

Abstract

Malyshkina S.V.*, Poshelok D.M.,
Nikolchenko O.A.,
Vyshniakova I.V.,
Samoilova K.M.

*State Institution «Sytenko Institute
of Spine and Joint Pathology of
National Academy of Medical Sci-
ences of Ukraine», 80 Pushkinska
st., Kharkiv, 61024, Ukraine,*

**EFFECT OF MILD HYPOTHERMIA ON THE ABILITY OF
RAT BONE MARROW STROMAL CELLS TO FORM COLO-
NIES IN VITRO**

Introduction. The study of the effect of hypothermia (decreased body temperature) on bone remodeling is one of the current problems in biology and medicine. Bone marrow contains stromal cells that are able to differentiate into osteogenic direction, so there the number, structural and functional conditions are important for bone remodeling and osteoreparation. It is known that bone marrow stromal cells are extremely sensitive to unfavorable external and internal factors. The number of these cells and their ability to form cell colonies decreases with age and development of destructive changes in the bones. In the literature we have not found works in which the effect of mild hypothermia on bone marrow stromal cells would have been studied.

The purpose: to evaluate investigate *in vitro* the colony-forming ability of bone marrow stromal cells in rats of different ages after the mild hypothermia induced by cold exposure.

Materials and Methods. We studied the cytological indicators of the ability of bone marrow stromal cells to form colonies during the cultivation – the number and area of cell colonies, the morphological characteristics of the cultured cells. Experimental animals (10 rats) at the age of 6 and 24 months were kept in separate sections of the cold chamber at temperature -20°C for 5 days to 5 hours per day. Animals of the control groups (10 rats) were kept in the separate boxes at a room temperature ($18-22^{\circ}\text{C}$). Bone marrow was isolated from the rat femurs and tibias at 7 and 28 days after induced mild hypothermia. Euthanasia of animals was performed by the intraperitoneal administration of sodium thiopental (90 mg / kg). Bone marrow cells were seeded into plastic flasks (Falcon) based 1.5×10^6 cells per 1 cm^2 , and then cultured in a nutrient medium containing DMEM (Sigma), 2 mM L-glutamine, 20 % fetal calf serum and 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The nutrient medium was changed every three days up to 12 days of culture, then it was removed, and the cell cultures washed with PBS, fixed with May-Grunwald, stained with azure-eosin by Romanovsky. The cytological indicators were studied using light microscope Olympus CX41RF. The obtained digital values were processed by the methods of variation statistics. The differences between paired samples were evaluated by using Student t-test and considered statistically significant at $P < 0.05$. Plan of the experimental study and its carrying out in accordance to the Law of Ukraine № 3447-IV «On protection of animals from cruelty» and European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes were approved by the positive decision of the local Committee on Bioethics (protocols No. 88, 30.05.2011, No. 131, 16.06.2014).

Results. In the cultures of bone marrow cells isolated from the bones of the young rats at 7 day after cold exposure the number and area of colonies are less as compared with the control, respectively, by 34.5 and 40.1 %. The cells with destructive changes (vacuolization of the cytoplasm, pyknosis of the nucleus) are identified on the periphery of the colonies. The colonies of the cells are no formed in the cultures of bone marrow cells of experimental old rats (the cells are arranged individually or in small clusters). In the cell cultures of control old rats the number and area of colonies are less than in the cell cultures of control young rats by 53.6 and 44.2 %, respectively. At 28 day after cold exposure the differences in the number and area of cell colonies between the experimental and control cultures of bone marrow cells both young and old rats are decreased compared with ones at 7 day. This suggests that the regenerative processes occur in the bone marrow of rats after mild hypothermia. At that, these processes are less active in old animals, so as at 28 day after cold exposure all cytological indicators remain the lowest in the cell cultures of experimental old rats.

Conclusion. The study showed that mild hypothermia induced in rats by cold exposure inhibits the proliferative activity of bone marrow stromal cells and their ability to form cell colonies *in vitro*. Negative effects of hypothermia are more expressed in the bone marrow cell culture of old animals.

