

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

Цель работы – изучить восстановление АВ клетками и изолированными митохондриями в присутствии ингибиторов различных метаболических путей, а также сравнить чувствительность АВ-теста и витального окрашивания трипановым синим при определении сохранности клеток после низкотемпературного консервирования.

В работе использовали два типа клеток, различающихся по энергетическому потенциалу: лимфоциты периферической крови и клетки эмбриональной печени (КЭП) человека. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл и содержали в условиях культивирования до 2-х суток, КЭП криоконсервировали под защитой 5%-го раствора ДМСО при наличии или отсутствии 10%-й эмбриональной сыворотки теленка. Нативные и криоконсервированные КЭП поддерживали в условиях культивирования до 7 суток. Восстановление АВ клетками определяли по флуоресценции в ходе культивирования при наличии или отсутствии дигитонина, разрушающего плазматическую мембрану ингибитора дыхательной цепи азид натрия и/или ингибитора гликолиза моноацетата (МИА). Митохондрии выделяли из печени крыс. Восстановление АВ митохондриями определяли параллельно с потреблением кислорода в присутствии субстратов I, II и IV участков дыхательной цепи. В среду культивирования и среду инкубации митохондрий добавляли АВ в концентрации 10%.

Восстановление АВ лимфоцитами периферической крови и КЭП человека было пропорционально концентрации клеток и продолжительности культивирования. Параллельно с АВ-тестом определяли жизнеспособность клеток по окрашиванию трипановым синим. Внесение дигитонина вызывало прокрашивание клеток трипановым синим и полностью ингибировало восстановление АВ. Ингибитор дыхательной цепи азид натрия в 4 раза снижал восстановление АВ лимфоцитами и в 1,6 раз – КЭП. Эти различия, очевидно, связаны с меньшим вкладом митохондрий в общую активность оксидоредуктаз в КЭП и большим вкладом гликолиза. Действительно, ингибитор гликолиза МИА в 7 раз снижал восстановление АВ в КЭП. Исследования на изолированных митохондриях не позволили выявить корреляцию между скоростями восстановления АВ и потребления кислорода в различных метаболических состояниях. Ингибиторный анализ свидетельствует о способности ряда митохондриальных ферментов участвовать в восстановлении АВ. Приведенные данные показывают, что восстановление АВ является интегральным показателем метаболической активности клеток, отражающим суммарную интенсивность митохондриальных и цитоплазматических окислительно-восстановительных реакций.

Показано, что АВ-тест является чувствительным методом определения жизнеспособности клеток, подвергнутых действию факторов низкотемпературного консервирования, и может служить для скрининга программ криоконсервирования.

of different metabolic pathways and to compare sensitivity of the АВ assay and trypan blue staining for the determination of the viability of cells after low-temperature preservation.

Two types of cells different in their energetic potential: human peripheral blood lymphocytes (PBL) and fetal liver cells (FLC), were used in this study. PBL were separated in Ficoll density gradient and cultured for 2 days. FLC were cryopreserved under protection of 5% DMSO in the presence or absence of 10% fetal calf serum. Freshly isolated and cryopreserved FLC were cultured for 7 days. The reduction of АВ by cells was determined by fluorescence measurements during culture in the presence or absence of digitonin, which destroys the integrity of plasma membrane, and respiratory chain inhibitor sodium azide and/or inhibitor of glycolysis moniodacetate (MIA). The mitochondria were isolated from rat liver. The АВ reduction by mitochondria was determined in the presence of substrates of I, II and IV respiratory chain complexes. In parallel, using the same conditions, oxygen consumption was measured. The culture medium and mitochondria incubation medium were supplemented by 10% АВ.

The АВ reduction by human PBL and FLC was proportional to cells concentrations and time of culture. In parallel to АВ-test trypan blue cell viability assessment method was carried out. The addition of digitonin to culture medium caused the staining of all cells by trypan blue and almost completely inhibited the АВ reduction. The respiratory chain inhibitor sodium azide decreased 4 times the АВ reduction by PBL and by FLC 1.6 times. Apparently, this differences are associated with larger contribution of glycolytic enzymes into total oxidoreductases activity in FLC. Indeed, the inhibitor of glycolysis MIA decreased 7 times the АВ reduction by FLC. Correlation between АВ reduction and oxygen consumption rates in different metabolic states was not observed in the study carried out in isolated mitochondria. Inhibitory analysis shows a capability of some mitochondrial enzymes to take part in АВ reduction.

The obtained data demonstrate that АВ reduction is an integral indicator of cell metabolic activity reflecting total intensity of mitochondrial and cytoplasmic oxidation-reduction reactions.

It was shown that АВ assay was sensitive assesment method for determination of viability of cells after impact of low-temperature preservation factors and, so, could be used for screening of cryopreservation programs.