

Национальная Академия наук
Украины,
отделение молекулярной
биологии, биохимии,
экспериментальной
и клинической физиологии

Институт проблем криобиологии
и криомедицины

4
2000

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the
Ukraine

Department of Molecular Biology,
Biochemistry, Experimental and
Clinical Physiology

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Национальная Академия наук Украины
Отделение молекулярной биологии,
биохимии, экспериментальной
и клинической физиологии
Институт проблем криобиологии
и криомедицины
Научно-теоретический журнал
Основан в 1985 году
Выходит 4 раза в год

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology,
Biochemistry, Experimental and Clinical
Physiology
Institute for Problems of Cryobiology and
Cryomedicine
Scientific and theoretical journal
Founded in 1985
Quarterly published

Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Редакционная коллегия

Editorial Board

С. И. Аксенов (Москва)
Г. А. Бабийчук (Харьков)
М. Е. Бекер (Рига)
Ю. П. Благой (Харьков)
Л. Вонг (Канада)
А. Н. Гольцев (Харьков)
В. М. Гордиенко (Киев)
К. Дж. Грин (Великобритания)
В. Н. Гурин (Минск)
Г. Ф. Жегунов (Харьков)
Ф. Ф. Круз-Санчес (Испания)
В. Де Лекер (Бельгия)
В. И. Луговой (Харьков)
В. Я. Малеев (Харьков)
Г. Маттес (Германия)
Г. Меримен (США)
П. Мержичка (Чехия)
Ю. Ф. Пастухов (Санкт-Петербург)
Е. Н. Попов (отв. секретарь, Харьков)
А. Роу (США)
Б. П. Сандомирский (Харьков)
А. С. Снурников (Харьков)
С. Сумида (Япония)
А. А. Цуцаева (Харьков)
С. А. Шалимов (Киев)
Э. З. Эмирбеков (Махачкала)
Т. Н. Юрченко (Харьков)

S. I. Aksenov (Moscow)
G. A. Babiychuk (Kharkov)
M. E. Beker (Riga)
Yu. P. Blagoj (Kharkov)
E. Z. Emirbekov (Makhachkala)
A. N. Goltsev (Kharkov)
V. M. Gordiyenko (Kiev)
C. J. Green (Great Britain)
V. N. Gurin (Minsk)
F. F. Cruz-Sanchez (Spain)
W. De Loecker (Belgium)
V. I. Lugovoj (Kharkov)
V. Ya. Maleyev (Kharkov)
G. Matthes (Germany)
P. Merichka (Czechia)
H. T. Meryman (USA)
Yu. F. Pastukhov (Sankt-Petersburg)
E. N. Popov (Exec. Secretary, Kharkov)
A. W. Rowe (USA)
B. P. Sandomirsky (Kharkov)
S. A. Shalimov (Kiev)
A. S. Snurnikov (Kharkov)
S. Sumida (Japan)
A. A. Tsutsayeva (Kharkov)
T. N. Yurchenko (Kharkov)
L. Wang (Canada)
G. F. Zhegunov (Kharkov)

Редакционный совет

Editorial Council

А. Д. Бугров
В. Я. Волков
В. Н. Запорожан
П. А. Калиман
В. В. Лемешко
В. Д. Мануильский
В. А. Моисеев
А. С. Попов
Н. Г. Соломонов
Ю. С. Суханов
В. В. Шенталь
М. И. Шраго

A. D. Bugrov
P. A. Kaliman
V. V. Lemesko
V. D. Manuilsky
V. A. Moiseyev
A. S. Popov
V. V. Shental
M. I. Shrago
N. G. Solomonov
Yu. S. Sukhanov
V. Ya. Volkov
V. N. Zaporozhan

Свидетельство о государственной регистрации: Серия
КВ, № 98 от 23.09.93

State Registration Certificate:
KB Series № 98 of 23.09.93

Адрес редакции: 61015, Харьков, ул. Переяславская,
23, тел. (0572) 72-10-39

Address of the Editorial Office: 23, Pereyaslavskaya str.,
61015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Сыч Л. А., Барвинченко В. Н., Погорелый В. К., Туров В. В. Влияние дисперсного кремнезема на гидратацию мясного фарша	3
Горбунов Л. В., Морозова И. А., Безуглый Н. Д. Определение оптимальной концентрации криопротектора, обеспечивающей высокую сохранность эмбрионов мыши, замороженных при сверхвысоких скоростях теплообмена	8
Чеканова В. В., Ханина Л. А., Луговой В. И. Изучение реакции амидов с оксидом этилена для оптимизации состава криопротектора. I. Аддукты N-ацетилэтанолamina	15
Катков И. И. Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. IV. Влияние концентрации клеток (цитокрита) на ответную осмотическую реакцию	22
Марченко В. С., Бабийчук Г. А., Марченко Л. Н., Полищук Л. В. К концепции экзистозэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 3. Нейрональные газы (NO, CO) как нейротрансмиттерная система "раскачки" гомеостаза	27
Грищенко В. И., Тарасов А. И., Руденко С. В., Петренко А. Ю. Чувствительность к программному и циклическому замораживанию-отогреву клеток эмбриональной печени человека 7–12 недель гестации	37
Капрельянц А. С., Марченко Л. Н., Мигунова Р. К. Электронно-микроскопическое гистохимическое изучение аденилатциклазы в клетках щитовидной железы после замораживания	45
Алмазова Е. Б., Рамазанов В. В., Бондаренко В. А. Влияние ингибиторов анионного транспорта и гипертонического воздействия на транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом	50

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П., Калмыков К. К. Иммунологические свойства криоконсервированных кожных трансплантатов	54
Бондаренко Т. П., Кадникова Н. Г., Алабедакарим Н. М., Божок Г. А., Супрун О. А., Кофанова О. В. Сравнительное изучение жизнеспособности криоконсервированных культур эндокринных тканей новорожденных поросят	59
Стрибуль Т. Ф., Новиков А. Н., Олейник С. Т., Григоращенко А. И. Усовершенствование методов криоконсервирования меристемы винограда	62

КРИОМЕДИЦИНА

Демин Ю. А., Шарлай Т. М. Воздействие трансфузий криоконсервированных клеток эмбриональной печени на состояние коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза при экспериментальном травматическом гемофтальме	66
Питько В. А. Механизмы иммунологического действия фетальных препаратов при экспериментальном воспалительном процессе	72
Пашинский П. П. Влияние криоконсервированных фетальных препаратов и сроков их хранения на биохимические процессы при ОПН	76

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Липина О. В., Прокопюк О. С., Савченко Ю. А. К вопросу о криоконсервировании плазмы кордовой крови	83
Никишкова И. Н. Эффект предварительного общего умеренного охлаждения на формирование функциональной системы оборонительного поведения у крыс разного возраста	85

ХРОНИКА

Науково-практична конференція "Клітинна та тканинна трансплантація"	87
---	----

This One



DC8L-KLF-DZLA

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Sych L. A., Barvinchenko V. N., Pogorely V. K., Turov V. V.</i> Effect of Dispersed Silica on Hydration of Force-Meat	3
<i>Gorbunov L. V., Morozova I. A., Bezugly N. D.</i> Determination of Optimum Concentration of Cryoprotectant, Providing for High Survival of Murine Embryos, Frozen with Suprahigh Rates of Heat Exchange	8
<i>Chekanova V. V., Khanina L. A., Lougovoy V. I.</i> Investigation of Amides Reacting with Ethylene Oxide for Optimization of Cryoprotectant Composition. I. Adducts of N-acetyl Ethanolamine	15
<i>Katkov I. I.</i> Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. IV. Influence of Cell Concentration (Cytocrit) on the Cell Osmotic Response	22
<i>Marchenko V. S., Babichuk G. A., Marchenko L. N., Polischuk L. V.</i> To the Conception of Existo-Encephalic System of Cooled Brain. Part 3. Neuronal Gases (NO, CO) as Neurotransmitter System of Homeostasis "Kindling" . .	27
<i>Grischenko V. I., Tarasov A. I., Rudenko S. V., Petrenko A. Yu.</i> Sensitivity to a Programmed and Cyclic Freeze-Thawing of Human Embryonic Liver Cells of 7–12 Weeks of Gestation	37
<i>Kaprelyants A. S., Marchenko L. N., Migunova R. K.</i> Electron Microscopic Histochemical Study of Adenylate Cyclase in Thyroid Gland Cells After Freezing	45
<i>Almazova E. B., Ramazanov V. V., Bondarenko V. A.</i> Influence of Anion Transport Inhibitors and Hypertonic Effect on Proton Transport in Sulphate-Loaded Erythrocytes	50

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

<i>Tsutsayeva A. A., Lobasenko N. P., Kalmykov K. K.</i> Immunobiological Properties of Cryopreserved Skin Transplants	54
<i>Bondarenko T. P., Kadnikova N. G., Alabedalkarim N. M., Bozhok G. A., Suprun O. A., Kofanova O. V.</i> Comparative Study of New Born Piglets Endocrinic Tissues Cryopreserved Cultures Viability	59
<i>Stribyl T. F., Novikov A. N., Oleynik S. T., Grigorashenko A. I.</i> Modification of Cryopreservation Methods of Grape Meristem	62

CRYOMEDICINE

<i>Demin Yu. A., Sharlay T. M.</i> Effect of cryopreserved embryonic liver cells transfusion on the state of coagulation and fibrinolytic links of hemostasis system at experimental traumatic hemophthalmos	66
<i>Pitko V. A.</i> Mechanisms of Immunologic Action of Fetal Preparations During Experimental Inflammatory Process	72
<i>Pashinsky P. P.</i> Effect of Cryopreserved Fetal Preparations and Their Storage Terms on Biochemical Processes at Acute Liver Insufficiency	76

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Lipina O. V., Prokopyuk O. S., Savchenko Yu. A.</i> To the Question on Cord Blood Plasm Cryopreservation	83
<i>Nikishkova I. N.</i> Effect of a Preliminary General Moderate Cooling on Functional System Formation of Defensive Behavior in Rats of Different Age	85

CHRONICLE

Scientific-practice conference "Cell and tissue transplantation"	87
--	----

Влияние дисперсного кремнезема на гидратацию мясного фарша

Л. А. СЫЧ

ООО "Полис", г. Белая Церковь

В. Н. БАРВИНЧЕНКО, В. К. ПОГОРЕЛЫЙ, В. В. ТУРОВ

Институт химии поверхности НАН Украины, г. Киев

Effect of Dispersed Silica on Hydration of Force-Meat

L. A. SYCH

Polis Ltd., Belaya Tserkov

V. N. BARVINCHENKO, V. K. POGORELY, V. V. TUROV

Institute of Surface Chemistry of the national Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Методом ^1H ЯМР спектроскопии в сочетании с методикой вымораживания жидкой фазы определены характеристики слоев связанной воды в исходном мясном фарше и с добавкой дисперсного кремнезема. Установлено, что введение дисперсного кремнезема в мясной фарш на стадии его приготовления приводит к увеличению общего количества связанной воды.

Методом ^1H ЯМР спектроскопії у поєднанні з методикою виморожування рідкої фази визначено характеристики шарів зв'язаної води у вихідному м'ясному фарші та з добавкою дисперсного кремнезему. Встановлено, що введення дисперсного кремнезему в м'ясний фарш на стадії його виготовлення сприяє збільшенню концентрації зв'язаної води.

A method of ^1H NMR spectroscopy, combined with a method of the liquid phase freezing-out, was used for determination of the characteristics of layers of bound water in the original beef force-meat and force-meat with added dispersed silica. It was found that administration of dispersed silica into the beef force-meat at the stage of its production results in the rise of the total amount of bound water.

Содержание воды в мясе является одной из основных характеристик, которые определяют технологические и вкусовые свойства многих мясных продуктов [1, 4]. Дегидратация мясного сырья при его обработке и хранении приводит к снижению выхода готовой продукции. Перспективным направлением в улучшении свойств мясных продуктов является введение в них биологически инертных минеральных добавок, способных повышать концентрацию связанной воды и не допускать ее выхода из продукта в процессе его хранения и изготовления. Одной из таких минеральных добавок может служить дисперсный кремнезем, который широко используется в качестве адсорбента и наполнителя во многих лекарственных препаратах [2, 3].

Развитая поверхность дисперсного кремнезема с большим количеством структурных гидроксильных групп обеспечивает высокое сродство как с молекулами воды, так и биополимерными молекулами [6, 8], а его биологическая инертность в диапазоне pH , характерном для желудочно-кишечного тракта, приводит к его полному выведению из организма в процессе жизнедеятельности. Медико-биологические испытания показали полное отсут-

The amount of water in the meat is one of the basic characteristics, which define technological and gustatory properties of many beef products [1, 4]. Dehydration of beef raw products during their processing and storage reduces the yield of ready-made products. A promising trend in improving the properties of beef products is incorporation into them of biologically inert mineral additives, capable of increasing the concentration of the bound water and prevent its discharge in the process of their storage and production. One of these mineral additives may be dispersed silica, which is widely used as an adsorbent and filling agent in many medicinal drugs [2, 3].

The developed surface of dispersed silica with a large amount of structural hydroxyl groups provides for a high affinity both to the water molecules and biopolymer molecules [6, 8], while its biological inertia in the range of pH , characteristic of the gastro-intestinal tract, results in its complete elimination from the organism in the process of vital activities. Medical-biological trials demonstrated that silica is completely void of any toxic properties and does not inflict any harm to the organism even when applied in high doses and for a long time [2].

ствие у кремнезема токсических свойств и вредного влияния на организм даже при больших дозах и длительном использовании [2].

Наиболее надежным методом определения характеристик слоев связанной воды в биосистемах и водных дисперсиях кремнезема является метод ^1H ЯМР спектроскопии в сочетании с методикой вымораживания жидкой фазы [6–9]. Этот метод позволяет определить общую концентрацию связанной воды в системе, рассчитать концентрацию сильно- и слабосвязанной воды, измерить величину свободной поверхностной энергии адсорбентов и получить зависимости концентрации незамерзающей воды от температуры при охлаждении образца в температурном интервале $200 < T < 273$ К. Метод основан на том, что при температуре ниже 273 К часть воды, которая не участвует во взаимодействии с биомолекулами или поверхностью адсорбентов, замерзает и перестает регистрироваться в спектрах ЯМР высокого разрешения из-за большого различия во временах релаксации протонов в воде и во льду. В незамерзшем состоянии остается только та часть воды, свободная энергия которой понижена адсорбционными взаимодействиями. Условием перехода молекул воды из адсорбированной фазы в твердую фазу льда является равенство свободных энергий молекул воды и льда при температуре измерения. Чем сильнее адсорбционные взаимодействия, тем при более низкой температуре происходит замерзание адсорбированной воды. Используя приближение равенства свободных энергий льда на межфазной границе с адсорбированной водой и в объеме, по температурной зависимости свободной энергии льда удастся рассчитать величину понижения свободной энергии адсорбированной воды для каждой температуры.

Образцы мясного фарша (свинина) измельчали на волчке с диаметром отверстий решетки 2–3 мм и обрабатывали на куттере. Изучали сравнительные характеристики исходного фарша и фарша, содержащего 1%-й дисперсный кремнезем (Силикс) с удельной поверхностью по азоту $300 \text{ м}^2/\text{г}$, до и после температурной обработки (водяная баня 373 К, 1,5 ч). Влагосодержание в мясном фарше, пересчитанное относительно сухого вещества, определяли по стандартной методике [1], оно составляло 69%.

Спектры ^1H ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения марки WP-100 SY фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой 100 МГц и полосой пропускания 50 кГц. Температуру в датчике спектрометра регулировали с точностью ± 1 град с помощью термоприставки BVT-1000. Интенсивность сигналов определяли электронным интегратором. Точность интегрирования спектров ЯМР составляла $\pm 10\%$.