Keywords: cell culture, bone marrow, cell colonies, hypothermia, rats.

Corresponding author: *s_malysh@ukr.net

Резюме

Малишкіна С.В. *, Пошелок Д.М.
Нікольченко О.А.,

Вишнякова І.В.,

Самойлова К.М.

Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», вул. Пушкінська, 80, Харків, 61024, Україна,

ВПЛИВ ЛЕГКОЇ ГІПОТЕРМІЇ НА ЗДАТНІСТЬ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ФОРМУВАТИ КОЛОНІЇ *IN VITRO*

Мета: дослідити *in vitro* колонієутворювальну здатність стромальних клітин кісткового мозку у щурів різного віку після легкої гіпотермії, індукованої холододовим впливом. В роботі вивчені цитологічні показники здатності стромальних клітин кісткового мозку формувати колонії при культивуванні – кількість та площа клітинних колоній, морфологічна характеристика стану культивованих клітин. Кістковий мозок білих щурів 6- та 24-місячного віку отримували зі стегнових та великогомілкових кісток на 7 та 28 добу після індукованої легкої гіпотермії (тварини 5 діб перебували у холододовій камері при температурі -20°C по 5 годин на добу). Клітини кісткового мозку висівали у пластикові флакони (*Falcon*) із розрахунку $1,5 \times 10^6$ клітин на 1 cm^2 та культивували впродовж 12 діб. Поживне середовище замінювали кожні три доби. Наприкінці культивування клітини промивали, фіксували та забарвлювали азур-еозином за Романовським.

Встановлено, що гіпотермія пригнічує проліферативну активність культивованих клітин та їхню здатність утворювати колонії. В культурі клітин, отриманих у молодих тварин на 7 добу після гіпотермії, встановлені менші показники кількості та площі утворених колоній, ніж у контрольних культурах. По периферії колоній виявлені клітини з деструктивними змінами (вакуолізація цитоплазми, пікноз ядра). В дослідних культурах клітин щурів старечого віку формування колоній не зафіксовано (клітини розташовані по-



одинокі або невеликими кластерами). На 28 добу після гіпотермії різниця за досліджуваними показниками між дослідними та контрольними культурами клітин і молодих, і старих тварин скоротилася у порівнянні з 7 добою. Це свідчить про відновні процеси, які перебігають у кістковому мозку після гіпотермії, але у тварин старшого віку вони менш виражені, бо і на цей термін у дослідних культурах клітин старих щурів показники кількості та площі утворених колоній були найменші.

Ключові слова: культура клітин, кістковий мозок, клітинні колонії, гіпотермія, щури.

Резюме

Малишкіна С.В.*, Пошелок Д.М.,
Никольченко О.А.,

Вишнякова І.В. Самойлова К.М.

Государственное учреждение «Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М.И. Ситенко НАМН Украины», ул. Пушкинская, 80, Харьков, 61024 к Украина,

ВЛИЯНИЕ ЛЕГКОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СПОСОБНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ФОРМИРОВАТЬ КОЛОНИИ IN VITRO

