемпературное консервирование эритроцитов человека с оксиэтильными производными глицерина

Ю.П. ТРОЦ, А.В. НИКОЛЕНКО, А.М. КОМПАНИЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Low Temperature Preservation of Human Erythrocytes with Oxyethylated Glycerol Derivatives

YU.P. TROTS, A.V. NIKOLENKO, A.M. KOMPANIETS

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

В практике низкотемпературного консервирования эритроцитов человека наиболее широкое применение получил классический криопротектор – глицерин. Однако процесс удаления его из клеточной суспензии перед трансфузией делает этот метод замораживания трудоемким и дорогостоящим.

Одним из перспективных направлений является использование экстрацеллюлярных криопротекторов, полученных путем целенаправленной модификации химической структуры молекул известных криопротекторов (многоатомных спиртов), а именно этиленгликоля и глицерина. Так, оксиэтилирование этиленгликоля позволило получить полиэтиленоксиды – ПЭО-400 и ПЭО-1500, применяемые при замораживании ядерных клеток крови и эритроцитов. Путем оксиэтилирования глицерина были получены оксиэтильные производные разной степени полимеризации молекулы глицерина, криопротекторные свойства которых изучаются на разных биологических объектах.

Цель работы – исследование условий низкотемпературного консервирования эритроцитов человека с

Glycerol as a classic cryoprotectant has obtained wider practical use for human erythrocytes' low temperature preservation. However its removal out of cell suspension before transfusion makes this freezing method a labor-consuming and expensive one.

Using extracellular cryoprotectants obtained by an aimed modification of chemical structure of multi-atom alcohol molecules such as ethylene glycol and glycerol, is a perspective direction. This modification simplifies a freeze-thawing procedure of erythrocytes by an exclusion of the stage of cryoprotectant removal out of cell suspension.

Oxyethylation of ethylene glycol enabled to obtain polyethylene oxides, PEO-400 and PEO-1500, applied during freezing of nucleated blood cells and erythrocytes. By means of glycerol oxyethylation there were obtained oxyethyl derivatives of various polymerization degree of glycerol molecules, cryoprotective properties of which are examined in different biological objects.

The research aim was examining the conditions of low temperature preservation of human erythrocytes with glycerol oxyethyl derivatives (OEG) n=25 and n=30).