Концентрацию незамерзающей воды в образцах измеряли следующим образом: определяли интенсивность сигнала ^1H ЯМР образца продукта, поме-

The most reliable method for determining the features of the layers of the bound water in biological systems and aqueous dispersions of silica is a method of ^1H NMR-spectroscopy, combined with a technique of the liquid phase freezing-out [6–9]. This method enables to determine total concentration of the bound water in the system, calculate concentrations of strongly and poorly bound water, measure the value of free surface energy of adsorbents and obtain dependencies of concentrations of the unfrozen water on temperature when cooling the sample in the temperature range of $200 < T < 273$ K. This method is based on the fact that at temperatures below 273 K a part of water, which is not involved into the interaction with biomolecules or surfaces of adsorbents, freezes and stops being registered in the NMR high-resolution spectra due to great differences in the durations of relaxation of protons in water and in ice. Only that part of water remains unfrozen, the free energy of which is lowered by adsorbent interactions. The condition for transfer of water molecules from the adsorbed phase into solid phase is the equality of free energies of water and ice molecules at the temperature of measurement. The stronger are the adsorbent interactions, the lower is the temperature at which the adsorbed water freezes. Using the approximation of the equality of free energies of ice on the interface with the adsorbed water and within the volume, it is possible to calculate the value of lowering of free energy of adsorbed water by the temperature dependence of free energy ice for every temperature point.

The samples of force-meat (pork) were minced with a whirlabout with the diameters of holes in the grid of 2–3 mm, and processed with a cutter. Comparative characteristics of the original force-meat and the minced meat, containing 1% of dispersed silica (Silics), with the specific surface of $300 \text{ м}^2/\text{г}$ by nitrogen, were studied prior to and after temperature treatment (water bath 373 K, 1.5 hours). The content of moisture in the force-meat, as calculated with respect to the dry substance, was determined routinely [1], and it comprised 69%.

The ^1H NMR spectra were registered with a WP-100 SY NMR-spectrometer of high resolution (Bruker, Germany), which has an operating frequency of 100 MHz and a bandwidth of 50 kHz. The temperature in the sensor of the spectrometer was regulated with the accuracy of ± 1 degree with a BVT-1000 thermostage. The intensity of signals was determined with an electron integrator. The accuracy of integration of the NMR spectra was $\pm 10\%$.

Concentrations of the unfrozen water in solutions were measured in the following manner: the intensity of the ^1H NMR signal of the sample product, placed into a 5-mm measuring ampoule, was determined. Then the temperature in the NMR sensor of the spectrometer was lowered down to 215 K, followed by a staged heating of the sample up to 265 K with registration of the intensity of the signal of the unfrozen

щенного в пятимиллиметровую измерительную ампулу. Затем температуру в датчике ЯМР спектрометра понижали до 215 К, после чего производили ступенчатый нагрев образца до температуры 265 К с регистрацией интенсивности сигнала незамерзающей воды через каждые 5–10 град. По известной интенсивности сигнала воды до замораживания и содержанию сухого вещества в образце для каждой температуры рассчитывали концентрацию незамерзающей воды (C_{H_2O}), отнесенную к единице массы сухого вещества. Нагревание образцов в процессе измерения температурных зависимостей использовалось для предотвращения образования метастабильных фаз, возможного при замораживании водных систем.

На рис. 1 показаны зависимости концентрации незамерзающей воды в образцах от температуры, а на рис. 2 — рассчитанные на их основе зависимости изменения свободной энергии связанной воды от ее концентрации. Расчеты проводили в соответствии с методикой, описанной в [7, 9]. При этом величина ΔG равна разности между величинами свободной энергии льда при 273 К и при температуре измерений. Эту величину для каждой температуры рассчитывали на основании табличных значений термодинамических параметров льда [5], величину C_{H_2O} определяли сравнением интенсивности сигнала незамерзающей воды для каждой температурной точки с интенсивностью сигнала

water every 5–10 degrees. The concentrations of unfrozen water (C_{H_2O}), related to the unit of the dry substance, were calculated for every temperature point by the known intensity of the signal of water prior to freezing and the content of the dry substance in the sample. Heating of samples in the process of measuring temperature dependencies was used for preventing formation of metastable phases, which may occur during freezing of aqueous systems.

Fig. 1 shows the dependencies of concentration of the unfrozen water in the samples on temperature, and Fig. 2 displays the dependencies of changes in free energy of the bound water on its concentration. The calculations were done by the method described elsewhere [7, 9]. Here the value of ΔG is equal to the difference between the amounts of free energy of ice at 273 K and at the temperature of measurements. For every temperature point this value was calculated on the basis of the reported (table) values of the thermodynamic parameters of ice [5], the amount of C_{H_2O} was determined by comparing the intensity of the unfrozen water signal for every temperature point with the signal intensity of water prior to freezing. Curves 2, 4 (Figs. 1, 2) correspond to the force-meat, containing the additive of dispersed silica, curves 1, 3 — without it; the curves 1, 3 belong to the samples prior to thermal treatment, and curves 3, 4 — after it. The submitted dependencies characterize changes in free energy of water molecules on the interphase of food product/water. The obtained dependencies $\Delta G = f(C_{H_2O})$ differ from the respective dependency for aqueous suspension of dispersed silica [7, 8]. Middle parts of the dependencies demonstrate inflections, characteristic of the samples with heterogeneous sur-

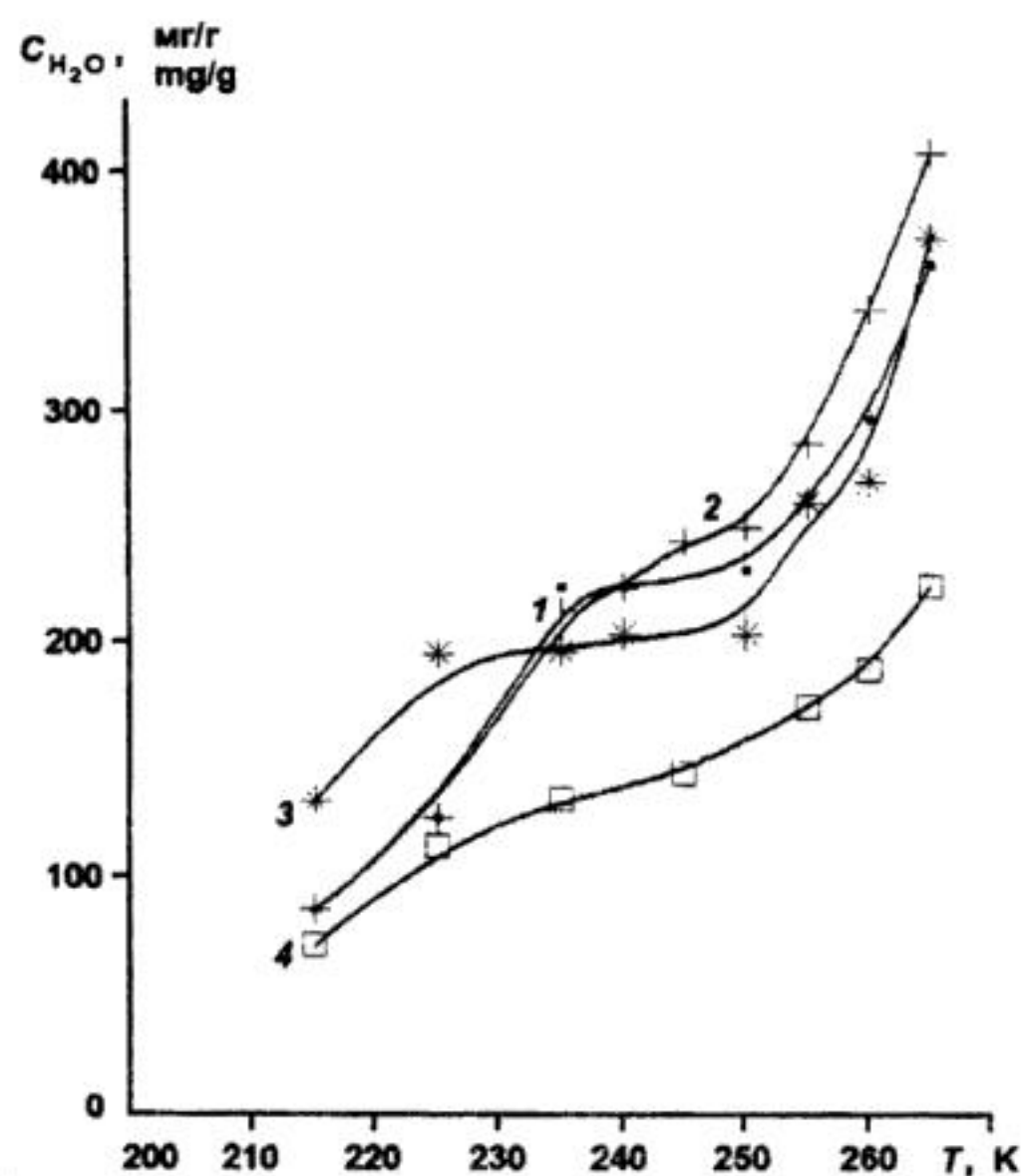


Рис. 1. Зависимость от температуры концентрации незамерзающей воды в образцах: 1 — исходного фарша; 2 — исходного фарша, содержащего 1%-й SiO_2 ; 3 — фарша после термообработки; 4 — фарша + SiO_2 после термообработки.

Fig. 1. Dependence of the concentration of unfrozen water in the samples on the temperature of: 1 — original force-meat; 2 — original force-meat, containing 1%- SiO_2 ; 3 — force-meat after thermal treatment; 4 — force-meat + SiO_2 after thermal treatment.

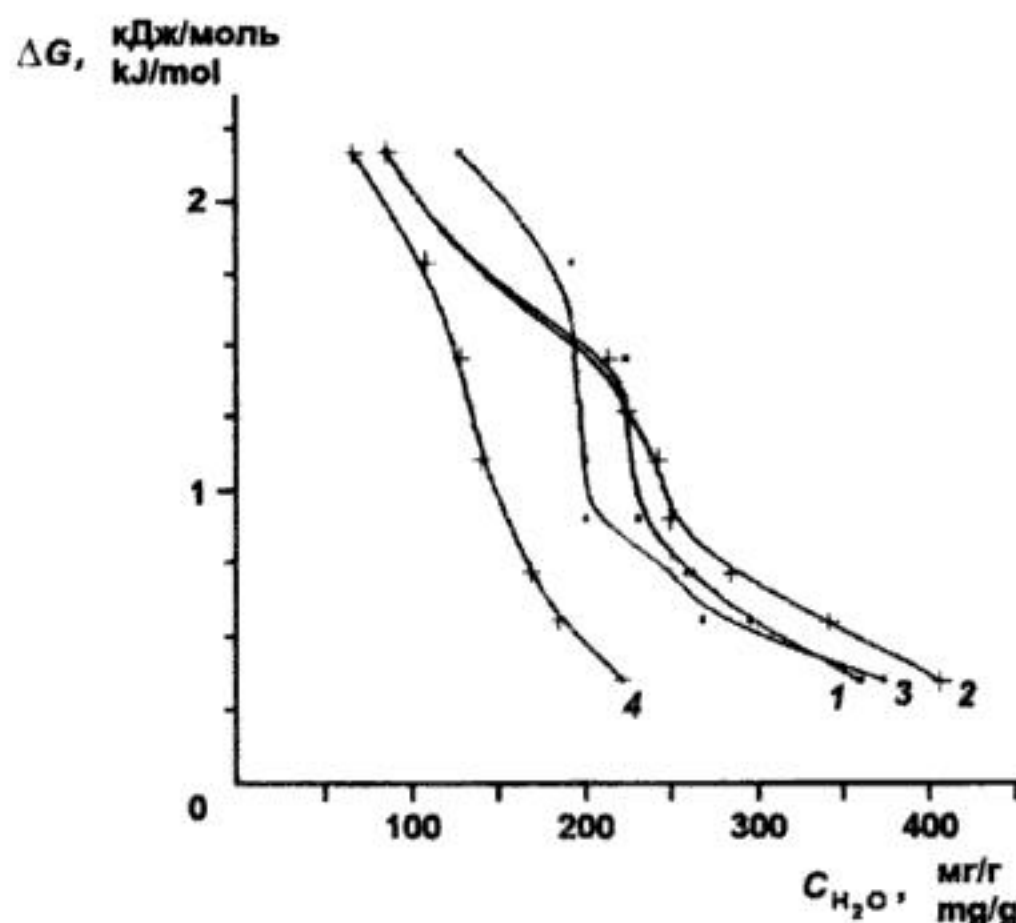


Рис. 2. Зависимость изменения свободной энергии связанной воды от ее концентрации: 1 — для исходного фарша; 2 — исходного фарша, содержащего 1%-й SiO_2 ; 3 — фарша после термообработки; 4 — фарша + SiO_2 после термообработки.

Fig. 2. Dependence of changes in free energy of bound water on its concentration for: 1 — original force-meat; 2 — original force-meat, containing 1%- SiO_2 ; 3 — force-meat after thermal treatment; 4 — force-meat + SiO_2 after thermal treatment.

воды до замораживания. Кривые 2, 4 (рис. 1, 2) соответствуют мясному фаршу, содержащему добавку дисперсного кремнезема, кривые 1, 3 — не содержащему его, при этом кривые 1, 2 относятся к образцам до, а 3, 4 — после термообработки. Приведенные зависимости характеризуют изменение свободной энергии молекул воды на межфазной границе пищевой продукт/вода. Полученные зависимости $\Delta G = f(C_{H_2O})$ отличаются от соответствующей зависимости для водной суспензии дисперсного кремнезема [7, 8]. В средней части зависимостей наблюдаются перегибы, характерные для образцов с неоднородной поверхностью [10]. На основании зависимостей $\Delta G = f(C_{H_2O})$ могут быть определены концентрации сильно- и слабосвязанной воды. При этом слабосвязанной водой можно считать ту часть связанной воды, для которой свободная энергия молекул лишь незначительно понижена адсорбционными взаимодействиями с твердой (полимерной) фазой. Эта вода расположена с внешней стороны гидратной оболочки и ее температура замерзания понижена не более, чем на 10–15 град. На рис. 2 слабосвязанной водой обусловлен участок зависимости $\Delta G = f(C_{H_2O})$, расположенный правее точки последнего перегиба. Экстраполяция этого участка до пересечения с осью абсцисс позволяет определить максимальную концентрацию незамерзающей воды ($C_{H_2O}^{max}$), а к оси ординат — максимальное изменение свободной энергии в слое слабосвязанной воды (ΔG^w). Толщина слоя сильносвязанной воды ($C_{H_2O}^s$) определяется экстраполяцией к оси абсцисс участка зависимости $\Delta G = f(C_{H_2O})$, лежащего левее точки последнего перегиба. Соответственно максимальное изменение свободной энергии в слое сильносвязанной воды (ΔG^s) определяется экстраполяцией зависимости $\Delta G = f(C_{H_2O})$ к оси ординат. Концентрацию слабосвязанной воды ($C_{H_2O}^w$) рассчитывали по формуле $C_{H_2O}^w = C_{H_2O}^{max} - C_{H_2O}^s$. Характеристики слоев адсорбированной воды для всех изученных систем суммированы в таблице.

Влияние добавок дисперсного кремнезема и термообработки на характеристики слоев связанной воды в мясном фарше

Образец	$C_{H_2O}^w$	$C_{H_2O}^s$	ΔG^w	ΔG^s
	мг/г		кДж/моль	
Исходный фарш	240	260	1,5	2,75
Фарш с добавкой 1%-го SiO ₂	260	300	1,6	2,75
Фарш после термообработки	390	210	1,25	3,0
Термообработанный фарш с добавкой 1%-го SiO ₂	200	180	1,6	2,8

На основании данных таблицы можно заключить, что при добавлении дисперсного кремнезема в исходный образец мясного фарша характеристики слоев связанной воды существенно изменяются. Происходит заметное увеличение концентрации обоих типов связанной воды. Следовательно, добавление кремнезема приводит к общему увеличе-

face [10]. Concentrations of strong and poorly bound water may be determined on the basis of dependencies $\Delta G = f(C_{H_2O})$. Here such part of water is considered poorly bound, for which free energy of molecules is only slightly reduced by adsorptive interactions with a solid (polymeric) phase. This water is located on the external side of the hydrate cover and its temperature of freezing is lowered not more than by 10–15 degrees. Poorly bound water is responsible for the section of the dependency $\Delta G = f(C_{H_2O})$, located to right of the point of last inflection in Fig. 2. Extrapolation of this section to its intersection with the abscissa axis permits to determine maximum concentration of the unfrozen water ($C_{H_2O}^{max}$), and with the ordinate axis — maximum alteration in free energy in the layer of poorly bound water (ΔG^w). The thickness of the layer of strongly bound water ($C_{H_2O}^s$) is determined by extrapolation to the abscissa axis of the section of dependency $\Delta G = f(C_{H_2O})$, located to the right of the point of the last inflection. Respectively, maximum alteration in free energy in the layer of strongly bound water (ΔG^s) is determined by extrapolation of the dependency $\Delta G = f(C_{H_2O})$ to the ordinate axis. The concentration of poorly bound water ($C_{H_2O}^w$) was calculated by the formula $C_{H_2O}^w = C_{H_2O}^{max} - C_{H_2O}^s$. Characteristics of the layers of the adsorbed water for all the studied systems are summarized in the Table.