Цель: исследовать *in vitro* колониеобразующую способность стромальных клеток костного мозга у крыс разного возраста после легкой гипотермии, индуцированной холодовым воздействием. В работе изучены цитологические показатели способности стромальных клеток костного мозга формировать колонии при культивировании – количество и площадь клеточных колоний, морфологическая характеристика состояния культивированных клеток. Костный мозг белых крыс 6- и 24-месячного возраста выделяли из бедренных и большеберцовых костей на 7 и 28 сутки после индуцированной легкой гипотермии (животные 5 суток находились в холодной камере при температуре -20°C по 5 часов в сутки). Клетки костного мозга высевали в пластиковые флаконы (*Falcon*) из расчета $1,5 \times 10^6$ клеток на 1 см^2 и культивировали в течение 12 суток. Питательную среду меняли каждые трое суток. После культивирования клетки промывали, фиксировали и окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Установлено, что гипотермия угнетает пролиферативную активность культивируемых клеток и их способность образовывать колонии. В культурах клеток, полученных у молодых животных на 7 сутки после гипотермии, установлены меньшие по сравнению с контролем показатели количества и площади образованных колоний. По периферии колоний выявлены клетки с деструктивными изменениями (вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядра). В опытных культурах клеток крыс старческого возраста формирование колоний не зафиксировано (клетки расположены одиночно или небольшими кластерами). На 28 сутки после гипотермии разница по исследуемым показателям между опытными и контрольными культурами клеток и молодых, и старых животных уменьшилась по сравнению с 7 сутками. Это свидетельствует о восстановительных процессах, протекающих в костном мозге после гипотермии, но у животных старческого возраста они менее выражены, так как и на этот срок в опытных культурах клеток старых крыс показатели количества и площади образованных колоний были самые низкие.

Ключевые слова: культура клеток, костный мозг, клеточные колонии, гипотермия, крысы.

Автор, відповідальний за листування: * s_malysh@ukr.net



Вступ

Проблема гіпотермії охоплює широке коло теоретичних та практичних питань у галузі біології та медицини. Надмірний холодний вплив за природних умов та професійно обумовлений зв'язок людини з низькотемпературним чинником можуть призвести до гіпотермії організму, внаслідок якої спостерігаються структурно-функціональні зміни органів та систем [1, 2, 3, 4, 5]. В літературі представлені роботи з вивчення впливу гіпотермії на кісткову тканину, яка є фізіологічно динамічною та чутливою до негативних чинників і тісно пов'язана з іншими системами організму [6, 7, 8]. Так, в експерименті на щурах встановлено, що легка гіпотермія (зниження температури тіла на 2-4 °С) викликає виражені деструктивні зміни в клітинах та матриці кісткової тканини, які пов'язані з пікнозом остеоцитів, розширенням лакун остеоцитів, деструкцією кровоносних судин та їхнім «запустінням», збільшенням на кісткових трабекулах кількості порожнин резорбції, зайнятих остеобластами [9]. Кістковий мозок (КМ) містить стромальні клітини (ССК) або за іншою назвою мезенхімальні стромальні клітини (МСК), які здатні диференціюватися в остеогенному напрямку, і тому їхня кількість та структурно-функціональний стан важливі для ремоделювання та регенерації кістки [10, 11]. Морфологічно ССК КМ – це фібробластоподібні веретеновидні клітини, які знаходяться в G₀-фазі клітинного циклу та складають мітотичний резерв сполучної тканини, що мобілізується для фізіологічної та репаративної регенерації. За даними літератури відомо, що ССК надзвичайно чутливі до дії несприятливих зовнішніх та внутрішніх чинників [12, 13], а їхня кількість і здатність утворювати клітинні колонії *in vitro* змінюються з віком та за умов розвитку деструктивних змін у кістках [14, 15, 16, 17]. Досліджень щодо впливу гіпотермії на ССК КМ у літературі ми не знайшли.

Виконане дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Вивчити ремоделювання кісткової тканини тіл хребців та структурну організацію міжхребцевих дисків в умовах остеопорозу, обтяженого дією несприятливих екологічних чинників» (номер державної реєстрації 0114U003015), яка виконується в ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України».

Мета дослідження: дослідити *in vitro* колонеутворювальну здатність стромальних клітин

кісткового мозку у щурів різного віку після легкої гіпотермії, індукованої холодним впливом.

Матеріали та методи дослідження.

