

гемолиз нарастает со временем слабо. В средах, содержащих 0,15, 0,25 и 0,85 моль/л NaCl, это время составляет 3 сут, в средах с концентрацией 0,45 и 1 моль/л NaCl – 2 сут. Далее наблюдается прогрессирующее увеличение степени гемолиза. В среде с концентрацией NaCl 2 и 4 моль/л гемолиз эритроцитов наблюдается сразу после помещения клеток в среду инкубирования. В первом случае он составляет 5%, а во втором – 40%. Далее в процессе инкубации до 5 сут гемолиз увеличивается во всех образцах. Действие озона на гемолиз эритроцитов сильно зависит как от дозы озона, так и от осмолярности среды инкубирования. В средах с концентрацией NaCl 0,15 и 0,25 моль/л дозы озона 0,16 и 0,32 мг/л вызывают замедление гемолиза, а доза озона 0,48 мг/л приводит к увеличению гемолиза непосредственно после помещения клеток в среду инкубирования. В средах с концентрацией NaCl 0,45 и 0,85 моль/л гемолиз еще в большей степени снижается при дозе озона 0,16 мг/л. При использовании озона в дозе 0,48 мг/л, как и в предыдущих опытах, происходит сильное возрастание гемолиза. После замораживания-оттаивания эритроцитов в дозе 0,16 мг/л способствует замедлению гемолиза.

Экспериментально обнаруженное повышение устойчивости эритроцитов к гиперосмотическому лизису под действием малых доз озона может представлять интерес при разработке протоколов криоконсервирования эритроцитов.

days and 2 days in those with 0.54 and 1 mol/l NaCl. Further a progressing increase in hemolysis extent is observed. In the medium with 2 and 4 mol/l NaCl concentration erythrocyte hemolysis is observed right after cell placing into incubation medium. In first case it makes 5% and 40% for second one. Then during incubation up to 5 days hemolysis increases in all samples. Ozone effect on erythrocyte hemolysis strongly depends on both ozone dose and osmolarity of incubation medium. In media with 0.15 and 0.25 mol/l NaCl concentrations the ozone doses of 0.16 and 0.32 mg/l cause hemolysis inhibition but ozone dose of 0.48 mg/l results in hemolysis augmentation since cells placing into incubation medium. In the media with 0.45 and 0.85 mol/l NaCl concentration hemolysis reduces in much greater extent at ozone dose of 0.16 mg/l. When using ozone in 0.48 mg/l dose as in previous trials, a strong hemolysis augmentation occurs. After erythrocyte freeze-thawing ozone in 0.16 ml/l dose contributes to hemolysis inhibition.

Experimentally revealed increase in erythrocyte resistance against hyperosmotic lysis under the effect of low ozone doses can be of interest when developing protocols for erythrocyte cryopreservation.

Жизнеспособность различных фракций суспензии клеток семенников при инкубации в растворах ДМСО

А.В. ПАХОМОВ, Г.А. БОЖОК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Viability of Different Fractions of Testicular Cell Suspension at Incubation in DMSO Solutions

A.V. PAKHOMOV, G.A. BOZHOK

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

В связи с широким распространением в медицине методов коррекции иммуноэндокринного статуса организма, связанных с введением в организм клеток или фрагментов ткани эндокринных желез, клеток иммунной системы, паренхиматозных органов, эмбриональных или фетальных тканей, возникает проблема хранения донорских тканей и их тестирования на совместимость и стерильность. На основе методов криоконсервирования возможно создание банков культур для длительного хранения материалов. Возникает вопрос о применении различного материала после обработки криопротекторами и замораживания-отогрева, так как, вероятно, снижение жизнеспособности, функциональной активности фрагментов ткани или препаратов, содержащих несколько типов клеток.

Цель работы – исследование влияния на жизнеспособность клеток семенников взрослых крыс (СВК) растворов диметилсульфоксида (ДМСО) разной концентрации.

После коллагенизации и трипсинизации фрагментов СВК полученную клеточную суспензию разделяли в ступенчатом сахарозном градиенте. Полученные и отмывые фракции клеток помещали на час в среду RPMI

As the methods for an organism's immune-endocrine status correction, related to introduction into an organism of endocrine gland cells or tissue fragments, immune system cells, parenchymatic organs, embryonic or fetal tissues are widely spread in medicine, the problem for donor's tissues storing and their testing for compatibility and sterility arises. Basing on cryopreservation methods it is possible to establish banks for long-term material storage. The question about applying different materials after treating with cryoprotectants and freeze-thawing appears, because there is a probable decrease in viability, functional activity of tissue fragments or preparations, containing many types of cells.

The work was aimed to investigate the effect of dimethyl sulfoxide solutions of various concentrations on cell viability of testes of adult rats (TAR).