Action of the dispersed silica additives and thermal treatment on the characteristics of the layers of bound water in beef force-meat

Sample	$C_{H_2O}^w$	$C_{H_2O}^s$	ΔG^w	ΔG^s
	mg/g		kJ/mol	
Original force-meat	240	260	1.5	2.75
Force-meat with added 1%-SiO ₂	260	300	1.6	2.75
Force-meat after thermal treatment	390	210	1.25	3.0
Thermal treated force-meat with added 1%-SiO ₂	200	180	1.6	2.8

It may be concluded from the Table that addition of the dispersed silica into the original sample of the beef force-meat results in significant alteration in the characteristics of the bound water. There occurs a considerable rise in the concentrations of both types of bound water. Hence, addition of silica brings about a total increase in the concentration of bound water in the sample. Apparently, this is due to the fact that particles of silicas relatively poor interact with ingredients of beef force-meat. In the process of mixing the powder of dispersed silica with the beef force-meat, silica binds a considerable amount of that water, which remained in a free state in the original force-meat and which froze at the temperature of 273 K. Addition of a 1%-dispersed silica to the beef force-meat increased the concentration of the bound water by 15–20%.

A strikingly different situation developed in the process of thermal treatment of the products, when the silica particles actively interact with the beef

нию концентрации связанной воды в образце. По-видимому, это обусловлено тем, что частицы кремнезема относительно слабо взаимодействуют с ингредиентами мясного фарша. В процессе перемешивания порошка дисперсного кремнезема с мясным фаршем кремнезем связывает значительное количество той воды, которая в исходном фарше оставалась в свободном состоянии и замерзала при температуре 273 К. Добавление к мясному фаршу 1%-го дисперсного кремнезема привело к увеличению концентрации связанной воды на 15–20%.

Совершенно иная ситуация имеет место в процессе термообработки продуктов, когда частицы кремнезема активно взаимодействуют с компонентами мясного фарша, в результате чего резко уменьшается концентрация связанной воды в образце. Подобный эффект наблюдался нами ранее при изучении взаимодействия дисперсного кремнезема с молекулами сывороточного альбумина [8]. Уменьшение концентрации связанной воды обусловлено разрушением гидратных оболочек как кремнезема, так и биополимерных молекул в процессе формирования аддуктов минеральных частиц на поверхности компонент мясного фарша.

Таким образом, введение небольших добавок дисперсного кремнезема в мясной фарш на стадии его приготовления увеличивает концентрацию связанной воды, что может уменьшить потери воды при его хранении. Это должно сказываться на улучшении технологических параметров и товарного вида продукта. В то же время резкое уменьшение концентрации связанной воды в готовом продукте может уменьшить время термообработки, необходимое для приготовления мясных продуктов длительного хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавская Н. К., Алехина Л. Т., Отряшенкова Л. М. Исследование и контроль качества мяса и мясopодуков. – М.: Агропромиздат, 1985. – 295 с.
2. Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А. А. Чуйко. – Киев–Ставрополь, 1993. – 259 с.
3. Муравьев И. А. Технология лекарств. – М.: Медицина, 1980. Т. 1. – 391 с.
4. Структурно-механические характеристики пищевых продуктов / Под ред. А. В. Горбатова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 296 с.
5. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В. П. Глушкова. – М.: Наука, 1978. – 325 с.
6. Туров В. В., Галаган Н. П., Покровская О. В. и др. Влияние адсорбированных молекул Конконовалина А на характеристики связанной воды в гидратной оболочке дисперсного кремнезема по спектрам ^1H ЯМР замороженных водных суспензий // Биофизика. – 1997. – 42, № 5. – С. 1040–1046.
7. Gunko V. M., Zarko V. I., Turov V. V. et al. Dielectric properties and dynamic simulation of water bound to titania silica surface // *Langmuir*. – 1995. – 11. – P. 2115–2200.
8. Turov V. V., Barvinchenko V. N. Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2/ice interface of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // *Colloid. Surf. B*. – 1996. – 8. – P. 125–132.
9. Turov V. V., Leboda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – 79. – P. 173–211.
10. Turov V. V., Leboda R., Bogillo V. I., Skubiszewska-Zieba J. Surface properties of carbonaceous as examined by ^1H NMR spectroscopy using the milk freezing procedure // *Adsorption Sci. & Techn.* – 1996. – 14. – P. 319–330.

Поступила 15.12.99

force-meat components, resulting in a reduction of the bound water concentration in the sample. The authors observed a similar effect earlier [8] when studying the interaction of dispersed silica with molecules of serum albumin. A decrease in the concentration of bound water is due to destruction of the hydrate covers of both silica and biopolymer molecules in the process of formation of adducts of mineral particles on the surfaces of the beef force-meat components.

Thus, administration of small additions of dispersed silica into the beef force-meat during its preparation increases the concentration of bound water, which may reduce the losses of water during its storage. This should result in the improvement of technological parameters and marketable air of the product. At the same time, rapid reduction of the concentration of bound water in the ready-made product may shorten the duration of thermal treatment, which is required for production of beef foodstuff, capable of long-term storage.

REFERENCES

1. Zhuravskaya N. K., Alekhina L. T., Otryashenkova L. M. Study and quality control of meat and beef foodstuff. – M.: Agropromizdat publ., 1985. – 295 p.
2. Silica in medicine and biology / Ed. by A. A. Chuiko. – Kiev–Stavropol. – 1993. – 259 p.
3. Muravyev I. A. Technology of medical drugs. – M.: Meditsina publ., 1980. – Vol. 1. – 391 p.
4. Structure-mechanical characteristics of foodstuff / Ed. by A. V. Gorbatov. – M.: Light and heavy industry, 1982. – 296 p.
5. Thermodynamical properties of individual substances / Ed. by V. P. Glushkov. – M.: Nauka publ., 1978. – 325 p.
6. Turov V. V., Galagan N. P., Pokrovskaya O. V. et al. Action of adsorbed molecules of concovalin A on the characteristics of bound water in the hydrate cover of dispersed silica as judged by the ^1H NMR spectra of frozen aqueous solutions // *Biofizika*. – 1997. – 42, № 5. – P. 1040–1046.
7. Gunko V. M., Zarko V. I., Turov V. V. et al. Dielectric properties and dynamic simulation of water bound to titania silica surface // *Langmuir*. – 1995. – 11. – P. 2115–2200.
8. Turov V. V., Barvinchenko V. N. Structurally ordered surface layers of water at the SiO_2/ice interface of adsorbed molecules of protein hydrolysate on them // *Colloid. Surf. B*. – 1996. – 8. – P. 125–132.
9. Turov V. V., Leboda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – 79. – P. 173–211.
10. Turov V. V., Leboda R., Bogillo V. I., Skubiszewska-Zieba J. Surface properties of carbonaceous as examined by ^1H NMR spectroscopy using the milk freezing procedure // *Adsorption Sci. & Techn.* – 1996. – 14. – P. 319–330.

Accepted in 15.12.99

Определение оптимальной концентрации криопротектора, обеспечивающей высокую сохранность эмбрионов мыши, замороженных при сверхвысоких скоростях теплообмена

Л. В. ГОРБУНОВ, И. А. МОРОЗОВА, Н. Д. БЕЗУГЛЫЙ
Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулинич

Determination of Optimum Concentration of Cryoprotectant, Providing for High Survival of Murine Embryos, Frozen with Suprahigh Rates of Heat Exchange

L. V. GORBUNOV, I. A. MOROZOVA, N. D. BEZUGLY
Kharkov Biotechnological Center, Kulnichi

Установлены величины скоростей теплообмена пластиковых капилляров, имеющих различный наружный диаметр (1,8; 1; 0,5; 0,3 мм), при погружении в жидкий азот и спиртовую баню. Увеличение скорости более чем в 10 раз относительно общепринятого способа витрификации ($B_3 \approx 30^\circ\text{C}/\text{с}$) дало возможность уменьшить концентрацию как эквilibрирующего, так и витрифицирующего растворов криопротектора на 15% и увеличить сохранность девитрифицированных эмбрионов мыши от 73,3 до 97,8%. Определены величины минимальной концентрации витрификационного раствора, содержащего глицерин и сахарозу, способствующей возникновению эффекта стеклования среды, в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания. Показано, что минимальная величина концентрации эквilibрирующего раствора криопротектора, обеспечивающая высокий уровень сохранности эмбрионов мыши, должна быть приблизительно на 40% меньше величины общей концентрации витрифицирующего раствора криопротектора при высоких и сверхвысоких скоростях теплообмена.

Встановлено величини швидкостей теплообміну пластикових капілярів, які мають різний зовнішній діаметр (1,8; 1; 0,5; 0,3 мм), при зануренні у рідкий азот або спиртову баню. Збільшення швидкості більш ніж у 10 разів відносно загальновідомого методу вітрифікації ($B_3 \approx 30^\circ\text{C}/\text{с}$) дало можливість зменшити концентрацію як еквilibруючого, так і вітрифікуючого розчинів криопротектора на 15%, що дозволило збільшити цілість девітрифікованих ембріонів миші від 73,3 до 97,8%. Визначено величини мінімальної концентрації вітрифікаційного розчину, що містить гліцерин та цукрозу, які сприяють виникненню ефекту склування середовища у широкому діапазоні швидкостей заморожування-відтавання. Показано, що мінімальна величина концентрації еквilibруючого розчину криопротектора, яка забезпечує високий рівень цілості ембріонів миші, повинна бути приблизно на 40% менше величини загальної концентрації вітрифікаційного розчину криопротектора при високих та надвисоких швидкостях теплообміну.

The values of the rates of heat exchange of plastic capillaries with different external diameters (1.8, 1.0, 0.5, 0.3 mm) were determined after plunging into liquid nitrogen and alcohol bath. Acceleration of the rate by more than 10-fold as compared with a commonly accepted method of vitrification ($B_3 \approx 30^\circ\text{C}/\text{s}$) permitted to reduce concentrations of both equilibration and vitrification solutions of the cryoprotectant by 15% and increase survival of devitrified murine embryos from 73.3 to 97.8%. The authors determined the values of minimum concentrations of the vitrification solution, containing glycerol and sucrose, which facilitates development of the effect of vitrification of the medium, in a wide range of freeze-thawing rates. The minimum value of the concentration of the equilibration solution of the cryoprotectant, providing for a high level of murine embryo survival, was shown to be by approximately 40% lower as compared with the value of the total concentration of the vitrification solution of the cryoprotectant under high and suprahigh rates of heat exchange.

Применение непроникающих криопротекторов в составе витрифицирующих растворов в некоторой степени снижает их пагубное осмотическое и токсическое воздействие на биообъект, обусловленное высокими концентрациями [1, 6]. Одним из наиболее эффективных способов понижения концентрации криопротектора является использование сверхвысоких скоростей охлаждения и отогрева. Увеличение скорости замораживания в 2,5 раза относительно общепринятых методов витрификации повышает уровень сохранности эмбрионов мыши до 95% [5] и спермиев человека до 89% [4]. Проблема определения вероятности кристаллообразования в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания, а также установления общей

Application of non-penetrating cryoprotectants within vitrifying solutions to some extent reduces their hazardous osmotic and toxic action, caused by high concentrations [1, 6]. One of the most effective methods of reducing the concentration of the cryoprotectant is application of suprahigh rates of cooling and warming. Acceleration of the rate of freezing by 2.5-fold as compared with routine vitrification methods increases the level of survival of murine embryos up to 95% [5] and of human spermatozoa — up to 89% [4]. The problem of determining the probability of nucleation within a wide range of freeze-thawing rates, as well as of defining total minimum concentration of the cryoprotectant and its composition does

минимальной концентрации криоконсерванта и его состава не позволяет в полной мере оптимизировать технологию витрификации биообъекта.

Цель данной работы — установить минимальную концентрацию растворов глицерина и сахарозы, приводящую к эффекту витрификации среды, при сверхвысоких скоростях замораживания-оттаивания.

В качестве контейнеров для среды, содержащей биообъект, использовали пластиковые капилляры с разным наружным диаметром: 1,8; 1,0; 0,5; 0,3 мм. Эти капилляры получали с помощью нагревания и вытягивания полистироловых и пластиковых соломинок. Замораживание осуществляли прямым погружением капилляров в жидкий азот, а оттаивание — в спиртовую баню, нагретую до температуры 40 °C (для перемешивания теплоагента использовали магнитную мешалку). При замораживании-оттаивании капилляров, имеющих диаметр 0,5 и 0,3 мм, применяли термозащитные чехлы для предотвращения рекристаллизации при переносе контейнеров из жидкого азота в спиртовую баню. При определении скорости замораживания-оттаивания учитывали интенсивность электропроводности для 6,5 М раствора глицерина, что позволило снизить до минимума влияние средств измерений на величину скорости теплообмена [2]. Скорость снижения температуры при замораживании вычисляли в диапазоне зоны эвтектики используемого раствора, а при оттаивании — в температурной зоне рекристаллизации. Режим снижения температуры регистрировали при помощи графопостроителя Н-307, подключенного к ЭВМ через аналого-цифровой преобразователь.

Наличие или отсутствие роста кристаллов во внеклеточной среде определяли визуальным методом [10]. Стеклообразные свойства растворов глицерина и сахарозы устанавливали при концентрациях (V/V) 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60%. Полученные результаты были статистически обработаны в соответствии с общепринятыми методами. Эмбрионы мыши получали на стадии поздней морулы или ранней бластоцисты от самок, обработанных перед осеменением гормональными препаратами по классической схеме для индукции суперовуляции с целью увеличения количества эмбрионов на изучаемой стадии развития [8]. Уровень жизнеспособности используемых в экспериментах эмбрионов мыши определяли с помощью морфологического способа оценки [7]. Применяемые для проведения работы среды были приготовлены на основе раствора Дюльбекко (PBS), содержащего 10% телячьей фетальной сыворотки.

Для определения скоростей теплообмена капилляров с различным наружным диаметром при замораживании прямым погружением в жидкий азот и оттаивании в спиртовой бане проведены исследования, результаты которых представлены в табл. 1. Полученные данные показывают, что зави-

not allow to fully optimize technology of vitrification of the biosystem.

The aim of the given research was to select minimum concentrations of the solutions of glycerol and sucrose, resulting in the effect of vitrification of the medium, while applying suprahigh rates of freeze-thawing.

Plastic capillaries with different external diameters of 1.8, 1.0, 0.5, 0.3 mm were used as containers for the biosystem-containing medium. These capillaries were obtained by warming and stretching of polystyrene and plastic straws. Freezing was done by direct plunging of capillaries into liquid nitrogen, and thawing was performed on alcohol bath, heated up 40 °C, with magnetic mixer for mixing of the thermal agent. During freeze-thawing the capillaries with the diameters of 0.5 and 0.3 mm were used with thermal protective covers for preventing re-crystallization after transfer of containers from liquid nitrogen into the alcohol bath. When determining the rates of freeze-thawing attention was paid to the intensity of electroconductivity for 6.5 M solution of glycerol, which permitted to maximally reduce the influence of the means of measurement on the value of the heat exchange rate [2]. The rate of temperature lowering was calculated within the zone of eutectics of the applied solution during freezing, and while thawing — in the temperature zone of re-crystallization. The mode of temperature lowering was registered with a N-307 graphic plotter, connected with a PC via the analogue-digital converter.

Availability or absence of the crystal growth in the intercellular medium were visually detected [10]. Vitrifying properties of the solutions of glycerol and sucrose were determined under the concentrations (V/V) of 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60%. The results obtained were routinely statistically processed. Murine embryos were harvested at the stage of late morula or early blastocyst from the females, treated prior to insemination with hormonal preparations by the classic scheme for inducing superovulation, with the aim of increasing the number of embryos at the studied stage of development [8]. The level of viability of the experimental murine embryos was determined morphologically [7]. The experimental media were prepared on the basis of Dulbecco's solution (PBS) with addition of 10%-fetal calf serum.

