

ЛГ, приводила к увеличению потребления холестерина на 8 % для нативных и 9 % для криоконсервированных органных культур семенников, а это являлось подтверждением того, что криоконсервирование сохраняет и способность эндокринного материала реагировать на стимулятор стероидогенеза, что важно для материала, используемого для трансплантации.

Литература

1. Абу Жаяб Салех, Луговой С.В., Губина Н.Ф. Влияние криоконсервирования на секрецию тестостерона органоидной культурой семенников крыс // Патогенетичні аспекти фармакологічної терапії ендокринних захворювань.– Харків, 2002.– С. 17-18.
2. Золотухина В.М., Тарасенко Н.Е. Нові пропозиції негормональної корекції порушеного сперматогенезу // Патогенетичні аспекти фармакологічної терапії ендокринних захворювань.– Харків, 2002.– С.46.
3. Лучицький С.Б., Кобяков С.К., Зубкова Г.А. та ін. Імуногенність та функціональна активність органоїдної ксенокультури сім'яників // Трансплантологія.– 2000. – Т.1, № 1.– С. 159-160.

Поступило 2.04.2002

cholesterol level in the media, containing native cultures, were more manifested. However to the 150th min the cryopreserved organ cultures begin to slightly outstrip of the native ones, i.e. they process the greater number of cholesterol for the same time period. This is possibly stipulated by the fact, that at the initial stages, when the cells after thawing had a reduced volume, the reparative processes, orientated to the volume recovery, occurred in them. When reaching a certain volume there was the triggering of the processes, related to the direct realisation of functional peculiarities of secreting cells. As well, apparently, as a result of a low temperature effect there were the changes, related to the higher availability of cholesterol for participation in steroidogenesis processes. Culture treatment with LH containing hypophysis extract, resulted in an increase in cholesterol consumption by 8% for native and 9% for cryopreserved testes organ cultures, that confirmed the fact, that cryopreservation preserved the capability of endocrine material to respond to steroidogenesis stimulator, that was quite important for the material used for transplantation.

References

1. Abujayyab Saleh, Lugovoj S.V., Gubina N.F. Cryopreservation effect on testosterone secretion by rat's testes organ culture // Patogenetychni aspekty farmakoterapii endokrynnykh zakhvoryuvan'.– Kharkiv, 2002.– P.17-18.
2. Zolotukhina V.M., Tarasenko N.E. New proposals of non-hormonal correction of disordered spermatogenesis // Patogenetychni aspekty farmakoterapii endokrynnykh zakhvoryuvan'.– Kharkiv, 2002.– P. 46.
3. Luchyts'ky S.B., Kobayakov S.K., Zubkova G.A. et al. Immunogenicity and functional activity of testes organ xenoculture // Transplantologiya.– 2000.– V.1, N1.– P. 159-160.

Accepted in 2.04.2002

УДК 615.361.811.013.014.413: 57.043.085.2

UDC 615.361.811.013.014.413: 57.043.085.2

Влияние гипотермического хранения эмбриональной нервной ткани крыс на жизнеспособность клеток после замораживания-отогрева

М.С. ПЛАЧИНТА, А.Н. СУКАЧ, К.В. БЕЗРУКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Hypothermic Storage of Rat's Embryonic Nerve Tissue on Cell Viability After Freeze-Thawing

PLACHINTA M.S., SUKACH A.N., BEZRUKOVA K.V.

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

Открытие стволовых клеток, которые могут воспроизводить нервную ткань, предоставило новые возможности для лечения поврежденной нервной системы. Для создания банков эмбриональных нервных клеток (ЭНК) их криоконсервируют при температуре жидкого азота. Однако криоконсервированию предшествуют процессы получения эмбрионов, выделения из них нервной ткани и ее дезагрегации на единичные клетки. Все эти процессы, как правило, проводятся в гипотермических условиях и приводят к значительному падению жизнеспособности клеток, и, следовательно, к уменьшению эффективности их трансплантации. Цель работы - изучение влияния гипотермического хранения эмбриональной нервной

Discovery of stem cells, capable of reproducing nerve tissue, provided the new opportunities for treating nervous system damages. In order to establish the banks of embryonic neuronal cells (ENCs), they are cryopreserved under liquid nitrogen temperature. However the processes of embryos obtaining, nerve tissue isolation from them and its desaggregation for single cells precede the cryopreservation. All these processes, as a rule, are carried-out under hypothermic conditions and result in a considerable decrease of viable cells, and, consequently, in a reduction in their transplantation efficiency. The aim of work was to study the effect of hypothermic storage of rat's embryonic nerve tissue on cell viability before and after freezing.

ткани крыс на жизнеспособность клеток до и после замораживания.

