

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

У зв'язку з цим робились неодноразові спроби зменшити інтенсивність цього процесу введенням до середовища кріоконсервування антиоксидантів різного походження (токоферолі, іонол, відновлений глутатіон та інш.). У науковій літературі є відомості про те, що більшості класичних кріопротекторів притаманна певна антиоксидантна активність. Тому при розробці нових кріозахисних середовищ перш, ніж використовувати відомі антиоксиданти, слід вивчити антирадикальну активність кріопротекторів.

Нами було проведено дослідження впливу інтра- та екстрацелюлярних кріопротекторів на рівень спонтанного та індукованого іонами заліза перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у системі "тромбоцити-плазма", їх спроможності до перехоплення гідроксильного радикала у модельній системі його генерації (деоксирибоза- H_2O_2 - $FeCl_3$). Інтенсивність ПОЛ вивчали по вмісту гідроперекисів ліпідів та швидкості накопичення ТБК-активних продуктів у реакційному середовищі (трис- HCl -буфер, рН 7,4 – іони заліза) протягом години спектrophотометричним методом.

Встановлено, що 50%-е перехоплення гідроксильного радикала оксигілітованим гліцерином зі ступенем полімеризації 5 (ОЕГ, n=5) мало місце при концентрації 0,5 мг/мл проти 30% інгібування гліцерином. Досліджені речовини за спроможністю перехоплювати гідроксильні радикали можна розмістити у порядку зростання таким чином: гліцерин; ДМСО; ОЕГ, n=5. Поряд з цим виявлено, що вищезгадані кріопротектори суттєво не впливають на рівень вмісту гідроперекисів ліпідів у системі "тромбоцити-плазма" протягом обраного часу експозиції та жоден з кріопротекторів не запобігає підвищенню рівня ПОЛ після індукції іонами заліза. Спостерігалися відмінності у зміні розвитку реакцій ПОЛ за умов їх індукції іонами заліза в присутності різних кріопротекторів. Величини досліджуваних параметрів залежали від концентрації кріопротектора.

За результатами модельних експериментів можна припустити, що досліджені кріопротектори відносяться до "істинних" антиоксидантів, або "пасток" вільних радикалів (за сучасною класифікацією). Одержані дані дозволяють з'ясувати деякі аспекти молекулярних механізмів захисної дії кріопротекторів і можуть бути використані у розробці нових кріозахисних середовищ для консервування компонентів крові.

antioxidants of different origin (tocopherol, ionol, reduced glutathione etc.) into cryopreservation medium. There are available data in scientific literature about the fact that the majority of classic cryoprotectants has a certain antioxidant activity. Therefore when developing a new cryoprotective medium it should be reasonable to study antiradical activity of cryoprotectants first, rather than to use known antioxidants.

We have studied the effect of intra-, extracellular cryoprotectants at the level of spontaneous and induced by iron ions lipid peroxidation (LPO) in platelets-plasma system, their ability for capturing hydroxyl radical in model system of its generation (deoxyribose- H_2O_2 - $FeCl_3$). LPO intensity was studied on content of lipid hydroperoxide and rate accumulation of TBA-active products in reaction medium (tris- HCl -buffer-iron ions) during an hour with spectrophotometric method.

It was established that 50% hydroxyl radical capturing by oxyethylated glycerol with 5 polymerization degree (OEG, n=5) took place with the concentration of 0.5mg/ml versus 30% inhibition by glycerol.

Studied substances could be placed in an ascending row: glycerol; DMSO; OEG, n=5. In addition it was found that the above-mentioned cryoprotectants did not affect the level of lipid hydroperoxide content in 'platelets-plasma' system during chosen exposure time and no cryoprotectants prevented a rise of LPO level after induction by iron ion. There were the differences of development change in LPO reactions in condition of their induction by iron ions with the presence of various cryoprotectants.

Values of researched parameters were dependent on cryoprotectant concentration.

On the results of model experiments we can suppose that studied cryoprotectants are referred to 'true' antioxidants or 'traps' of free radicals (according to current classification). Obtained data enable to find out some aspects of molecular mechanisms of protective action of cryoprotectants and may be used in developing new cryoprotective media for preservation of blood components.

Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов в составе цельной кордовой крови человека

И.А. ЖЕЛТЯКОВА¹, Е.В. БРОВКО²

¹Харьковский государственный медицинский университет

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Hypothermic Storage Before and After Cryopreservation on Nucleated Component Properties as a Part of Whole Cord Blood

I.A. ZHELTYAKOVA¹, E.V. BROVKO²

¹Kharkov State Medical University

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Цель работы – изучение свойств ядерных клеток кордовой крови человека (ККЧ) в зависимости от срока гипотермического хранения до и после криоконсервирования.

The work was targeted to investigate the properties of human cord blood (HCB) nuclear cells depending on hypothermic storage term before and after cryopreservation.