To determine the rates of heat exchange during freezing by direct plunging into liquid nitrogen and thawing on alcohol bath of capillaries with varying external diameters the research was done, the results of which are shown in Table 1. The data obtained testify to the fact that the dependence of a change in the rate of heat exchange on the external diameter of the capillary is of the nature, close to a hyperbolic one. Minimum inner diameter of the capillary is limited by dimensions of the biosystem and comprises $200 \pm 20 \mu\text{m}$, and outer diameter is $350 \pm 20 \mu\text{m}$, taking into account thickness of the capillary walls. Maxi-

симось изменения скорости теплообмена от наружного диаметра капилляра имеет характер, близкий к гиперболическому. Минимальный внутренний диаметр капилляра ограничивается размером биообъекта и составляет 200 ± 20 мкм, а наружный — 350 ± 20 мкм с учетом толщины стенок капилляра. Максимальная скорость теплообмена установлена при минимальном диаметре капилляра 0,3 мм ($B_3 = 307$ °C/с, $B_{от} = 286$ °C/с). Величина скорости оттаивания капилляров диаметром 0,3 и 0,5 мм, реализуемая на воздухе при переносе их из жидкого азота в спиртовую баню, составляет 150 °C/с. С одной стороны, эта величина настолько большая, что за 0,5 с температура витрифицируемой среды достигает зоны рекристаллизации, но, с другой — она не достаточно велика для сдерживания роста кристаллов. В связи с этим применяется специальный термозащитный чехол в виде дополнительной пластиковой трубки для снижения скорости оттаивания на воздухе. Капилляр с биообъектом помещается в пластиковую соломинку диаметром 1 мм, а в процессе замораживания-оттаивания выводится из нее на длину рабочей зоны. При замораживании-оттаивании биообъектов в капиллярах с наружным диаметром более 1 мм отсутствует необходимость в применении термозащитного чехла, так как величины скоростей теплообмена составляют: $B_3 = 104$ °C/с, $B_{от} = 93$ °C/с.

Таблица 1
Зависимость скорости теплообмена пластикового капилляра от величины его наружного диаметра

Диаметр капилляра, мм	Скорость теплообмена B , °C/с			
	Замораживание в жидком азоте		Оттаивание в спиртовой бане ($t = 40$ °C)	
	Неперемешиваемый хладагент	Перемешиваемый хладагент	Неперемешиваемый теплоноситель	Перемешиваемый теплоноситель
0,3	$307,7 \pm 17,1$	$412 \pm 20,5$	$286,3 \pm 14$	380 ± 27
0,5	$198 \pm 7,2$	$258 \pm 14,8$	180 ± 6	$216 \pm 12,7$
1,0	$104 \pm 4,5$	$151 \pm 7,1$	93 ± 3	$126 \pm 6,4$
1,8	$27,7 \pm 2,4$	$46 \pm 3,2$	$26 \pm 1,8$	$42 \pm 2,7$

При перемешивании хладагента и теплоносителя с помощью магнитной мешалки наблюдается увеличение скоростей охлаждения и отогрева для капилляров диаметром 0,3 мм от 307 до 412 °C/с и от 286 до 380 °C/с соответственно.

Увеличение скорости оттаивания относительно скорости замораживания в 1,3 раза позволяет исключить процесс рекристаллизации раствора криопротектора при оттаивании. Данное условие выполняется при замораживании капилляров прямым погружением в жидкий азот, а при оттаивании — в спиртовую баню, нагретую до температуры 40 °C (с использованием магнитной мешалки).

Для определения минимальной концентрации растворов глицерина и сахарозы, приводящей к эффекту стеклования среды, в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания проведены

мум rate of heat exchange is determined with the minimum diameter of the capillary of 0.3 mm ($B_{fr} = 307$ °C/s, $B_{th} = 286$ °C/s). The magnitude of the thawing rate, realized upon transfer of the capillary from liquid nitrogen into alcohol bath, is $B_{th} = 150$ °C/s. On one hand, this value is so high that in 0.5 s the temperature of the medium being vitrified achieves the zone of re-crystallization, though, on the other hand, it is not high enough for inhibiting the growth of ice crystals. Hence, a special thermoprotective cover in the form of additional plastic tube is applied. A capillary with a biosystem is placed into a plastic straw with the diameter of 1 mm, and during freeze-thawing it is extracted out of it at a length of the working section. Freeze-thawing of biosystems in the capillaries with the external diameter of more than 1 mm does not require application of the thermoprotective cover, since the rates of heat exchange are $B_{fr} = 104$ °C/s, $B_{th} = 93$ °C/s.

Table 1
Dependence of the rate of heat exchange of the plastic capillary on the value of its external diameter

Capillary diameter, mm	Rate of heat exchange B , °C/s			
	Freezing in liquid nitrogen		Thawing on alcohol bath ($t = 40$ °C)	
	Non-mixed cooling agent	Mixed cooling agent	Non-mixed heat-transfer agent	Mixed heat-transfer agent
0.3	307.7 ± 17.1	412 ± 20.5	286.3 ± 14	380 ± 27
0.5	198 ± 7.2	258 ± 14.8	180 ± 6	216 ± 12.7
1.0	104 ± 4.5	151 ± 7.1	93 ± 3	126 ± 6.4
1.8	27.7 ± 2.4	46 ± 3.2	26 ± 1.8	42 ± 2.7

When the cooling agent and heat carrier are mixed with a magnetic mixer the rates of cooling and warming are accelerated for the capillaries with the diameter of 0.3 mm from 307 to 412 °C/s and from 286 to 380 °C/s, respectively.

Acceleration of the rate of thawing by 1.3-fold as compared with the rate of cooling permits to avoid the process of re-crystallization of the cryoprotective solution during thawing. The given condition is fulfilled during freezing by direct plunging of capillaries into liquid nitrogen, and during thawing — by placing onto alcohol bath, heated up to the temperature of 40 °C (using a magnetic mixer).

The experiments were staged in a wide range of freeze-thawing rates, aimed at determination of the minimum concentrations of the solutions of glycerol and sucrose, resulting in the effect of glass-transition of the medium. Their results are submitted in Table 2.

To check on the glass-transiting properties of sucrose with glycerol the authors staged an experiment on determining the extent of nucleation of various volume ratios of glycerol and sucrose in a wide range of freeze-thawing. The ratios of the volumes of glycerol to sucrose were 1:3, 1:2 and 2:3 with the rates of freezing 28 and 205 °C/s.

эксперименты, результаты которых представлены в табл. 2.

Таблица 2

Критические концентрации растворов глицерина и сахарозы, вызывающие эффект стеклования среды, в зависимости от величин скоростей замораживания-оттаивания

Скорость теплообмена B , °C/с		Минимальная концентрация раствора криопротектора, обеспечивающая эффект витрификации среды C , % [V/V]	
		глицерина	сахарозы
Замораживание	$27,7 \pm 2,4$	$45 \pm 2,5$	$55 \pm 2,5$
	$104 \pm 4,5$	$40 \pm 2,5$	$50 \pm 2,5$
	$198 \pm 7,2$	$35 \pm 2,5$	$45 \pm 2,5$
	$307,7 \pm 17,1$	$30 \pm 2,5$	$40 \pm 2,5$
Оттаивание	$42 \pm 2,7$	$50 \pm 2,5$	$60 \pm 2,5$
	$126 \pm 6,4$	$45 \pm 2,5$	$55 \pm 2,5$
	$216 \pm 12,7$	$40 \pm 2,5$	$50 \pm 2,5$
	380 ± 27	$35 \pm 2,5$	$45 \pm 2,5$

Для проверки стеклующихся свойств раствора сахарозы в комплексе с глицерином проведен опыт по определению степени кристаллообразования различных объемных соотношений глицерина и сахарозы в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания. Отношение объемов глицерина к сахарозе составило: 1:3; 1:2 и 2:3 при скоростях замораживания 28 и 205 °C/с.

Полученные результаты указывают на то, что при увеличении объема глицерина в растворе криоконсерванта при различных скоростях замораживания-оттаивания наблюдается фазовый сдвиг вероятности стеклования в область более низких концентраций. Степень витрификации раствора криоконсерванта прямо пропорциональна содержанию в нем глицерина и в большей степени зависит от величины скорости оттаивания, чем замораживания. На основании полученных данных предложена формула оценки минимальной концентрации криоконсерванта, состоящего из криопротекторов с различной способностью к стеклованию, при разных скоростях

$$C_{\min}(B) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_i(B),$$

где n — количество видов криопротекторов, входящих в состав криоконсерванта; $C_i(B)$ — минимальная концентрация раствора криопротектора при заданной скорости теплообмена B .

Расчет величины минимальной концентрации растворов глицерина и сахарозы проводили с помощью уравнений, полученных методом регрессионного анализа.

$$C_{\text{гл}}(B) = a_0 + a_1 B^{a_2}, \text{ где } a_0 = 57,63; a_1 = -1,15; a_2 = 0,5026 (R = 0,998);$$

Table 2

Critical concentrations of the solutions of glycerol and sucrose, resulting in the glass-transition effect, depending on the values of freeze-thawing rates

Rate of heat exchange B , °C/s		Minimum concentration of the cryoprotective solution, providing for the effect of glass-transition of the medium C , % (V/V)	
		Glycerol	Sucrose
Freezing	27.7 ± 2.4	45 ± 2.5	55 ± 2.5
	104 ± 4.5	40 ± 2.5	50 ± 2.5
	198 ± 7.2	35 ± 2.5	45 ± 2.5
	307.7 ± 17.1	30 ± 2.5	40 ± 2.5
Thawing	42 ± 2.7	50 ± 2.5	60 ± 2.5
	126 ± 6.4	45 ± 2.5	55 ± 2.5
	216 ± 12.7	40 ± 2.5	50 ± 2.5
	380 ± 27	35 ± 2.5	45 ± 2.5

The results obtained testify to the fact that an increase in the volume of glycerol in cryoprotective solutions at various rates of freeze-thawing is accompanied by a phase shift in the probability of glass-transition towards the region of lower concentrations. The extent of vitrification of the cryoprotective solution is directly proportional to the content of glycerol in it and stronger depends on the value of the thawing rate as compared with the freezing rate. On the basis of the data obtained a formula for evaluating minimum concentration of the cryopreservative, comprising cryoprotectants with varying abilities to glass-transition at different rates, was proposed:

$$C_{\min}(B) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_i(B),$$

where n is the amount of the types of cryoprotectants, incorporated into the cryopreservative; $C_i(B)$ is a minimum concentration of the cryoprotective solution under the assigned rate of thawing (B).

The values of the minimum concentrations for the solutions of glycerol and sucrose were calculated on the basis of the equations, obtained with a regressive analysis.

$$C_{\text{гл}}(B) = a_0 + a_1 B^{a_2},$$

where $a_0 = 57.63; a_1 = -1.15; a_2 = 0.5026$
($R = 0.998$);

$$C_{\text{suc}}(B) = a_0 B^2 - a_1 B + a_2,$$

where $a_0 = 7.433 \cdot 10^{-5}; a_1 = 7.613 \cdot 10^{-2}; a_2 = 63.16$
($R = 0.999$).

The authors believe the proposed formulas for calculating minimum concentrations of the vitrification solution with different volume ratios of glycerol and sucrose, which provide for the effect of vitrification of the medium within a wide range of freeze-thawing rates, may facilitate optimization of technology of cryopreservation of mammalian genital cells and embryos.

$$C_{\text{сах}}(B) = a_0 B^2 - a_1 B + a_2, \text{ где } a_0 = 7,433 \cdot 10^{-5}; \\ a_1 = 7,613 \cdot 10^{-2}; a_2 = 63,16 (R = 0,999).$$

Полагаем, что предложенные формулы расчета минимальной концентрации витрифицирующего раствора с различными объемными соотношениями глицерина и сахарозы, которые обеспечивают эффект витрификации среды в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания, могут способствовать оптимизации технологии криоконсервации половых клеток и эмбрионов млекопитающих.

Согласно [3, 9], максимальная сохранность де-консервированных эмбрионов млекопитающих, замороженных традиционным способом витрификации (прямое погружение соломинок диаметром 1,8 мм в жидкий азот), достигается в случае применения в качестве криоконсерванта растворов проникающих криопротекторов в комплексе с непроникающими. Оптимальной комбинацией криозащитных веществ для эмбрионов млекопитающих является сочетание растворов глицерина и сахарозы, используемых в соотношении объемных концентраций приблизительно 3:2 [3, 9].

По аналогии с определением оптимального соотношения объемных концентраций глицерина и сахарозы [6, 9] и на основании анализа собственных эмпирических результатов, хорошо согласующихся с ними, установлено оптимальное соответствие концентраций эквilibрирующего и витрифицирующего растворов, применяемых при азотных скоростях охлаждения ($B_3 \approx 30^\circ\text{C}/\text{с}$). Согласно этому величина концентрации эквilibрирующего раствора должна быть приблизительно на 40% ниже концентрации витрифицирующего раствора.

Так как внеклеточный лед инициирует рост внутриклеточных кристаллов, то предполагается, что характер внутриклеточного кристаллообразования, отражающий динамику роста кристаллов во внеклеточной среде, имеет подобную зависимость в диапазоне сверхвысоких скоростей замораживания-оттаивания ($B \geq 80^\circ\text{C}/\text{с}$). На основании данных рассуждений нами была выдвинута следующая гипотеза. Для обеспечения высокого уровня сохранности эмбрионов млекопитающих, криоконсервируемых в условиях сверхбыстрого охлаждения и отогрева, минимальная величина концентрации эквilibрирующего раствора криопротектора должна быть приблизительно на 40% меньше величины общей концентрации витрифицирующего раствора криопротектора

$$C_{\text{min}}^i(B) = C_{\text{min}}^e(B) - 40,$$

где C_{min}^e — концентрация витрифицирующего раствора криопротектора.

Считаем, что полученная аналитическая зависимость позволяет определять минимальную концентрацию эквilibрирующего и витрифицирующего растворов криопротектора, обеспечивающую

As reported elsewhere [3, 9], maximum survival of thawed mammalian embryos, frozen with a traditional vitrification method (direct plunging of straws with the diameters of 1.8 mm into liquid nitrogen), is achieved when the solutions of penetrating cryoprotectants together with non-penetrating cryoprotectants are applied as cryopreservatives. The optimum combination of cryoprotective substances for mammalian embryos is a combination of solutions of glycerol and sucrose, used in a 3:2 ratio (volume concentrations) [3, 9].

Similarly to determining the optimum ratio of volume concentrations of glycerol and sucrose [6, 9] and analyzing the authors' own empirical results, nicely correlating with the above, the optimum correspondence of the concentrations of the equilibration and vitrification solutions, applied under nitrogen cooling rates ($B_{\text{fr}} \approx 30^\circ\text{C}/\text{s}$), was found. According to it the value of the concentration of the equilibration solution should be approximately 40% lower as compared with the concentration of the vitrification solution.

The intercellular ice initiates growth of the intracellular crystals, since it is supposed that the nature of the intracellular nucleation, which reflects the dynamics of crystal growth in the intercellular medium, has a similar dependence in the range of suprahigh rates of freeze-thawing ($B \geq 80^\circ\text{C}/\text{s}$). On the basis of these speculations the authors hypothesize on the following. To provide for a high level of survival of mammalian embryos, cryopreserved by snap cooling and warming, the minimum value of the concentration of the equilibrating solution of the cryoprotectant should be approximately 40% lower as compared with the value of total concentration of the cryoprotectant, comprising the vitrification solution,

$$C_{\text{min}}^i(B) = C_{\text{min}}^e(B) - 40,$$

where C_{min}^e is a concentration of the vitrification solution of the cryoprotectant.

The authors believe that the obtained analytical dependence permits to determine the minimum concentration of the equilibration and vitrification cryoprotective solutions, providing for a high level of survival of devitrified mammalian embryos, cryopreserved in a wide range of freeze-thawing rates. To verify the above assumption the authors staged a research on murine embryos vitrification in plastic capillaries with different external diameter. The embryos were divided into four groups according to the selected number of types of the capillaries (Table 3).

Murine embryos in the amount of 45 ± 5 pcs were frozen in every group. A reduction in the concentration of the intracellular cryoprotectant by 5% in groups 1, 2 and 3 resulted in the decrease in survival of biosystems down to 70.8 (34/48); 73.3 (33/45); 87.7% (43/49), respectively, thus indicating the optimum selection of the magnitude of the vitrification solution of the cryoprotectant in the authors' experiments.