В експерименті використано 20 нелінійних білих щурів-самців. Тварин дослідних груп (10 щурів) 6- та 24-місячного віку піддавали впливу холоду шляхом їх утримання впродовж 5 діб в окремих секціях холодової камери при температурі -20°C щодобово по 5 годин (з 10⁰⁰ до 15⁰⁰). Решту часу доби впродовж експерименту та після його завершення тварини дослідних груп, як і щури відповідних контрольних груп (10 тварин), знаходились при температурі 18-22°C, вологості 50-60 % та природному світловому режимі «день-ніч». Температуру тіла щурів вимірювали ректально за допомогою медичного електронного термометра МТ-3001 кожні п'ять діб експерименту (до початку холодового впливу та через 5 годин впливу). В нормі у щурів температура тіла становить 38,5-39,5 °С. Наприкінці експерименту через 5 діб у молодих щурів (6-місячного віку) температура тіла знизилась на 2,29 °С, у щурів старечого віку (24 місяці) – на 4,04 °С порівняно з початком експерименту. Зафіксоване зниження температури тіла щурів після впливу холоду свідчить про розвиток стану легкої гіпотермії (за класифікацією J.S. Tuli, R.C. Gilbert [18]) у тварин обох вікових груп. Під час перебування у холодовій камері тварини виглядали змерзлими, але не були у критичному стані. Після покидання холодової камери вони швидко відновлювали рухову та пошукову активність. Евтаназію тварин виконували шляхом внутрішньочеревного введення тіопенталу натрію (90 мг/кг) на 7 та 28 добу після завершення 5-добового холодового впливу. Експеримент проведено з дотримання вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.). План експериментальних досліджень та відповідність їх проведення сучасним вимогам біоетики ухвалені позитивним рішенням локального Комітету з біоетики (протоколи № 88 від 30.05.2011 р., № 131 від 16.06.2014 р.).

Дослідження *in vitro* виконані в культурі клітин КМ, які попередньо за допомогою шприца вимивали розчином Хенкса із кістковомозкового каналу стегнових та великомілкових кісток



після відділення їхніх епіфізів. Клітини КМ осаджали шляхом центрифугування (1000 об/хв, 10 хв), потім осад відмивали у розчині Хенкса, повторно центрифугували та ресуспендували у середовищі *DMEM (Sigma)* з додаванням 20 % сироватки крові ембріонів телят (*Sigma*) до отримання клітинної суспензії. Висівали клітини в пластикові флакони для культивування адгезивних культур (*Falcon*) із розрахунку $1,5 \times 10^6$ клітин на 1 cm^2 та культивували клітини дослідних та контрольних культур в однакових умовах (температура 37°C , газова суміш із 5 % вмістом CO_2 , вологість 95 %) з додаванням до поживного середовища 2 мМ L-глутаміну, 20 % сироватки крові ембріонів телят, а також 100 од/мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину). Через 24 години культивування середовище з неприкріпленими клітинами зливали та промивали культуральний флакон тричі розчином Хенкса. У флакон з прикріпленими клітинами додавали свіжоприготовлене середовище для культивування та продовжували культивувати до 12 доби. Поживне середовище змінювали кожні 3 доби. На 12 добу поживне середовище зливали, клітини промивали фосфатним буфером, фіксували фіксатором Май-Грюнвальда та забарвлювали азур-еозином за Романовським [19]. Культури клітин досліджували у світлово-

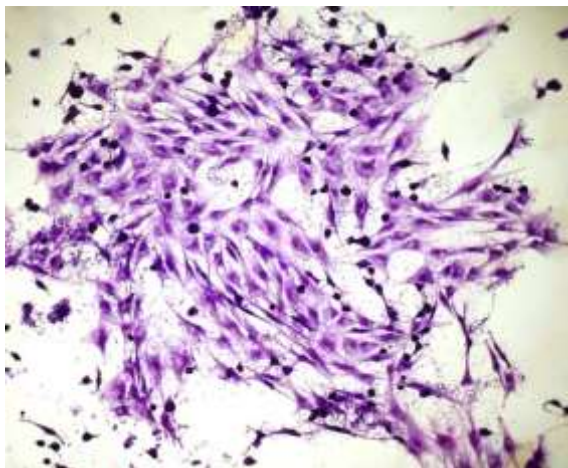
му мікроскопі *Olympus CX41RF (Японія)* та оцінювали такі показники:

- 1) цитологічна характеристика (стан) клітин;
- 2) кількість клітинних колоній у препараті. Підраховували крупні колонії (не менше 15 клітин у колонії);
- 3) площа колоній (mm^2). Вимірювали діаметри колоній та розраховували за формулою площі круга.