Нервную ткань получали из эмбрионов крыс 12-18 дней гестации и хранили в гипотермических условиях при температуре 4°C в сахарозосодержащей среде в течение фиксированных промежутков времени 0; 1 и 3 ч, после чего получали ЭНК по разработанному нами методу [1]. Количество клеток подсчитывали до и после криоконсервирования в камере Горяева. Морфометрические параметры клеток определяли при помощи микроскопа, соединенного видеокамерой с компьютером. Жизнеспособность ЭНК определяли по прокрашиванию витальным красителем трипановым синим. Клетки замораживали по оптимальной программе: быстрое экспоненциальное охлаждение с остановкой при -25°C до температуры жидкого азота (-196°C) в присутствии 10%-го ДМСО [2]. В жидком азоте пробы хранились от 3-х до 7 суток. После размораживания определяли жизнеспособность клеток и контролировали их морфометрические параметры. Размораживали клетки при температуре 40°C.

Результаты проведенных экспериментов (рисунок) указывают на то, что гипотермическое хранение ЭНК приводит к падению их жизнеспособности через 1 ч хранения на 20, через 3 ч - на 28%. Однако результаты, полученные после криоконсервирования этих клеток, указывают на более высокую криоустойчивость клеток, подвергнутых гипотермическому хранению в сравнении со свежевыделенными. Так, если замораживание-отогрев свежевыделенных ЭНК приводит к падению их жизнеспособности на 44%, то замораживание-отогрев ЭНК после 1-го часа гипотермического хранения - на 70%, а после 3-х часов хранения - на 83% по сравнению с их исходной жизнеспособностью. Данные результаты можно объяснить тем, что гипотермическое хранение приводит к накоплению в клетках нелетальных повреждений, которые реализуются в результате замораживания-отогрева, что влечет их гибель.

Проанализировав влияние замораживания-отогрева на образцы клеток с высокой (от 65 до 73 %) и низкой (от 29 до 51%) исходной жизнеспособностью, было выяснено, что у ЭНК с исходно низкой жизнеспособностью относительная криоустойчивость клеток значительно выше, чем в образцах с высокой исходной жизнеспособностью. Это можно объяснить тем, что в пробах с низкой исходной жизнеспособностью произошла селекция наиболее жизнеспособных, устойчивых к действию неблагоприятных факторов клеток.

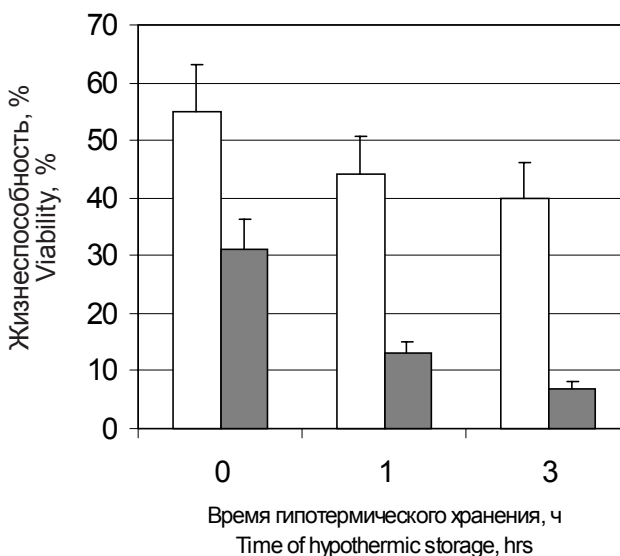
Морфометрическое исследование ЭНК показало, что в процессе гипотермического хранения средние размеры клеток уменьшались: через 1 ч хранения - до 80, а через 3 ч - до 75% от исходных. Это объясняется влиянием на клетки осмотически активного раствора сахарозы. Замораживание-отогрев ЭНК приводит к увеличению их средних размеров приблизительно до 115% от исходных, что указывает на возрастание в суспензии клеток количества повреждений плазматической мембраны.

Проведенные исследования указывают на накопление в ЭНК нелетальных повреждений в процессе

Nerve tissue was obtained from rats' embryos of the 12th-14th gestation day and stored under hypothermic conditions at 4°C temperature in a sucrose-based solution within fixed time intervals of 0; 1 and 3 hours, after that the ENC's were obtained by the developed by us method [1]. Cell number was calculated before and after cryopreservation in Goryaev's chamber. Morphometric parameters of cells were determined using the microscope, connected by video camera with computer. The ENC's viability was determined by staining with trypane blue vital dye. Cells were frozen by an optimal program: rapid exponential cooling with a stop at -25°C down to the temperature of liquid nitrogen (-196°C) at the presence of 10% DMSO [2]. Samples were stored in liquid nitrogen from 3 to 7 days. After freeze-thawing we determined cell viability and controlled their morphometrical parameters. Cells were frozen-thawed under the temperature of 40°C.

The results of the experiments conducted (Figure) point to the fact, that ENC's hypothermic storage results in a decrease of their viability in 1 hour of storage by 20, in 3 hours by 28%. However the results, obtained after these cells cryopreservation show a higher cryosensitivity of the cells, subjected to hypothermic storage in comparison with the freshly isolated ones. So, if the freeze-thawing of freshly isolated ENC's results in a reduction of their viability by 44%, then the ENC's freeze-thawing after an hour's hypothermic storage: by 70%, after 3 hours of storage: by 83% in comparison with their initial viability. These results can be explained by the fact, that hypothermic storage gives a rise to the accumulation in cells of non-lethal damages, realised as a result of freeze-thawing, that leads to their death.