высокий уровень сохранности девитрифицированных эмбрионов млекопитающих, криоконсервированных в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания. Для подтверждения правильности нашего предположения проведены исследования по витрификации эмбрионов мыши в пластиковых капиллярах, имеющих различный наружный диаметр. Согласно выбранному количеству типов капилляров эмбрионы были разделены на четыре группы (табл. 3).

Table 3
Dependence of survival of devitrified murine embryos on the concentrations of the equilibration and vitrification solutions of cryoprotectants in a wide range of freeze-thawing rates

Amount of embryos	Rate of freezing (thawing) B , °C/s	Concentration of the cryoprotectant			Survival of embryos S , %
		Equilibration solution (glycerol) C_i , % (V/V)	Vitrification solution		
			Glycerol C_e , % (V/V)	Sucrose C_e , % (V/V) (M)	
45	28 (42)	15	30	25 (0.73)	73.3 ^a
48	104 (126)	10	30	20 (0.58)	77.1 ^{a, b}
50	198 (216)	5	25	20 (0.58)	90 ^{b, c}
46	320 (380)	—	25	15 (0.44)	97.8 ^c

Note: similar superscripts denote the values, which do not significantly differ. Different superscripts show the values, which differ significantly with the probability

Зависимость сохранности девитрифицированных эмбрионов мыши от концентрации эквilibрирующего и витрифицирующего растворов криопротектора в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания

Количество эмбрионов	Скорость замораживания (оттаивания) B , °C/c	Концентрация криопротектора			Сохранность эмбрионов S , %
		Эквilibрирующий раствор (глицерин) C_i , % (V/V)	Витрифицирующий раствор		
			глицерин C_e , % (V/V)	сахароза C_e , % (V/V) (M)	
45	28 (42)	15	30	25 (0,73)	73,3 ^a
48	104 (126)	10	30	20 (0,58)	77,1 ^{a, b}
50	198 (216)	5	25	20 (0,58)	90 ^{b, c}
46	320 (380)	—	25	15 (0,44)	97,8 ^c

Примечание. Одинаковыми суперскриптами обозначены значения, которые достоверно не различаются между собой. Разные суперскрипты выделяют значения, которые различаются между собой достоверно с вероятностью не менее чем 0,95.

В каждой группе заморозили по 45 ± 5 эмбрионов мыши. Уменьшение концентрации внутриклеточного криопротектора на 5% в 1-, 2- и 3-й группах привело к снижению сохранности биообъектов до 70,8 (34/48); 73,3 (33/45); 87,7% (43/49) соответственно, что свидетельствует об оптимальности выбора величины эквilibрирующего раствора криопротектора в наших экспериментах.

Для выведения криопротектора девитрифицированные эмбрионы мыши помещали в раствор непроницающего криопротектора (сахарозы) концентрацией 0,7; 0,6; 0,5; 0,3 М соответственно для каждой установленной группы.

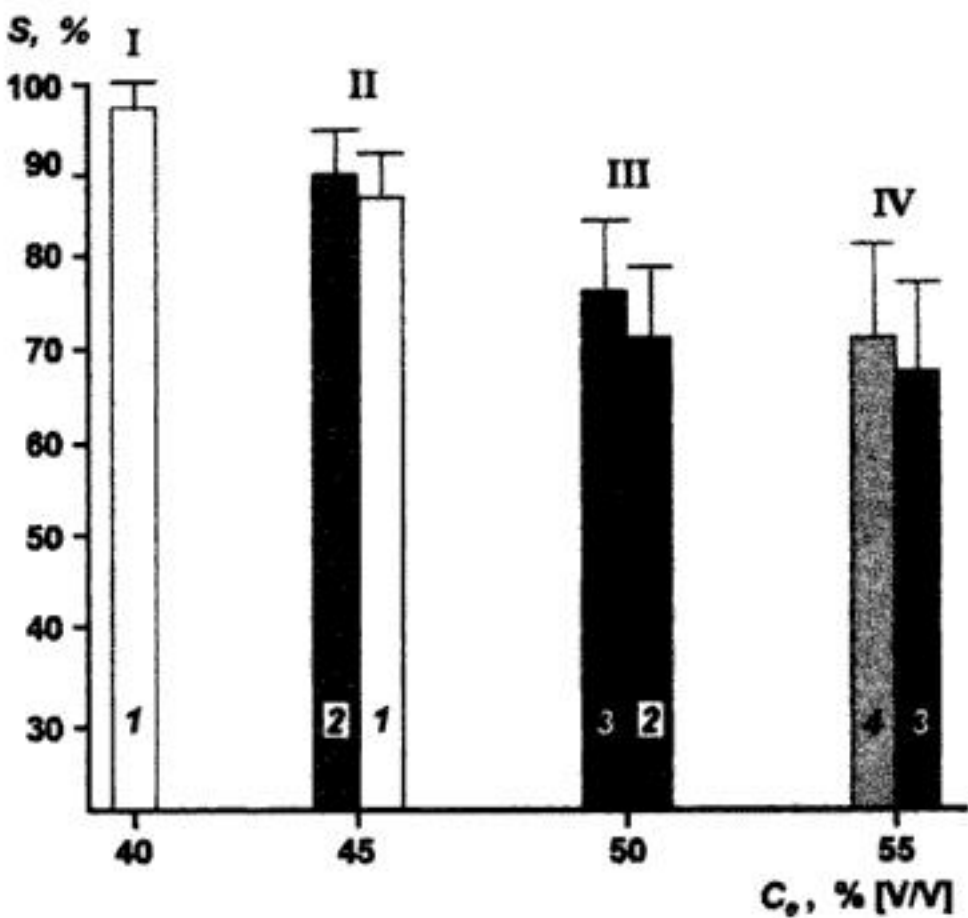
Результаты проведенных исследований подтверждают правильность нашего предположения о зависимости характера внутриклеточного кристаллообразования от концентрации криопротектора и скоростей замораживания-оттаивания (гистограмма).

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными в [6, 10]; в них замораживание эмбрионов млекопитающих проводили прямым погружением соломинок диаметром 1,8 мм в жидкий азот. Однако при сопоставлении величин скоростей теплообмена, установленных при замораживании-оттаивании эмбрионов млекопитающих в капиллярах диаметром 0,8 мм, с литературными данными наблюдается расхождение как по скоростям, так и по концентрациям криопротектора [11]. Это несоответствие объясняется приме-

Таблица 3

For elimination of the cryoprotectant the devitrified murine embryos were placed into the solution of the non-penetrating cryoprotectant (sucrose) with the concentrations of 0.7; 0.6; 0.5; 0.3 M, respectively, for every group.

The results of the investigations conducted support the authors' assumption on the dependence of the nature of the intracellular nucleation on the concentration of the cryo-



Уровень сохранности деконсервированных эмбрионов мыши S , замороженно-оттаянных при различных скоростях теплообмена и концентрациях эквilibрирующего C_i и витрифицирующего C_e растворов криопротектора, %: 1 — $C_i=0$; 2 — $C_i=5$; 3 — $C_i=10$; 4 — $C_i=15$. Скорости замораживания (оттаивания) B , °C/c: I — $B_3=320$ ($B_{от}=380$); II — $B_3=198$ ($B_{от}=216$); III — $B_3=104$ ($B_{от}=126$); IV — $B_3=28$ ($B_{от}=42$).

Level of survival of the thawed murine embryos S , frozen-thawed at various rates of heat exchange and concentrations of the equilibration C_i and vitrification C_e solutions of the cryoprotectant, %: 1 — $C_i=0$; 2 — $C_i=5$; 3 — $C_i=10$; 4 — $C_i=15$. Rates of freezing (thawing) B , °C/c: I — $B_{fr}=320$ ($B_{th}=380$); II — $B_{fr}=198$ ($B_{th}=216$); III — $B_{fr}=104$ ($B_{th}=126$); IV — $B_{fr}=28$ ($B_{th}=42$).

нением разных способов измерения скоростей и полуэмпирическим подходом к выбору минимальной концентрации эквilibрирующего раствора.

Таким образом, увеличение скорости теплообмена пластикового капилляра более чем в 10 раз относительно общепринятого способа витрификации ($B_3 \approx 30^\circ\text{C/s}$) дало возможность уменьшить концентрацию как эквilibрирующего, так и витрифицирующего растворов криопротектора на 15% и увеличить сохранность девитрифицированных эмбрионов мыши от 73,3 до 97,8%.

Минимальная величина концентрации эквilibрирующего раствора криопротектора, обеспечивающая высокий уровень сохранности эмбрионов, должна быть приблизительно на 40% меньше величины общей концентрации витрифицирующего раствора криопротектора в широком диапазоне скоростей замораживания-оттаивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безуглый Н. Д. Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов в биотехнологии воспроизведения сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. — Харьков, 1995. — С. 2–40.
2. Горбунов Л. В. Возможности получения сверхвысоких скоростей замораживания-оттаивания посредством использования пластиковых соломинок различного диаметра // Збірн. матеріалів II Міжнарод. конференції "Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях". — Київ: Аграрна наука, 1998. — С. 91–93.
3. Грищенко В. И., Осташко Ф. И., Исаченко В. В. и др. Получение, гипотермическое хранение, витрификация и сверхбыстрое замораживание трофобластических везикул // Пробл. криобиологии. — 1992. — № 4. — С. 32–36.
4. Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Лучко Н. А. Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиологии. — 1993. — № 3. — С. 3–13.
5. Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Лучко Н. А. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии. — 1994. — № 2. — С. 29–37.
6. Исаченко В. В., Грищенко В. И., Осташко Ф. И. и др. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов крыс и коров без "классической" эквilibрации // Пробл. криобиологии. — 1994. — № 3. — С. 3–7.
7. Кауффольд П., Тамм И., Шихов И. Я. и др. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота. — М.: Агропромиздат, 1990. — 56 с.
8. Манк М. Биология развития млекопитающих. — М.: Мир, 1990. — 406 с.
9. Isachenko V. V., Isachenko E. F., Ostashko F. I., Grishchenko V. I. Ultra-rapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants // Cryobiology. — 1997. — 34. — P. 157–164.
10. Massip A., Van der Zwaimen P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // Theriogenology. — 1987. — 27. — P. 69–79.
11. Vajta P., Holm, Callesen H. Open Pulled Straw [OPS] Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development. — 1998. — 51. — P. 53–58.

Поступила 08.06.2000

protectant and rates of freeze-thawing (histogram).

The results obtained nicely correlate with the data, reported elsewhere [6, 10], when freezing of mammalian embryos was done by direct plunging of the straws with the diameter of 1.8 mm into liquid nitrogen. However, a comparison of the rates of heat exchange, determined during freeze-thawing of mammalian embryos in the capillaries with the diameter of 0.8 mm, with the reported data shows diversification in the values of both the rates and concentrations of the cryoprotectant [11]. This discrepancy is probably due to the application of various methods of measuring the rates and semi-empiric approach to selecting the minimum concentration of the equilibration solution.

Thus, acceleration of the rate of heat exchange of the plastic capillary by more than 10-fold as compared with a routinely accepted method of vitrification ($B_{fr} \approx 30^\circ\text{C/s}$) permitted to reduce the concentrations of both vitrification and equilibration cryoprotectants by 15%, thus increasing survival of devitrified murine embryos from 73.3 to 97.8%.

Minimum value of the concentration of the vitrification solution of the cryoprotectant, providing for a high level of embryo survival, should be by approximately 40% lower as compared with the value of the total concentration of the vitrification solution of the cryoprotectant in a wide range of freeze-thawing.

REFERENCES

1. Bezugly N. D. Low temperature preservation of oocytes and embryos in biotechnology of reproduction of agricultural animals: Abstr. Theses Doctor Agricult. Sci. — Kharkov, 1995. — P. 2–40.
2. Gorbunov L. V. Possible achievement of suprahigh rates of freeze-thawing while using plastic straws of various diameters // Collection of materials of the II Int. Conf. "Application of modern molecular-genetic and biotechnological developments in genetic-selective research". — Kiev: Agrarna nauka publ. — 1998. — P. 91–93.
3. Grishchenko V. I., Ostashko F. I., Isachenko V. V. et al. Harvesting, hypothermic storage, vitrification and snap freezing of trophoblastic vesicles // Probl. kriobiol. — 1992. — № 4. — P. 32–36.
4. Grishchenko V. I., Kalugin Yu. V., Luchko N. A. Suprahigh rates of cooling and vitrification solutions in cryobiology // Probl. kriobiol. — 1993. — № 3. — P. 3–13.
5. Grishchenko V. I., Kalugin Yu. V., Luchko N. A. Some aspects of cryopreservation of embryos and spermatozoa // Probl. kriobiol. — 1994. — № 2. — P. 29–37.
6. Isachenko V. V., Grishchenko V. I., Ostashko F. I. et al. Snap freezing of embryos of rats and cows without "classic" equilibration // Probl. kriobiol. — 1994. — № 3. — P. 3–7.
7. Cauffold P., Tamm I., Shikhov I. Ya. et al. Evaluation of the quality of cattle embryos. — M.: Agropromizdat publ., 1990. — 56 p.
8. Mank M. Biology of mammalian development. — M.: Mir publ., 1990. — 406 p.
9. Isachenko V. V., Isachenko E. F., Ostashko F. I., Grishchenko V. I. Ultra-rapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants // Cryobiology. — 1997. — 34. — P. 157–164.
10. Massip A., Van der Zwaimen P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos // Theriogenology. — 1987. — 27. — P. 69–79.
11. Vajta P., Holm, Callesen H. Open Pulled Straw [OPS] Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos // Molecular reproduction and development. — 1998. — 51. — P. 53–58.

Accepted in 08.06.2000

Изучение реакции амидов с оксидом этилена для оптимизации состава криопротектора.

I. Аддукты N-ацетилэтанолamina

В. В. ЧЕКАНОВА, Л. А. ХАНИНА, В. И. ЛУГОВОЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Investigation of Amides Reacting with Ethylene Oxide for Optimization of Cryoprotectant Composition.

I. Adducts of N-acetyl Ethanolamine

V. V. CHEKANOVA, L. A. KHANINA, V. I. LOUGOVOY

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

Исследован качественный и количественный состав образцов криопротектора — оксиэтилированного N-ацетилэтанолamina (ОЭ N-АцЭА), полученных при вариации условий реакции оксиэтилирования. Определены оптимальные условия получения криопротектора.

Досліджено якісний і кількісний склад зразків криопротектора — оксиетильованого N-ацетилетаноламіну (ОЕ N-АцЕА), одержаних при варіації умов реакції оксиетильовання. Визначено оптимальні умови отримання криопротектора.

The authors investigated qualitative and quantitative compositions of the samples of the cryoprotectant oxyethylated N-acetyl ethanolamine (OE N-AcEA), obtained when varying the conditions of the oxyethylation reaction. The optimum conditions for synthesizing the cryoprotectant were determined.

Впервые амиды низкомолекулярных алифатических кислот (НМАК) как криозащитные соединения испытаны в 50-е годы [14]. Однако широкого распространения такие криопротекторные соединения, как многоатомные спирты, не получили вследствие их токсичности как на организменном, так и клеточном уровнях [1]. В [2] было показано цитотоксическое действие амидов НМАК. Из большого количества указанного класса соединений нашли применение при криоконсервировании спермы птиц только моно- и диметилзамещенные амиды муравьиной и уксусной кислот [5].

Введение в N-ацетильную группу более тяжелых алкильных радикалов (N-этилацетамид, N-пропил-, N-бутил-), как и использование амидов жирных кислот с более длинными цепями (пропионовой, масляной), приводит к увеличению цитотоксичности амидов и разрушению клеток костного мозга, эритроцитов еще на стадии эквilibрации [7].

Амиды карбоновых кислот являются удобным объектом для модификации их структуры, физико-химических и, следовательно, криопротекторных свойств, а также токсичности.