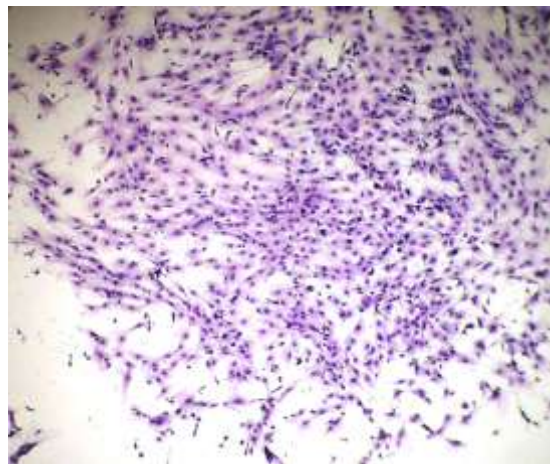
Отримані цифрові показники були опрацьовані методами варіаційної статистики. Відмінності даних між парними вибірками оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати вважали статистично значущими за умови, що $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

7 днів після гіпотермії. В дослідних та контрольних культурах стромальних клітин (СК) КМ *молодих щурів* спостерігаються клітинні колонії з різною кількістю клітин в них. Клітини в колоніях мають витягнуту форму (палочковидну, веретеновидну, подекуди, трикутну) та декілька цитоплазматичних відростків, за допомогою яких вони контактують між собою. Клітини в культурах містять гомогенну цитоплазму та крупне ядро зі щільними ядерцями. Між колоніями виявлені фібробластоподібні клітини витягнутої форми з довгими відростками.



Малюнок 1. Клітинна колонія в культурі стромальних клітин кісткового мозку, отриманих на 7 добу після холодового впливу у молодих щурів (дослідна група). Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 200$.



Малюнок 2. Ділянка клітинної колонії в культурі стромальних клітин кісткового мозку, отриманих на 7 добу після експерименту у молодих щурів (контрольна група). Забарвлення за Романовським. Зб. $\times 100$.

У дослідних культурах клітини в колоніях розташовані пухко, формуючи переважно од-

ношарові колонії (мал. 1). На периферії колоній в окремих клітинах зафіксовані деструктивні

зміни – вакуолізація цитоплазми, пікноз ядра. На поверхні культурального флакону налічено $9,3 \pm 0,8$ клітинних колоній, площа яких дорівнює $2,27 \pm 0,25$ мм².

У контрольних культурах щільність клітин у колоніях висока, часто клітини «наповзають» одна на одну і межі окремих клітин не завжди можна чітко визначати, тобто має місце формування багаточарових колоній (мал. 2). На

відміну від дослідних культур у контрольних культурах молодих щурів налічено $14,2 \pm 1,3$ колоній, що на 34,5 % більше. Виявлені відмінності й у розмірах площ колоній, які залежать від кількості клітин в них. Так, у контрольних культурах площа колоній дорівнює $3,79 \pm 0,29$ мм², що на 40,1 % більше, ніж у дослідних культурах (таблиця).

Таблиця

Кількісні показники колонієутворювальної здатності стромальних клітин кісткового мозку у щурів різного віку після холодового впливу

Вік щурів	Група щурів	Кількість колоній		Площа колоній (мм ²)	
		7 діб	28 діб	7 діб	28 діб
6 місяців	Дослід	$9,30 \pm 0,80$ ^{1), 3)}	$12,40 \pm 1,02$ ^{2), 3)}	$2,27 \pm 0,25$ ^{1), 3)}	$3,38 \pm 0,32$ ^{2), 3)}
	Контроль	$14,20 \pm 1,30$ ³⁾	$13,90 \pm 1,20$	$3,79 \pm 0,29$ ³⁾	$3,84 \pm 0,39$ ³⁾
24 місяці	Дослід	0 ^{1), 2)}	$8,25 \pm 0,86$	0 ^{1), 2)}	$1,88 \pm 0,15$
	Контроль	$7,92 \pm 0,72$	$10,20 \pm 1,10$	$1,76 \pm 0,13$	$2,47 \pm 0,21$ ²⁾