After TAR fragment collagenisation and trypsinization the obtained cell suspension was separated in a step sucrose gradient. The procured and washed-out cell fractions were placed for an hour in RPMI medium with 10% cattle serum, containing 5, 10 and 15% DMSO concentration. Incubation with solutions was performed at 2°C. Cell incubation in RPMI medium was also done for an hour at 37°C to study distant

с 10%-й сывороткой крупного рогатого скота, содержащей 5, 10 и 15%-ю концентрацию ДМСО. Инкубацию с растворами проводили при 2°C. Для исследования отдалённых эффектов криопротектора после отмывки от ДМСО также была проведена инкубация клеток в среде RPMI в течение часа при 37°C. Жизнеспособность определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим до инкубации (первый этап), после отмывки от криопротектора (второй этап), а также после инкубации при 37°C (третий этап). При определении жизнеспособности за 100% принимали количество клеток до инкубации с ДМСО.

При разделении в градиенте плотности были получены три фракции клеток: А, В, С (по возрастанию значения плотности), которые различались по своей способности переносить присутствие ДМСО. Так, клетки фракций А и С наиболее чувствительны к инкубации и присутствию ДМСО. Жизнеспособность снижалась при повышении концентрации ДМСО (с 26 до 13% и с 36 до 27% соответственно), особенно на дальнейших этапах (с 19 до 10% и с 19 до 7%). Фракция В наиболее устойчива к инкубации и не восприимчива к ДМСО при данных условиях. В ней наблюдали наибольшую жизнеспособность клеток по сравнению с первыми двумя фракциями, которая не зависела от концентраций ДМСО в данных условиях. Жизнеспособность составила приблизительно 50% на втором этапе (после инкубации с ДМСО) и 28% на третьем этапе. Следует отметить, что содержание клеток в этой фракции на первом этапе наибольшее из трех групп ($3,72 \times 10^7$ кл/мл), т.е. процент живых клеток при данных условиях не зависел от количества клеток в пробе.

На основании приведенных данных можно сделать вывод о разной чувствительности фракций клеток СВК к ДМСО. Криопротектор практически не влиял на выживаемость клеток фракции В, но резко снижал жизнеспособность клеток фракций А и С, причем эффект увеличивался с повышением концентраций ДМСО, а также проявлялся на более поздних этапах и выражался в увеличении скорости гибели клеток в ходе дальнейшего культивирования в среде RPMI при температуре 37°C.

effects of cryoprotectant after washing-out of DMSO. Viability was measured using method of supravital staining with trypane blue prior to incubation (first stage), after washing-out of cryoprotectant (second stage), as well as after incubation at 37°C (third one). Cell amount before incubation with DMSO was accepted for 100% during viability determination.

Three cell fractions were obtained in density gradient during separation: A, B and C (according to increase in density value), differing by the capability to endure DMSO presence. Thus, cells of A and C fractions are the most sensitive to incubation and DMSO presence. Their viability reduced with DMSO concentration increase (from 26 to 13% and from 36 to 27%, correspondingly), especially at further stages (from 19 to 10% and from 19 to 7%). The fraction B is the most resistant to incubation and is not DMSO susceptible under these conditions. The highest cell viability in comparison with the first two fractions, not depending on DMSO concentrations under such conditions, was observed in it. Viability was approximately 50% at the second stage (after incubation with DMSO) and 28% at the third one. Of note is that cellularity in this fraction at the first stage was the highest among three groups (3.72×10^7 cells/ml), i.e. the percentage of living cells under these conditions did not depend on cell amount in a sample.

Basing on the data shown, we can conclude about different sensitivity of TAR cells to DMSO. Cryoprotectant did not practically affect the cell survival of B fraction, but sharply reduced cell viability of A and C ones, moreover the effect increased with augmenting DMSO concentrations, as well as it manifested at later stages and was presented in an increase of cell death rate during

Порівняльна характеристика антирадикальних властивостей криопротекторів у системах: модельній та "тромбоцити-плазма"

О.В. Книш, С.Є. Овсянников, А.М. Компанієць

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Comparative Characteristics of Antiradical Properties of Cryoprotectants in Model and Platelets-Plasma Systems

O.V. KNYSH, S.YE. OVSYANNIKOV, A.M. KOMPANIETS

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

Наявність активних медіаторів кисню (АМК) в біологічних об'єктах – невідмінна умова аеробної форми життя. Однак підвищення рівня АМК під дією чинників різної природи, в тому числі і температурного, призводить до активації ланцюгових реакцій вільнорадикального окислення ліпідів, що може викликати пошкодження та загибель клітин. Відомо, що даний процес має місце під час заморожування-відігрівання клітин і тканин.

Presence of oxygen active mediators (OAM) in biological objects is mandatory condition of aerobe life form. However rise in OAM level under the indices of different origin including temperature results to activation of chain reaction of free radical lipid oxidation, that may cause cell damage and death. It is known that this process takes place during freeze-thawing of cells and tissues.

In this connection there were multiple attempts to diminish an intensity of this process by introduction of