Исследования, проведенные в области модификации структуры амидов НМАК и их криозащитных свойств, свидетельствуют о том, что взаимодействие их с оксидом этилена (ОЭ) позволяет получить вещества с различной молекулярной массой и низкой токсичностью [9, 10], а это делает модифицированные амиды НМАК перспективными

For the first time amides of low molecular aliphatic acids (LMAA) were tested as cryoprotective compounds in the 50ies. However, such cryoprotective compounds, as multiatomic alcohols, were not granted wide application due to their toxicity at the organismic and cell levels [1]. Some researchers reported on the cytotoxic action of LMAA. Out of the huge amount of the above class of compounds only mono- and dimethyl-substituted amides of the formic and acetic acids were applied for cryopreservation of the bird spermatozoa [5].

Injection of the heavier alkyl radicals (N-acetyl-, N-propyl-, N-butyl-) into the N-acetylic group, as well as application of fatty acid amides with longer chains (propionic, butyric), increase cytotoxicity of amides and destruction of bone marrow cells and red cells already at the stage of equilibration [7].

Amides of carbonic acids are a suitable model for modifying their structure, physical-chemical and, consequently, cryoprotective properties, as well as toxicity.

The research, done on modification of the structure of the LMAA amides and their cryoprotective properties, demonstrate that their interaction with ethylene oxide (EO) permits to obtain substances with different molecular mass and low toxicity [9, 10], thus making the modified LMAA amides very promising for synthesizing new exocellular cryoprotectants.

The interaction of amides with EO is complicated by occurrence of certain side effects/reactions, and it

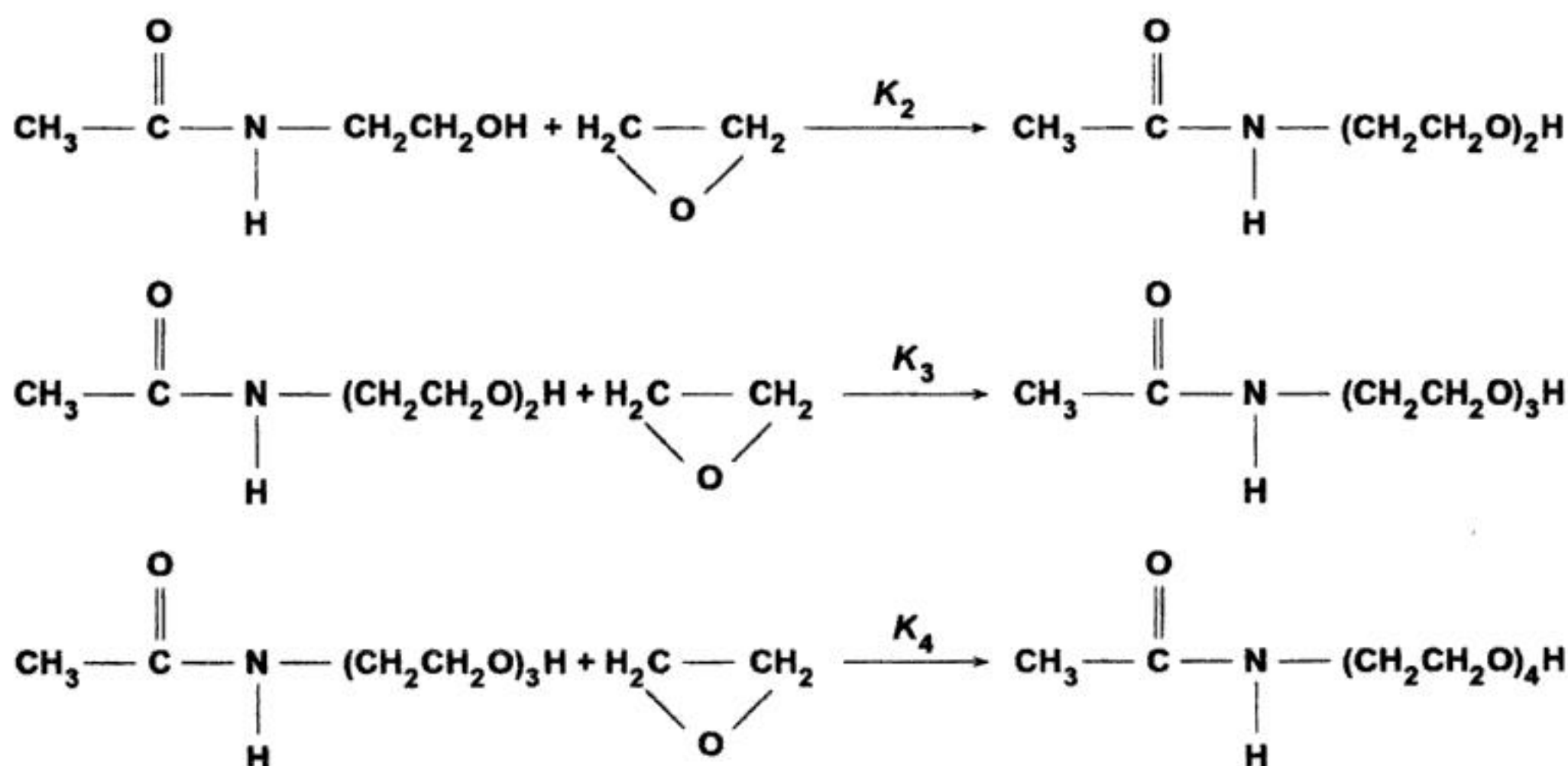
ми при создании новых экзоцеллюлярных криопротекторов.

Взаимодействие амидов с ОЭ осложнено протеканием ряда побочных реакций, определяется структурой и природой амида, температурой проведения реакции, полярностью среды и степенью оксиэтилирования [12]. Вариацией указанных параметров реакции можно получить этоксилаты амидов, отличающиеся не только длиной цепи (т.е. молекулярной массой), но и молекулярно-массовым распределением олигомергомологов в их составе.

В исследованиях, выполненных в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины, были показаны зависимость криопротекторной активности полимера (ПЭО-400, этоксилата N-АцЭА) от молекулярно-массового распределения в образце и целесообразность стабилизации его состава для получения оптимальных результатов криозащиты клеточных суспензий [8].

Для определения параметров реакции синтеза этоксилата N-АцЭА с максимальным выходом низкомолекулярных полимергомологов ($n = 3$ и $n = 4$) изучены кинетические параметры реакции взаимодействия N-АцЭА с ОЭ.

В соответствии с данными о механизме реакции оксиэтилирования [13] процесс последовательного присоединения ОЭ к исходному N-АцЭА можно представить схемой:



Реакцию N-АцЭА проводили в автоклаве емкостью 0,1 л по методике [6]. Пробы отбирали через каждые 10 мин. Об окончании реакции судили по падению давления в автоклаве до исходного (1–2 атм).

Полученные пробы, содержащие аддукты ОЭ N-АцЭА, анализировали на газожидкостном хроматографе ЛХМ-80 с пламенно-ионизационным детектором. При соблюдении условий разработано-

is determined by the structure and nature of the amid, temperature of the reaction staging, polarity of the medium and extent of oxyethylation [12]. By varying the parameters of the reaction one can obtain etoxylates of amides, which differ not only in the length of the chain (i.e. molecular mass), but also in the molecular-mass distribution of oligomer-homologues within their composition.

The research, staged earlier at the Department of Cryoprotectant of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, demonstrated the dependence of the cryoprotective activity of the polymer (PEO-400, N-AcEA etoxylate) on the molecular-mass distribution in the sample and the expediency of stabilizing its composition for obtaining the optimum yield of cryoprotection of cell suspensions [8].

With the aim of determining the reaction parameters of synthesis of the N-AcEA etoxylate with the maximum yield of low molecular polymer homologues ($n = 3$ and $n = 4$) the authors investigated kinetic parameters of the reaction of interaction of AcEA with EO.

In accordance with the data on the mechanism of the oxyethylation reaction [13], the process of successive adjunction of EO to the original AcEA may be represented as follows:

The reaction of N-AcEA was staged in the autoclave with the volume of 0.1 l as described elsewhere [6]. The samples were taken every 10 min. Termination of the reaction was verified by the pressure drop in the autoclave down to the original level (1–2 atm).

The collected samples, containing the adducts of EO with N-AcEA, were analyzed with a LXM-80 gas-liquid chromatograph with a flame-ionizing detector. Providing the conditions of the developed method of analysis were observed, which was described else-

го метода анализа, описанного в [11], хроматограмма представлена в виде четко разделенных симметричных пиков, соответствующих триметилсилильным эфирам аддуктов этоксила.

Количественный анализ хроматографических пиков проводился по методу внутренней нормализации [3]. Оксид этилена, остаточные количества которого в виде не вступившего в реакцию вещества должны находиться в данной пробе, испарялся в процессе ее исследования как сильнолетучее вещество ($t_{\text{кип}} = 10,7^\circ\text{C}$). Поэтому масса хроматографического вещества (%) не соответствует реальной массе:

$$\Sigma_{\text{хр}} = n_1 + n_2 + \dots + n_i + \text{ДЭГ} + \text{ТЭГ} + \text{тетра},$$

$$\Sigma_{\text{хр}} = n_1 + n_2 + \dots + n_i + \text{ДЭГ} + \text{ТЭГ} + \text{тетра} + \text{ОЭ},$$

где $n_1 \dots n_i$ — оксиэтилированные полимергомологи с i -м числом оксиэтильных звеньев; ДЭГ, ТЭГ, тетра — ди-, три-, тетраэтиленгликоль соответственно, %.

Тогда массу хроматографического образца (г) можно рассчитать по формуле

$$\Sigma_{\text{хр}} =$$

$$= \frac{B \cdot 100\%}{n_1 - n_2(M_{n1}/M_{n2}) + n_3(M_{n1}/M_{n3}) - \dots n_i(M_{n1}/M_{ni})},$$

где B — количество исходного амида; $M_{n1} \dots M_{ni}$ — молекулярные массы полимергомологов, г. Реальная масса каждого компонента смеси (г) рассчитывается по формуле

$$Mn_{ip} = \frac{Mn_i}{100\%} \Sigma_{\text{хр}}.$$

Суммарная масса компонентов смеси

$$M_{\text{ср}} = M_{n1} X_1 + M_{n2} X_2 + \dots + M_{ni} X_i +$$

$$+ M_{r1} X_1 + M_{r2} X_2 + \dots + M_{ri} X_i,$$

где M_{ni} — молекулярная масса полимергомологов с i -м числом оксиэтильных групп; X — масса хроматографического образца, г; M_{ri} — молекулярная масса ПЭГ.

В основе расчета использовано предположение о равенстве скоростей последовательно-параллельных реакций процесса оксиэтилирования N-АцЭА, начиная со второй ($K_0 \gg K_1 \neq K_2 = K_3 = \dots = K_i$). В этом случае уравнение расчета состава полимергомологов имеет вид, представленный в [4].

По экспериментальным данным получены зависимости изменения концентрации полимергомологов N-АцЭА и ПЭГ (в мольных долях) во времени при температуре 90–120 °C (табл. 1). Таким образом, данные кинетических экспериментов представляют собой набор концентраций компонентов реагирующей системы в мольных долях при различных значениях времени (рисунок).

В табл. 1 приведены значения концентраций компонентов в этоксилах N-АцЭА, полученных

где [11], the chromatogram is represented in the form of clearly cut symmetrical peaks, corresponding to trimethyl silyl ethers of the etoxylate adducts.

Quantitative analysis of chromatographic peaks was done with the method of inner normalization [3]. Ethylene oxide, the residual amounts of which in the form on the non-reacted substance should be present in the given sample, evaporated during the research, being a strongly volatile substance ($t_{\text{boil}} = 10.7^\circ\text{C}$). That is why the mass of the chromatographic substance does not correspond to the real mass:

$$\Sigma_{\text{ch}} = n_1 + n_2 + \dots + n_i + \text{DEG} + \text{TEG} + \text{tetra},$$

$$\Sigma_{\text{ch}} = n_1 + n_2 + \dots + n_i + \text{DEG} + \text{TEG} + \text{tetra} + \text{EO},$$

where $n_1 \dots n_i$ are the oxyethylated polymer homologues with an i number of the oxyethyl links; DEG, TEG, tetra are di-, tri-, tetraethylene glycol, respectively, %.

Then the mass of the chromatographic sample (g) may be calculated with the formula

$$\Sigma_{\text{ch}} =$$

$$= \frac{B \cdot 100\%}{n_1 - n_2(M_{n1}/M_{n2}) + n_3(M_{n1}/M_{n3}) - \dots n_i(M_{n1}/M_{ni})},$$

where B is the amount of the original amid, $M_{n1} \dots M_{ni}$ are the molecular masses of polymer homologues, g. The real mass of every component of the mixture (g) is calculated with a formula

$$Mn_{ip} = \frac{Mn_i}{100\%} \Sigma_{\text{ch}}.$$

Summary mass of the component of the mixture is

$$M_{\text{ave}} = M_{n1} X_1 + M_{n2} X_2 + \dots + M_{ni} X_i +$$

$$+ M_{r1} X_1 + M_{r2} X_2 + \dots + M_{ri} X_i,$$

where M_{ni} is a molecular mass of polymer homologues with the i number of oxyethyl groups; X is a mass of the chromatographic sample, g; M_{ri} is a molecular mass of PEG.

The calculation is based on the assumption of the equality of the rates of successive-parallel responses of the process of oxyethylation of AcEA, starting from the second one ($K_0 \gg K_1 \neq K_2 = K_3 = \dots = K_i$). In this case the equation for calculating the compositions of polymer homologues is of the form, described elsewhere [4].

The experimental data obtained permitted to determine the time-course dependencies of changes in the concentrations of polymer homologues of AcEA and PEG (in molar shares) at the temperature of 90–120 °C (Table 1). Thus, the data of the kinetic experiments represent a set of concentrations of the components of the reacting system in molar shares at different periods of time (Figure).

When analyzing the results of synthesis of OE NcAE, performed at 90 °C in the presence of a CON catalyst with a molar ratio of OE:amid of 4:1, it should

Таблица 1

Table 1

Зависимость молекулярно-массового распределения полимергомологов в этоксилатах N-АцЭА от условий синтеза

Dependence of the molecular mass distribution of polymer homologues in AcEA etoxylates on the conditions of synthesis

Условия синтеза Conditions of synthesis				Содержание компонентов (n_i) ОЭ N-АцЭА (ПЭО), м.д. Content of components (n_i), molar share of EO N-AcEA (PEO)						
Катализатор Catalyst	Соотношение амид:ОЭ Ratio of amid:EO	Температура, °C Temperature, °C	Время, мин Time, min	2	3	4	5	6	7	8
—	1:4	90	100	0,1 (0,04)	0,11 (0,04)	0,15 (0,04)	0,14 (—)	0,06 (—)		
		100	70	0,08 (0,03)	0,12 (0,03)	0,14 (0,05)	0,16 (0,05)	0,08 (—)		
		110	60	0,07 (0,04)	0,15 (0,05)	0,15 (0,04)	0,09 (—)	0,05 (—)		
		120	50	0,07 (0,14)	0,09 (0,14)	0,09 (0,14)	0,06 (—)	0,02 (—)		
KOH	1:4	90	120	0,28 (0,1)	0,37 (0,09)	0,24 (0,06)	0,12 (0,12)	0,02 (0,02)		
		100	70	0,18 (0,03)	0,4 (0,07)	0,36 (—)	0,12 (—)	0,01 (—)		
		110	40	0,15 (0,06)	0,2 (—)	0,32 (—)	0,2 (—)	0,15 (—)		
—	1:6	90	180	0,12 (0,1)	0,09 (0,04)	0,09 (0,06)	0,08 (—)	0,14 (0,05)	0,15 (0,07)	0,12 (0,07)
		100	90	0,07 (—)	0,13 (—)	0,17 (—)	0,17 (—)	0,12 (0,13)	0,1 (0,14)	0,12 (0,09)

при различных соотношениях его с ОЭ в интервале 90–120 °C.