Примітки: ¹⁾ $P < 0,05$ порівняно з контрольним показником; ²⁾ $P < 0,05$ порівняно з показником на 7 добу; ³⁾ $P < 0,05$ порівняно з показником у 24-місячних щурів

Одержані результати свідчать про негативний вплив гіпотермії на стан та колонієутворювальну здатність СК КМ. За даними літератури відомо, що дія й інших несприятливих факторів на організм може викликати порушення структурної організації СК КМ та їх проліферативної активності. Так, в СК КМ щурів, які впродовж 28 діб перебували в умовах гіподинамії, виявлені виражені ультраструктурні зміни – конденсація хроматину ядра в одних ділянках та деконденсація в інших, деструкція мембран, вихід хроматинових фібрил у цитоплазму та ін. [13]. В іншому дослідженні встановлено, що в культурі клітин КМ щурів після дії на організм експериментальної гіподинамії впродовж 28 діб кількість клітинних колоній та кількість фіброblastів у колоніях були статистично менше, ніж у культурі клітин КМ тварин контрольної групи [14].

В дослідних культурах СК КМ *старих щурів* виявлені лише поодинокі клітини та невеликі кластери клітин. Серед фіброblastоподібних клітин, які переважають у кластерах, розташовані й округлі клітини. Такі клітини спостерігають у первинних культурах СК КМ. Вони характеризуються низькою адгезією до пластика.

В контрольних культурах клітин виявлені малочислені, невеликі за розмірами, переважно одношарові клітинні колонії. Порівняно з контрольними культурами молодих щурів кількість

колоній ($7,92 \pm 0,72$) в них менша на 53,6 % та на 44,2 % менша площа колоній ($1,76 \pm 0,13$ мм²). На поверхні культурального флакону за межами колоній спостерігаються численні фіброblastоподібні клітини, розташовані поодинокі. У більшості клітин виявлені деструктивні зміни – вакуолізація цитоплазми та пікноз ядра.

Отримані дані вказують, що на здатність формувати клітинні колонії в культурі СК КМ впливає як холодова дія, так і вік тварин. Наші результати узгоджуються з даними літератури, що з віком кількість СК КМ у людини та тварин зменшується [14, 20]. Найбільша кількість стромальних колонієутворювальних клітин у КМ щурів спостерігається в 5-місячному віці [14]. З віком знижується і колонієутворювальна здатність СК КМ [21]. Показники ефективності клонування та кількості стромальних колонієутворювальних клітин значно зменшуються у щурів до 24 місяців [15]. Зниження проліферативної активності та здатності до диференціювання в остеогенному напрямку СК КМ *in vitro* виявлено у хворих на остеопороз [16, 22].

28 діб після гіпотермії. У молодих щурів зафіксовано збільшення на 25 % кількості клітинних колоній у дослідних культурах СК КМ ($12,4 \pm 1,02$) при порівнянні з показниками, визначеними на 7 добу після холодового впливу. Їхня кількість статистично незначуще відрізняється від числа колоній у контрольних культу-



рах (13,9±1,2). Встановлено підвищення і кількості клітин у колоніях, що позначилося на показниках їх площі. Так, площа колоній у дослідних культурах становить 3,38±0,32 мм², що перевищує на 32,8 % показник у дослідних культурах на 7 добу після гіпотермії та статистично незначуще відрізняється від показника на 28 добу в контрольних культурах (див. таблицю). Звертає увагу і зниження кількості клітин з деструктивними змінами у дослідних культурах.

