

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. Пролиферация 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 euchromatization 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).

оксиэтильными производными глицерина (ОЭГ) n=25 и n=30.

Объектом исследования служили эритроциты человека, выделенные из консервированной крови, заготовленной на консерванте "Глюглицир" и хранившейся не более 2-х суток при температуре 4°C в холодильнике.

Исследуемые растворы, приготовленные на 0,9%-м растворе NaCl в концентрациях 20, 30 и 40%, соединяли с эритроцитами и замораживали в металлических контейнерах объемом 2 мл погружением в жидкий азот. Отогревали на водяной бане при температуре 40 и 50° С.

Степень сохранности эритроцитов после замораживания-оттаивания оценивали по показателям гематокрита (общий объем клеток, %), осмотической хрупкости в 0,6 и 0,9%-х растворах NaCl, проценту гемолиза относительно 100%-го гемолиза.

Установлено, что исследуемые соединения обладают низкой цитотоксичностью и высокой криозащитной активностью в отношении эритроцитов человека. После 30-60 мин экспозиции эритроциты с растворами криопротекторов показатели, характеризующие степень сохранности эритроцитов, соответствовали уровню контроля (показатели для свежесделанных клеток). Определены оптимальные условия криоконсервирования эритроцитов с ОЭГ n=25, обеспечивающие достаточно высокий уровень сохранности общего количества клеток (величина гемолиза соответствовала 1,6-2,1%, осмотической хрупкости в 0,6%-м растворе NaCl – 7-12%, гематокрита – 23-28%).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о перспективности использования оксиэтильных производных глицерина со степенью полимеризации n=25 и n=30 для низкотемпературного консервирования эритроцитов.

The research objects were human erythrocytes derived from cryopreserved blood procured with "Glugicyr" preservative and stored not more than 48 hrs in a refrigerator at 4°C.

Solutions under study prepared with 0.9% NaCl under 20, 30 and 40% concentrations were added with erythrocytes and frozen in 2ml metal containers by plunging into liquid nitrogen. They were thawed on water bath at 40 and 50°C.

Erythrocytes integrity degree after freeze-thawing was assessed on indices of osmotic fragility in 0.6 and 0.9% NaCl, hemolysis percentage in supernatant liquid after centrifugation of cells suspension in respect of complete hemolysis and hematocrit value.

It has been established that studied compounds possess a low cytotoxicity and high cryoprotective activity in respect of human erythrocytes. Following 30-60 mins' exposure of erythrocytes with cryoprotectant solutions the indices characterizing the integrity degree for erythrocytes corresponded the control level (those for freshly isolated cells). Optimal cryopreservation conditions for erythrocytes with OEG, n=26, providing quite a high level of integrity of cell (hematocrit value was 23-28%; osmotic fragility made 6.6±0.1 in 0.9% NaCl solution and in 0.6% NaCl it was 7-12%; as for hemolysis level it made 1.6-2.1%.

Thus performed studies testify to prospects of use of oxyethyl glycerol derivatives with polymerization rate n=25 and n=30 for low temperature preservation of erythrocytes.

Alamar Blue-тест как метод определения жизнеспособности клеток до и после криоконсервирования

Н.А. ГОРОХОВА, Ю.А. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Alamar Blue Test as a Method of Assessing Cells Viability Before and After Cryopreservation

N.A. GOROKHOVA, YU.A. PETRENKO

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

Выбор чувствительного, информативного и воспроизводимого метода определения жизнеспособности клеток важен как для оценки качества свежесделанного материала, так и изучения эффективности исследуемого протокола криоконсервирования. В настоящее время в криобиологических исследованиях широко используют Alamar Blue-тест на жизнеспособность. Принцип теста состоит в том, что восстановление индикатора Alamar Blue (AB), сопровождающееся его переходом в флуоресцентную форму, пропорционально активности внутриклеточных окислительно-восстановительных ферментов. Однако вопросы о природе и локализации оксидоредуктаз, участвующих в восстановлении AB, изучены недостаточно.

The successful search of sensitive, informative and reproducible method of assessing cell viability is important for the determination of freshly isolated material quality and for the estimation of the efficiency of worked out cryopreservation protocol. Alamar Blue (AB) viability assay is currently finding a great interest by the investigators in the cryobiological studies. The test is based on the reduction of the indicator AB, which results in transforming to fluorescent form and is proportional to the intracellular oxidation-reduction enzymes activity. However the questions about nature and localization of oxidoreductases taking part in the reduction of AB are not clear enough.

The purpose of this work is to study AB reduction by cells and isolated mitochondria in the presence of inhibitors