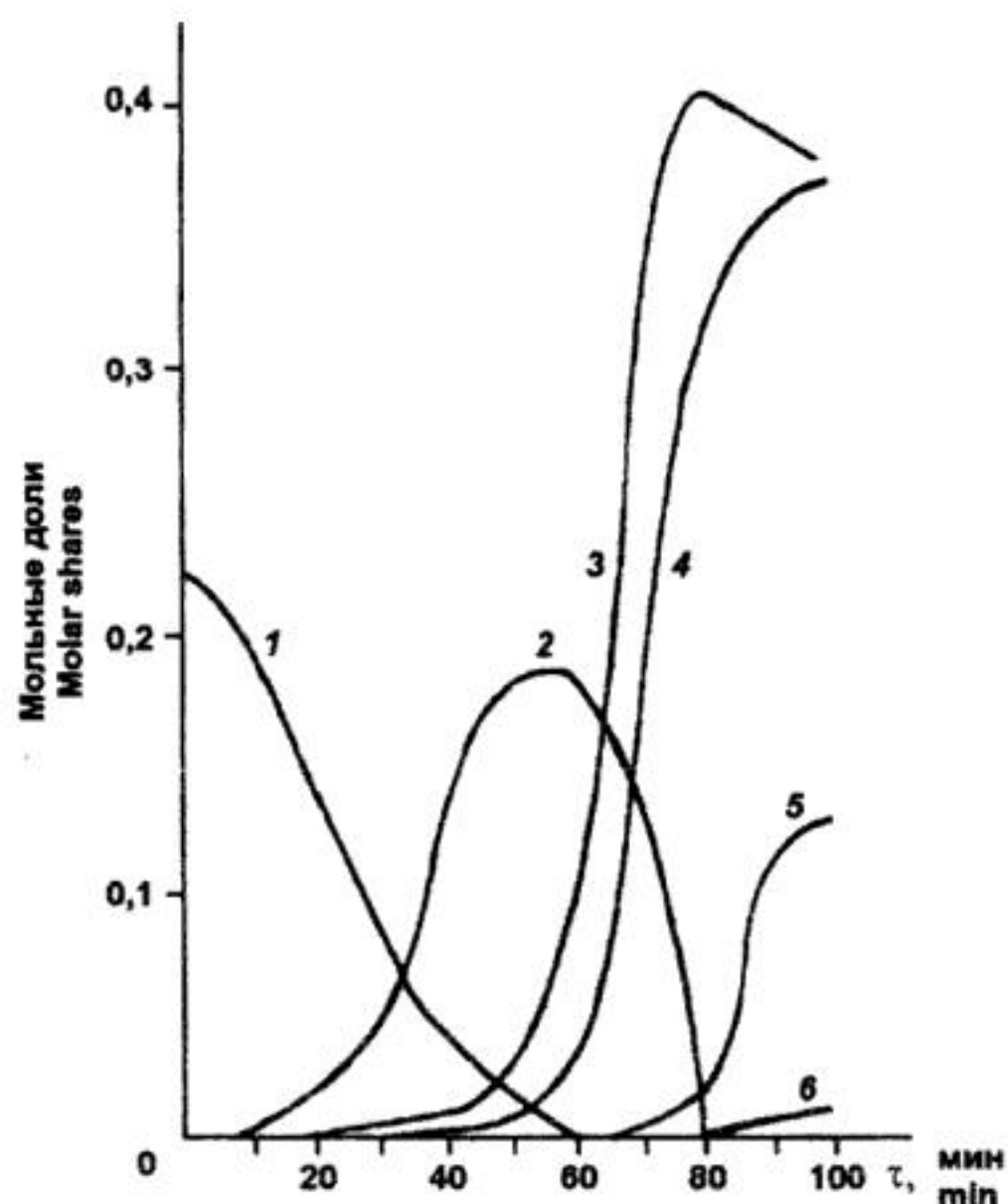
Проанализировав результаты синтеза ОЭ N-АцЭА, проведенного при 90 °C в присутствии катализатора KOH с мольным соотношением ОЭ:амида 4:1, следует отметить, что при данных условиях в течение 120 мин наблюдается увеличение содержания полимергомологов со степенью полимеризации $n=2$ до 0,2839, $n=3$ — до 0,37 и $n=4$ — до 0,24 мольных долей. Отмечено образование полимергомологов со степенью полимеризации $n=5$ и $n=6$, но содержание их незначительно.

При проведении реакции при 100 °C максимальное содержание полимергомологов $n=3$ и $n=4$ достигается через 70 мин от начала реакции и составляет 0,39 и 0,36 мольных долей соответственно. Следует отметить уменьшение содержания в реакционной смеси полимергомологов со степенью полимеризации $n=2, 5, 6$. Дальнейшее увеличение температуры реакции до 110 °C приводит к образованию 8 полимергомологов ОЭ N-АцЭА. Содержание основных компонентов с $n=3, 4$ (обладающих максимальной криозащитной активностью) значительно уменьшается.

При соотношении ОЭ и N-АцЭА 4:1 в диапазоне температур 90–120 °C исследован молекулярно-массовый состав этоксилата, синтезированного без катализатора. Как следует из приведенных в табл. 1 данных, отсутствие катализатора значительно сказывается на составе конечного продукта при 90 °C: уменьшена доля компонентов с $n=3, 4$ и увеличена доля полимергомологов с $n=5, 6$. Такой же характер течения реакции наблюдается при температуре 100 °C. При 110–130 °C основных компонентов с $n=3, 4$ становится еще меньше и не превышает 0,10–0,15 мольных долей. Содержание сопутствующих полимергомологов $n=5, 6, 7$ значительно возрастает. Так, доля полимергомологов с $n=5$ становится сравнимой с основными, а при температурах 100 и 130 °C даже превышает их.

be noted that under the given conditions there is observed an increase in the content of polymer homologues with the extent of polymerization of $n=2$ up to 0.2839, of $n=3$ — up to 0.37, and of $n=4$ — up to 0.24 molar shares. Formation of polymer homologues with the extent of polymerization of $n=5$ and $n=6$ was reported, though their content was insignificant.

When the reaction is staged at 100 °C, the maximum content of polymer homologues of $n=3$ and $n=4$ is achieved in 70 min from the start of the reac-



Изменение мольных долей полимергомологов во времени при 100 °C в присутствии катализатора, соотношении ОЭ:амида 4:1 для ОЭ N-АцЭА: 1–6 — компоненты смеси.

The time-course change of molar shares of polymer homologues at 100 °C in presence of catalyst, with ratio of ethylen:amid of 4:1 for EO N-AcEA: 1–6 — mixture components.

Сравнением составов этоксилатов, полученных при одинаковом мольном соотношении реагентов и проведении реакции в одном и том же температурном интервале, установлено, что в присутствии катализатора значительно увеличиваются скорость реакции, выход целевого компонента, достигая максимального значения (0,4 м.д.) для каждого компонента. Однако в присутствии катализатора с повышением температуры наблюдается быстрый рост компонента с $n = 6$. Следовательно, повышать температуру выше 100 °C при проведении реакции нецелесообразно.

Для выяснения влияния исходных реагентов на состав этоксилата исследовано соотношение ОЭ:амида 6:1 при температурах 90 и 100 °C без катализатора. При анализе молекулярно-массового состава этоксилата обнаружено увеличение числа полимергомологов до 9 по сравнению с этоксилатом, когда соотношение реагентов было 4:1. При соотношении 6:1 мольная доля компонентов с $n = 3, 4$ составляет не более 0,08–0,10, резко возрастает содержание гомологов с $n = 5–7$, появляются гомологи с $n = 9, 10, 11$. Повышение температуры приводит к значительному увеличению доли высокомолекулярных компонентов в этоксилате (табл. 1).

Таким образом, сравнение молекулярно-массового распределения этоксилатов при разном мольном соотношении ОЭ:амида 6:1, 4:1 показывает, что с увеличением содержания ОЭ в реакционной смеси уменьшается содержание целевых компонентов с одновременным увеличением содержания полимергомологов с длинными цепями ($n > 7$).

Главными побочными продуктами при синтезе ОЭ амидов являются полиэтиленгликоли (ПЭГ), образующиеся при его полимеризации.

Содержание ПЭГ определяли также методом газожидкостной хроматографии. Полиэтиленгликоли представляют собой простейший тип аддуктов, поэтому можно ожидать, что их распределение будет основано на формуле Пуассона [8].

По экспериментальным данным были получены зависимости изменения мольных долей ПЭГ при температурах 90–130 °C, мольном соотношении 4:1 (в присутствии катализатора), 6:1, 4:1 (без катализатора), аналогичные для ОЭ амидов, приведенных на рисунке.

Как следует из табл. 1, при 90 °C и мольном соотношении ОЭ:N-АцЭА 4:1 в присутствии катализатора образуются 5 полимергомологов ПЭГ, суммарная мольная доля которых составляет 0,39.

При 100 °C образуются 2 полимергомолога ПЭГ с $n = 1, 2$, содержание их смеси составляет 0,10 мольных долей, при 110 °C — один полимергомолог с $n = 2$, мольная доля которого 0,06.

При мольном соотношении ОЭ:амида 6:1 без катализатора при 90 °C образуются 8 полимергомологов ПЭГ с содержанием в сумме 0,39 мольных долей. При повышении температуры до 100 °C образуются 10 полимергомологов ПЭГ с содержа-

нием, и comprises 0.39 and 0.36 molar shares, respectively. Here a reduction of the content of polymer homologues with the extent of polymerization of $n = 2, 5, 6$ in the reactive mixture should be mentioned. Further rise in the reaction temperature up to 110 °C results in the formation of 8 polymer homologues of EO NcEA. The content of the basic components with $n = 3–4$ (which possess maximum cryoprotective activity) is significantly reduced.

The authors studied the molar-mass composition of etoxylate, synthesized without a catalyst, when the ratio of EO to N-AcEA was 4:1 in the temperature range of 90–120 °C. It follows from the data in Table 1 that the absence of a catalyst significantly affects the composition of the finite product at 90 °C — the portion of the components with $n = 3, 4$ is reduced, and the portion of polymer homologues with $n = 5, 6$ is increased. The reaction occurs similarly at 100 °C. At 110–130 °C the amount of the basic components with $n = 3, 4$ is further reduced and does not exceed 0.10–0.15 molar shares. The content of the accompanying polymer homologues with $n = 5, 6, 7$ increases significantly. For example, the portion of the polymer homologue with $n = 5$ becomes comparable with the basic features, and at the temperatures of 100 and 130 °C even exceeds it.

A comparative analysis of etoxylates, obtained under similar molar ratio of the reagents and when staging a reaction within one and the same temperature range, shows that in the presence of the catalyst the reaction is significantly accelerated, the yield of the finite component reaches the maximum value (0.4 m.s.) for every component. However, in the presence of the catalyst the amount of the component with $n > 6$ grows quickly with a rise in temperature. Hence, it is not expedient to rise the temperature above 100 °C when staging the reaction.

To reveal the influence of the original reagents on the etoxylate composition the authors investigated the ratio of EO to amid of 6:1 at the temperatures of 90 and 100 °C without a catalyst. The analysis of the molecular-mass composition of etoxylate demonstrated an increase in the amount of polymer homologues up to 9 as compared with etoxylate, when the ratio of the reagents was 4:1. And when the ratio was 6:1 the molar share of the components with $n = 3, 4$ is not more than 0.08–0.10, the number of homologues with $n = 5–7$ sharply increases, and the homologues with $n = 9–11$ appear. A rise in the temperature results in the considerable increase in the share of the highly molecular components in etoxylate (Table 1).

Thus, a comparison of the molecular-mass distribution of etoxylates during different molar ratios of EO to amid of the values of 6:1, 4:1, demonstrates that an increase in the EO content in the reactive mixture reduces the content of the finite components, simultaneously increasing the content of polymer homologues with long chains ($n > 7$).

ем менее 0,40 мольных долей. Максимальное количество их приходится на гомолог с $n = 7$, его содержание соответствует 0,14 мольным долям.

Таким образом, с повышением температуры при мольном соотношении ОЭ:амида 6:1 образуется большее количество ПЭГ в конечном продукте — ОЭ N-АцЭА.

Из данных табл. 1 видно, что с мольным соотношением ОЭ:амида 4:1 в реакционной смеси без катализатора при проведении реакции при 90 °C образуются 3 полимергомолога ПЭГ, при этом содержание ПЭГ составляет 0,12 мольных долей, при 100–110 °C их содержание увеличивается до 0,14–0,42.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что наименьшее количество ПЭГ содержится в продукте, полученном при оксиэтировании N-АцЭА в мольном соотношении ОЭ:амида 4:1 в присутствии катализатора и температуре реакции 100, 110 °C (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость содержания ПЭГ в ОЭ N-АцЭА от условий синтеза

Dependence of PEG content in EO Nc-EA on conditions of synthesis

Температура, °C Temperature, °C	Катализатор Catalyst	Концентрация катализатора, моль Catalyst concentration, mol	Мольное соотношение реагентов Molar ratio of reagents	Суммарная доля ПЭГ Summary share of PEG
90	—	—	0,13:0,8	0,39
100	—	—	0,13:0,8	0,40
90	КОН	0,008	0,13:0,54	0,39
100	КОН	0,008	0,13:0,54	0,10
110	КОН	0,008	0,13:0,54	0,06
90	—	—	0,13:0,54	0,12
100	—	—	0,13:0,54	0,16
110	—	—	0,13:0,54	0,13
120	—	—	0,13:0,54	0,42
130	—	—	0,13:0,54	0,24

Таким образом, исследование молекулярно-массового состава этоксилов N-АцЭА показало, что их молекулярно-массовое распределение в значительной мере определяется условиями проведения реакции оксиэтирования.

В присутствии катализатора увеличивается скорость процесса, при этом меньше образуется ПЭГ как примесей. Повышение мольного соотношения ОЭ:амида 4:1 до 6:1 приводит к значительному увеличению количества полимергомологов ОЭ N-АцЭА в конечном продукте, а также повышению содержания ПЭГ. Изучение побочной реакции образования ПЭГ показало, что количество образующихся ПЭГ также зависит от степени оксиэтирования. Температура процесса оксиэтирования оказывает влияние на образование ПЭГ: с увеличением температуры количество ПЭГ возрастает. Показано, что минимальное количество полиэтиленоксида образуется при соотношении ОЭ:амида 4:1, температуре 100–110 °C, времени реакции 50–140 мин в присутствии катализатора КОН (0,008 моль).

The major side products during synthesis of the amid EO are polyethylene glycols (PEG), which are formed during its polymerization.

The content of PEG was also determined with a method of a gas-liquid chromatography. Polyethylene glycols are the simplest type of adducts, hence their distribution may be expected to be based on the formula of Poissons [8].

The experimental data obtained were used for plotting the dependencies of changes in molar shares of PEGs at the temperatures of 90–130 °C, molar ratio of 4:1 (in the presence of a catalyst), 6:1, 4:1 (without a catalyst), which were similar to the amid EO, shown in the Figure.

It follows from Table 1 that at 90-symbol P roman C and molar ratio of EO to N-AcEA of 4:1 in the presence of a catalyst 5 polymer homologues of PEG are formed, the summary molar share of which is 0.39.

At 100 °C 2 polymer homologues of PEG are formed with $n = 1, 2$, their content in the mixture is 0.10 molar shares, and at 110 °C — 1 polymer homologue with $n = 2$, the molar share of which is 0.06.

When the molar ratio of EO to amid is 6:1 without a catalyst and at the temperature of 90 °C 8 polymer homologues of PEG are formed, and their summary content equals 0.39 molar shares. When the temperature is risen up to 100 °C, 10 polymer homologues of PEG are formed with the content of less than 0.40 molar shares. Their maximum amount falls onto the homologue with $n = 7$, and its content corresponds to 0.14 molar shares.

Thus, a rise in the temperature when the molar ratio of EO to amid is 6:1 results in the formation of a larger amount of PEG in the finite product — EO-NcEA.

It follows from Table 1 that when the molar ratio of EO to amid is 4:1 in the reactive mixture without a catalyst 3 polymer homologues of PEG are formed during the reaction at 90 °C, and the content of PEG is 0.12 molar shares; at 100–110 °C their content increases up to 0.14–0.42.

On the basis of the data obtained it may be concluded that the lowest amount of PEG is contained in the product, obtained during oxyethylation of N-AcEA with a molar ratio of EO:amid of 4:1 in the presence of a catalyst and the temperature of the reaction of 100, 110 °C (Table 2).

Thus, a study of the molecular-mass composition of the N-AcEA etoxylates showed that their molecular-mass distribution is greatly dependent on the conditions of staging the oxyethylation reaction.