На відміну від 7 доби у дослідних культурах СК КМ старих щурів на 28 добу виявлені невеликі клітинні колонії. Їхня кількість (8,25±0,86) статистично не відрізняється від показника в контрольних культурах старих тварин, але на 30,6 % нижча, ніж у дослідних культурах молодих тварин. Також менша на 44,4 % і площа утворених колоній (1,88±0,15 мм²) порівняно з дослідними культурами молодих тварин та на

23,9 % менша порівняно з контрольними культурами старих тварин (2,47±0,21 мм²).

В контрольних культурах клітин кількість колоній (10,2±1,1) була меншою на 26,6 %, а їхня площа – на 35,7 % за відповідні показники контрольних культур молодих тварин.

Необхідно звернути увагу, якщо через 7 діб після холодового впливу в культурах СК КМ старих тварин, ми не виявили крупних клітинних колоній (лише кластери), то через 28 діб такі колонії присутні, що вказує на відновні процеси, які перебігають у КМ щурів після гіпотермії. Проте показники кількості клітинних колоній та їхньої площі в культурах СК старих тварин дослідної групи на відміну від культур молодих щурів достовірно нижчі, що вказує на менш активний перебіг відновних процесів у старих щурів.

Висновки

Гіпотермія, що спричинена перебуванням щурів впродовж 5 діб у холодовій камері (–20 °С) по 5 годин щодобово, негативно впливає на стан стромальних клітин кісткового мозку: пригнічує їхню проліферативну активність та здатність утворювати *in vitro* клітинні колонії, викликає порушення структурної організації культивованих клітин. Так, у культурах клітин, отриманих у молодих тварин на 7 добу після гіпотермії, встановлені менші показники кількості та площі утворених колоній, ніж у контрольних культурах. По периферії колоній виявлені клітини з деструктивними змінами (вакуолізація цитоплазми, пікноз ядра). Більш вираженим

негативний вплив гіпотермії виявився в культурі клітин кісткового мозку щурів старечого віку, при чому в ній не зафіксовано формування колоній (клітини розташовані поодинокі або невеликими кластерами). На 28 добу після гіпотермії різниця за досліджуваними показниками між дослідними та контрольними культурами клітин і молодих, і старих тварин скоротилась у порівнянні з 7 добою. Це свідчить про відновні процеси, які перебігають у кістковому мозку після гіпотермії, але у тварин старечого віку вони менш виражені, бо і на цей термін у дослідних культурах клітин старих щурів показники кількості та площі утворених колоній були найменші.

References (список літератури)

1. Babiichuk VG. [Quantitative estimation of antigen-specific cells in human blood after rhythmic cold effect]. *Ukr. Problems of Cryobiology*. 2009; 19(2): 143-153.
2. Kolinko YaO. [Condition of conductor system and microcirculation of rat sciatic nerve on the seventh day after the general deep hypothermia]. *Ukrainskyi morfolohichnyi almanakh*. 2010; 8(2): 91-94.
3. Baylor K, Stecker MM. Peripheral nerve at extreme low temperatures 2: pharmacologic modulation of temperature effect. *Cryobiology*. 2009; 59(1): 12-18. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.01.006
4. Bennet L, Roelfsema V, George S, Dean JM, Emerald BS, Gunn AJ. The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep. *J. Physiol.* 2007; 578(2): 491-506. doi: 10.1113/jphysiol.2006.119602
5. Duebener LF, Hagino I, Sakamoto T, Mime LB, Stamm C, Zurakowski D, Schäfers H-J, Jonas RA. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat. *Circulation*. 2002; 106(12 Suppl.1): I103-108. doi: 10.1161/01.cir.0000032916.33237.a9
6. Rodionova NV. *Tsytolohichni mekhanizmy perebudov u kistkakh pry hipokinezii ta mikrohravitatsii* [Cytological mechanisms of rebuilding in the bones under hypokinesia and