After the analysis of freeze-thawing effect on cell samples with a high (from 65 to 73%) and low (from 29 to 51%) initial viability, we found out that in ENC's with initially low viability a relative cell cryoresistance was considerably higher, than in those with a high initial viability. It can be explained by the fact, that in the samples with low initial viability there was the selection of the cells, which were the most viable and resistant to the effect of unfavourable factors.



Влияние гипотермического хранения эмбриональной нервной ткани крыс на жизнеспособность ЭНК после замораживания-отогрева: □ - натив, ■ - замораживание-отогрев. Effect of hypothermic storage of rat's embryonic nerve tissue on ENC's viability after freeze-thawing: □ - native, ■ - freeze-thawing.

гипотермического хранения нервной ткани, что приводит к их гибели после замораживания-отогрева.

Литература

1. Сукач А.Н., Петренко А.Ю., Плачинта М.С. Криоконсервирование эмбриональных нервных клеток крысы с использованием ДМСО // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 61-62.
2. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Влияние замораживания-отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.– Харьков, 1990.– С. 109-114.

Поступило 16.04.2002

ENCs morphometrical study has shown, that during the process of hypothermic storage average sizes of cells reduced in such a way: in 1 hour of storage – down to 80, and in 3 hours – down to 75% of initial ones. This is explained by the effect on cells of the osmotically active sucrose solution. ENCs freeze-thawing resulted in an increase in their average sizes approximately up to 115% of initial ones, that pointed to the augmentation of a number of plasmatic membrane damages in a suspension.

The studied damages indicate the accumulation in INC of non-lethal damages during the process of nerve tissue hypothermic storage, that results in their death after freeze-thawing.

References

1. Sukach A.N., Petrenko A.Yu., Plachinta M.S. Cryopreservation of rat embryonic neuronal cells using DMSO // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P.61-62.
2. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P. Effect of freeze-thawing under dimethyl sulfoxide protection on viability of isolated rat hepatocytes // Physical and chemical properties and biological effects of cryoprotectants.– Kharkov, 1990.– P.109-114.

Accepted in 16.04.2002

УДК 577.352.465:612.111

UDC 577.352.465:612.111

Модификация транспорта ионов H^+ и связывания дипиридамола с мембранами эритроцитов крысы при гипертоническом воздействии

А.Н. БАЛАКИРЕВ, Ф. АБУ-АЛЬ АСАЛЬ, В.В. РАМАЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of H^+ Ion Transport and Binding of Dipyridamol with Membranes of Rat's Erythrocytes under Hypertonic Effect

BALAKIREV A.N., ABU-AL ASAL F., RAMAZANOV V.V.

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

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в эритроцитах человека осуществляется по двум механизмам: выход хлорида и протона по каналу и обмен внутриклеточного хлорида на сульфат и протон [3]. При этом происходит закисление среды с последующим ее защелачиванием. Фаза закисления менее чувствительна к ингибиторам, изменениям температуры и гипертоническому воздействию [1]. Цель работы – выявить характер обмена хлорида на сульфат в эритроцитах крысы.

В эксперименте использовали эритроциты крови крыс, полученные декапитацией 18-месячных животных. Отмытые эритроциты с гематокритом 70 % разводили до 20 % средой, содержащей (ммоль/л): KCl – 90, NaCl – 45, сахарозы – 44, триса – 10, pH 7,4, добавляли ДИДС в конечной концентрации 50 мкмоль/л, суспензию клеток инкубировали 60 мин при 37°C. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. В термостатируемую ячейку с pH электродом, содержащую сульфатные среды, вносили эритроциты и изменения pH контролировали самописцем. Белые тени получали с помощью лизиса эритроцитов на ледяной бане в среде, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л триса, pH 8 в течение 10 мин. Полученный гемолизат центрифугировали при 4°C на центрифуге в течение 15 мин при 15000 об/мин. Осадок отмывали 4 раза

Exchange of intracellular chloride to extracellular sulphate in human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: release of chloride along the channel and the exchange of intracellular chloride for sulphate and proton [3]. In this case the medium pH changes by such a way, that the phase of acidification is less sensitive than the phase of alkalisation to the inhibitors, changes of temperature and hypertonic effect [1]. The aim of the work is to reveal the character of chloride exchange to sulphate in rat's erythrocytes.

In the experiment we used erythrocytes of rat's blood, obtained after decapitation of 18 months' animals. Washed-out with 70% hematocrit erythrocytes were diluted down to 20% with the medium, containing: KCl – 90 mM/l, NaCl – 45, sucrose – 44, tris - 10, pH 7.4, DIDS was added under final concentration of 50 mcM/l, cell suspension was incubated for 60 min at 37°C. After the treatment the erythrocytes were washed-out with incubation medium. The erythrocytes were placed into a thermostated well with pH electrode, containing sulphate media and the changes in pH were controlled with a recorder. White ghosts were obtained by lysis of erythrocytes on ice bath in the medium, containing 1 mM/l EDTA, 5 mM tris, pH 8 during 10 min. Obtained hemolysate was centrifuged at 4°C by the centrifuge during 15 min at 1500 rot/min. The sediment