- microgravity]. Kyiv: Naukova Dumka Publ., 2006. 240 p. (In Ukrainian).
7. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R. Bone biology. *J. Bone Joint Surg.* 1995; 77-A(8): 1256-1275.
 8. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 455-498. doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721
 9. Poshelok DM, Malyshkina SV. [Structural organization of compact bone after general hypothermia]. *Ukr. Tavricheskiy mediko-biologicheskiiy vestnik.* 2013; 16(1 Pt 1): 197-201.
 10. Gololobov VG, Deev RV. [Stromal stem cells and osteoblastic cellular differon]. *Rus. Morphology.* 2003; 123(1): 9-19.
 11. Deev RV, Tsupkina NV, Gololobov VG, Nikolaenko NS, Ivanov DYe, Dulaev AK, Pinaev GP. [The influence of transplanted culture of bone marrow stromal cells on reparative osteohistogenesis in parietal bone defect]. *Rus. Cytology.* 2008; 50(4): 293-301.
 12. Shalimov VA. *Nekotorie osobennosti mezhkletochnykh tsitoplazmo-tsitoplazmaticheskikh, yadernotsitoplazmaticheskikh i yaderno-yadernykh soedinenii v kostnom mozge kontrolnykh kryss, podvergaiushchikhsia vozdeystviu hipodinamii* [Some features of cell-cell cytoplasm, cytoplasmic, nuclear-cytoplasmic and nuclear-nuclear compounds in bone marrow control rats exposed to hypodynamia]. Kiev: Znanie Ukrainy Publ., 2004. 28 p. (In Russian).
 13. Rodionova NV, Bogdanovich LV. [In vitro marrow stromal cells colonies after modeled hypokinesia in rats]. *Ukrainskiy morfologichnyi almanakh.* 2005; 1: 53-55.
 14. Gorskaya YuF, Latsinik NV, Shuklina YeYu, Nesterenko VG. [Age changes in the population of stromal osteoprogenitor cells]. *Russ. J. Immunol.* 2000; 5(2): 149-155.
 15. Lebedinskaya OV, Gorskaya YuF, Shuklina YeYu, Latsinik NV, Nesterenko VG. [Age changes in the numbers of stromal precursor cells in the bone marrow of animals]. *Rus. Morphology.* 2004; 126(6): 46-49.
 16. Kovalenko VN, Lysenko IV, Panchenko LM. [Culture of stem stromal marrow cells as a model for the study of direct influence of pharmacological medicines at osteoarthritis]. *Ukrainskiy revmatologichnyi zhurnal.* 2006; 25(3): 45-48.
 17. Gayko HV, Podgaetskiy VM, Sulima AN, Osadchuk TI. [Effect of different types of cementless prosthesis covering on activity of stem bone marrow stromal cells in patients with osteoarthritis of the hip]. *Kz. Traumatology and orthopedics.* 2014; 3-4: 178-179. (In Russian).
 18. Tuli JS, Gilbert RC. *Hypothermia in animals.* Retrieved from: <http://www.hypothermia.org/animalhypo.htm>
 19. Shchhehelska OA., Mykulynskiy YuYu, Omelchenko OA, Kulshyn VYe, Khvysuk OM, Demyn YuA, Popsuishapka OK, Mamontov IM. *Tekhnologii vydilennia klityn stormy kistkovoho mozku liudyny, rozmnozhenia in vitro ta induktsiia v nervovi klityny ta osteoblasty* [The technologies of the selection of human stromal bone marrow cells, reproduction in vitro and induction in nerve cells and osteoblasts]. Guidelines. Kharkiv, 2004. 16 p. (In Ukrainian).
 20. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 1999; 14(7): 1115-1122. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1115
 21. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J. Bone Miner. Metab.* 1999; 17(3): 171-177. doi: 10.1007/s007740050081
 22. Ilyina VK, Prokhorova YeV. [Cellular genetic characteristics of bone marrow stromal cells in various forms of osteoporosis]. *Proceedings of the 3d Russian Symposium on Osteoporosis.* St.Petersburg, 2000, p. 65. (In Russian).

(received 19.09.2015, published online 30.09.2015)

(отримано 19.09.2015, опубліковано 30.09.2015)