In the presence of a catalyst the rate of the process occurrence is accelerated significantly, and the amount of the PEGs formed as adducts is reduced. A rise in the molar ratio of the EO:amid of 4:1 up to 6:1 results in a considerable increase in the amount of

Таким образом, оптимальными условиями получения целевого продукта ОЭ N-АцЭА со степенью полимеризации $n = 3, 4$ являются: температура 100 °С, время реакции 70 мин, мольное соотношение ОЭ:амида 4:1 в присутствии катализатора КОН в количестве 0,008 молей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Вредные вещества в промышленности* / Под ред. Н. В. Лазарева. — Л.: Химия, 1976. — Т. 1. — 590 с.
2. Гучок В. М., Чеканова В. В., Мельник А. П., Луговой В. И. Оксигетилирование амидов алифатических низкомолекулярных кислот как экспериментальный подход для получения новых нетоксичных криопротекторов // *Криобиология*. — 1994. — № 3. — С. 30–34.
3. Закупра В. А. Методы анализа и контроля в производстве поверхностно-активных веществ. — М.: Химия, 1977. — 366 с.
4. Кирилкин А. И. Молекулярно-массовый состав полимергомологов оксигетилированного нонилфенола и его влияние на функциональные свойства ПАВ: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. — М., 1987. — 16 с.
5. Линник Т. П. Зависимости криопротекторной активности соединений ряда амидов от их физико-химических свойств: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 19 с.
6. Луговой В. И., Ханина Л. А., Шраго М. И., Чеканова В. В. Синтез, структура, криопротекторные свойства оксигетилированных амидов при применении их для консервирования клеточных суспензий // *Патофизиологические аспекты действия холода на организм: Сб. науч. тр.* — Харьков, 1989. — С. 89–93.
7. Ханина Л. А., Луговой В. И., Шраго М. И. Современные аспекты проблемы поиска и создания криопротекторов // *Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии: Сб. науч. тр.* — Харьков, 1992. — С. 67–77.
8. Ханина Л. А., Луговой В. И., Шраго М. И. и др. Криопротекторные свойства ПЭО-400 в зависимости от молекулярно-массового распределения // *Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. тр.* — Харьков, 1990. — С. 76–81.
9. Чеканова В. В., Ханина Л. А., Луговой В. И., Петренко Т. А. Цитотоксичность и криопротекторная активность оксигетилированных амидов при криоконсервировании переливаемой культуры СПЭВ // *Пробл. криобиологии*. — 1995. — № 1. — С. 37–42.
10. Чеканова В. В., Ханина Л. А., Мазалов В. К., Луговой В. И. Цитотоксичность и криопротекторная активность оксигетилированных амидов при криоконсервировании клеток костного мозга // *Пробл. криобиологии*. — 1995. — № 2. — С. 36–39.
11. Чеканова В. В. Синтез, токсичность и криопротекторная активность оксигетилированных амидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1993. — 17 с.
12. Шенфельд Н. Поверхностно-активные вещества на основе оксида этилена. — М.: Химия, 1982. — 749 с.
13. А. с. 663698 СССР С08G65/22: С08G65/26. Полимеры замещенного глицидамида и его сополимеры с окисью этилена в качестве модели плазмозаменителя и способ их получения / Т. Н. Куреньгина, Л. В. Алферова, Е. Б. Топоркова, В. А. Кропачева // *Открытия. Изобретения*. — 1972. — № 19. — С. 81.
14. Karow A. M. Cryopreservation: pharmacological consideration. Organ preservation for transplantation. — Boston: Little, Brown and Company, 1974. — P. 86–107.

Поступила 11.01.2000

polymer homologues of the EO N-AcEA in the finite product, as well as in a rise in the PEG content. A study of the side reaction of the PEG formation demonstrated that the number of the PEGs being formed is also dependent on the extent of oxyethylation. The temperature of the oxyethylation process affects formation of PEG — a rise in the temperature is accompanied by an increase in the number of PEGs. It was shown that the minimum amount of polyethylene oxide is formed with the ratio of EO:amid of 4:1, the temperature of 100–110 °C, duration of the reaction of 50–140 min in the presence of a KOH catalyst (0.008 moles).

Thus, the optimum conditions for obtaining the finite product of EO N-AcEA with the extent of polymerization of $n = 3, 4$ are: the temperature of 100 °C, duration of the reaction of 70 min, molar ratio of EO to amid of 4:1 in the presence of a KOH catalyst in the amount of 0.008 moles.

REFERENCES

1. *Hazardous substances in industry* / Ed. by N. V. Lazarev. — M.: Khimiya publ., 1976. — V. 1. — 590 p.
2. Guchok V. M., Chekanova V. V., Melnik A. P., Lougovoy V. I. Oxyethylation of amides of aliphatic low molecular acids as an experimental approach for obtaining new nontoxic cryoprotectants // *Kriobiologiya*. — 1994. — № 3. — P. 30–34.
3. Zakupra V. A. Methods of analysis and control in the production of surface-active substances. — M.: Khimiya, 1977. — 366 p.
4. Kirilkin A. I. Molecular-mass composition of polymer homologues of the oxyethylated nonyl phenol and its action on functional properties of SAS: Abstr. Thesis Cand. Chem. Sci. — M., 1987. — 16 p.
5. Linnik T. P. Dependence of cryoprotective activity of compounds of the amid series on their physical-chemical properties: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci. — Kharkov, 1986. — 19 p.
6. Lougovoy V. I., Khanina L. A., Shrago M. I., Chekanova V. V. Synthesis, structure, cryoprotective properties of oxyethylated amides when they are applied for preservation of cell suspensions // *Pathophysiological aspects of the action of cold on the organism: Collection of sci. works.* — Kharkov, 1989. — P. 89–93.
7. Khanina L. A., Lougovoy V. I., Shrago M. I. Current aspects of the search and synthesis of new cryoprotectants // *Fundamental and applied problems of cryobiology: Collection of sci. works.* — Kharkov, 1992. — P. 67–77.
8. Khanina L. A., Lougovoy V. I., Shrago M. I. et al. Cryoprotective properties of PEO-400 depending on molecular-mass distribution // *Physical-chemical properties and biological action of cryoprotectants: Collection of sci. works.* — Kharkov, 1990. — P. 76–81.
9. Chekanova V. V., Khanina L. A., Lougovoy V. I., Petrenko T. A. Cytotoxicity and cryoprotective activity of oxyethylated amides during cryopreservation of the SPEV culture being revived // *Probl. kriobiol.* — 1995. — № 1. — P. 37–42.
10. Chekanova V. V., Khanina L. A., Mazalov V. K., Lougovoy V. I. Cytotoxicity and cryoprotective activity of oxyethylated amides during cryopreservation of bone marrow cells // *Probl. kriobiol.* — 1995. — № 2. — P. 36–39.
11. Chekanova V. V. Synthesis, toxicity and cryoprotective activity of oxyethylated amides: Abstr. Thesis Cand. Biol. Sci. — Kharkov, 1993. — 17 p.
12. Shenfeld N. Surface-active substances on the basis of ethylene oxide. — M.: Khimiya publ., 1982. — 749 p.
13. *Author's Certificate 663698 of the USSR C08G65/22: C08G65/26. Polymers of the substituted glycidamide and its copolymers with ethylene oxide as a model of the plasma substitute and a method for their collection* / T. N. Kurenina, L. V. Toporkova, V. A. Kropacheva // *Otkrytiya. Izobreteniya*. — 1972. — № 19. — P. 81.
14. Karow A. M. Cryopreservation: pharmacological consideration. Organ preservation for transplantation. — Boston: Little, Brown and Co., 1974. — P. 86–107.

Accepted in 11.01.2000

Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells.

IV. Influence of Cell Concentration (Cytocrit) on the Cell Osmotic Response

Igor I. KATKOV

Semen and Embryo Preservation Laboratory of Universal Preservation Technologies, Inc.

Некоторые аспекты осмотической реакции клеток.

IV. Влияние концентрации клеток (цитокрита) на ответную осмотическую реакцию

И. И. КАТКОВ

Лаборатория сохранения спермы и эмбрионов, универсальные технологии сохранения, Инк.

Cell concentration C (number of cells/ml) as well as cytocrit a (fraction of volume occupied by cells) are important characteristics in many Cryobiological protocols. Traditionally in membrane permeability modeling, the cells are considered as single entities [1, 2]. From this point of view, the amount of extracellular water W^{ex} as well as concentration (osmolality) of the solutes in extracellular space M_i^{ex} , where $i = 1, 2, \dots, N$ the number of the i -th solute in an N -solute system, are considered to be constant. However, if a is not $\ll 1$, movement of water and the solutes to/from extracellular space cannot be ignored, and W^{ex} , M_i^{ex} , and a become functions of time. Measuring a (e.g., with the use of a micro-hematocrit centrifuge) and parameters related to it, such as conductivity or light reflection of the suspension, can be useful tools for estimation of kinetic of water and solute movement in case of suspending cells [3]. In this work, we consider the influence of cytocrit on the pattern of the cell osmotic response.

Концентрация клеток C (количество клеток/мл), равно как и цитокрит a (фракция объема, занимаемая клетками) являются важными характеристиками для многих криобиологических протоколов. Обычно при моделировании проницаемости мембраны клетки рассматриваются как отдельные единицы [1, 2]. С этой точки зрения количество внеклеточной воды W^{ex} , так же как и концентрация (осмолярность) растворенных веществ во внеклеточном пространстве M_i^{ex} , где $i = 1, 2, \dots, N$ — номер i -го раствора в системе из N растворов, считаются постоянными величинами. Однако, если a не много меньше 1, движение воды и растворенных веществ в/из внеклеточного пространства нельзя игнорировать, и W^{ex} , M_i^{ex} и a становятся функциями времени. Вычисление a и соответствующих параметров, таких как проводимость или световое отражение суспензии, может быть полезным для определения кинетики воды и движения растворенного вещества в случае с суспендированными клетками [3]. В этой работе мы рассматриваем влияние цитокрита как пример осмотической ответной реакции клеток.

Концентрація клітин C (кількість клітин/мл), так само як і цитокрит a (фракція об'єму, яку займають клітини) є важливими характеристиками для багатьох криобіологічних протоколів. Звичайно при моделюванні проникності мембрани клітини розглядаються як окремі одиниці [1, 2]. З цієї точки зору кількість внеклітинної води W^{ex} , як і концентрація (осмолярність) розчинених речовин у позаклітинному просторі M_i^{ex} , де $i = 1, 2, \dots, N$ — номер i -го розчину в системі із N розчинів, вважаються постійними величинами. Проте, якщо a не набагато менше 1, рух води і розчинених речовин в/із позаклітинного простору не можна ігнорувати, і W^{ex} , M_i^{ex} і a стають функціями часу. Обчислення a і відповідних параметрів, таких як провідність або світлове відбиття суспензії, може бути корисним для визначення кінетики води і руху розчиненої речовини у випадку з суспендованими клітинами [3]. У цій роботі ми розглядаємо вплив цитокриту як приклад осмотичної відповідної реакції клітин.

A relativistic permeability theory

Recently [1–5], we have proposed a new approach for membrane permeability modeling which allows to substantially better understand the pattern of cell osmotic response, and to improve simplicity of basic calculations that now are not required costly and time consuming software simulations. This approach, which we call “relativistic”, is based on several postulates, namely:

I. There is no interaction between solutes and solvent during passage through the cell membrane unless otherwise is proved by direct Physical measurements.

II. If N solutes are present in the system, they all are considered as permeable with permeability P_i ($i = 1, 2, \dots, N$), and $N + 1$ osmotic equations of water and solute movements are considered.

III. The osmotic equations are usually considered as normalized (relative) to the isotonic characteristic

time, isotonic water volume, and iso-concentration. From this point of view, not the absolute values of cell membrane permeabilities, but their relative (to water) permeability terms ($C_{rpi} = P_i/L_p RT$) matter for characterization of the pattern of osmotic response.

IV. An impermeable component is considered as a solute which relative permeability is negligibly small comparing with the permeabilities of other solutes and water; so the intracellular amount of this solute remains practically constant during the time of the experiment.

From these assumptions, we have obtained important results that can be summarized as follows:

1. In general, the pattern of osmotic response of a N -solute system consists of $N + 1$ phases, and N points of local maximum volume excursions (MVE) are present. However, depending on the initial, final conditions, and C_{rpi} , it can be less points of maximums and minimums or none of them.

2. The basic relationship between the cell water volume W and the amounts of intracellular solutes N_i is found and can be expressed as

$$W + \sum_i^N (N_i / C_{rpi}) = \text{const}$$

at any time being considered.

3. The final water volume can be easily calculated from this equation even if all entities are permeable.

4. The values of the cell water volume at the moments of transient maximum volume excursions can be easily estimated without the use of sophisticated software if permeabilities of solutes are substantially different from each other ($P_1 \gg P_2 \gg \dots \gg P_N$).

5. All results transform to "classical" equations, including the Boyle-vant Hoff relationships, if the relative membrane permeability of the least permeable solute $C_{rPN} \rightarrow 0$ (see postulate IV above).

Osmotic equations (single cell model)

In an N -solute system for a single cell (cytocrit $a \rightarrow 0$), the movement of water through the cell membranes and can be described as follows:

$$\frac{dW}{dt} = -L_p RTA \sum_{i=1}^N (M_i^{\text{ex}} - M_i^{\text{in}}), \quad (1-W)$$

where L_p is the cell membrane water hydraulic conductivity, R is the gas constant, T is the temperature, M_i^{ex} and M_i^{in} are the extra- and inter-cellular osmolalities of the i -th solute, respectively, and A is the cell surface area. Note that all M_i^{ex} are considered to be constant and defined as M_{fi} in the companion poster.

Diffusion of the i -th solute through the cell membranes can be described as:

$$M_i^{\text{in}} \frac{dW}{dt} + W \frac{dM_i^{\text{in}}}{dt} = P_i A_c (M_i^{\text{ex}} - M_i^{\text{in}}), \quad (1-i)$$

where P_i is the cell membrane permeability of the i -th solute, and $WM_i = N_i$ is the intracellular amount of the i -th solute (cf. with Eqs. (1) in the companion poster). Here and below $P_1 > P_2 > \dots > P_N$.

Using relativistic permeability approach (see the companion poster), we can express following equations:

The main relationship ("golden formula"):

$$W \left(1 + \sum_{i=1}^N M_i^{\text{in}} / C_{rpi} \right) = W_0 \left(1 + \sum_{i=1}^N M_{0i}^{\text{in}} / C_{rpi} \right), \quad (2-A)$$

where is $C_{rpi} = P_i / L_p RT$ the relative permeability term of the i -th solute, and subscript 0 refers the initial values at time zero.

Final water volume W_f at the equilibrium ($t \rightarrow \infty$) can be found from the definition, (i.e., at this time $M_i^{\text{in}} = M_i^{\text{ex}}$), namely:

$$W_f = W_0 \frac{1 + \sum_{i=1}^N M_{0i}^{\text{in}} / C_{rpi}}{1 + \sum_{i=1}^N M_i^{\text{ex}} / C_{rpi}}. \quad (2-B)$$

Water volume at the point of the j -th maximum volume excursion ("silver formulas"):

$$W_{mj} \sim W_0 \frac{1 + \sum_{i=1}^{j-1} (M_{0i}^{\text{in}} / C_{rpi}) + (\sum_{i=1}^N M_{0i}^{\text{in}}) / C_{rpi}}{1 + \sum_{i=1}^{j-1} (M_i^{\text{ex}} / C_{rpi}) + (\sum_{i=1}^N M_i^{\text{ex}}) / C_{rpi}}. \quad (2-C)$$

Intracellular osmolalities of the solutes at the point of the j -th maximum volume excursion ("bronze formulas"):

$$\begin{aligned} M_{mij}^{\text{in}} &= M_i^{\text{ex}} \text{ for } i < j; \\ M_{mij}^{\text{in}} &= W_0 M_{0i}^{\text{in}} / W_{mj} \text{ for } i > j; \\ M_{mij}^{\text{in}} &= \sum_{i=j+1}^N (M_i^{\text{ex}} - M_{mij}) + M_j^{\text{ex}} \text{ for } i = j. \end{aligned} \quad (2-D)$$

Cytocrit (basic definitions and relationships)

We define the cell cytocrit a as the fraction of volume of the cell suspension occupied by the cells [3]. If the actual cell volume of one cell at time t is V , then the actual cytocrit can be easily found as:

$$a = CV, \quad (3-A)$$

where C is the cell concentration (density) is the number of cells per volume unit of the suspension. Note that both C and V must be expressed in the same units, for example, cm^3 .

Similarly, the fraction of intracellular water at time t can be defined as:

$$a_w = CW, \quad (3-B)$$

where W is the actual volume of intracellular osmotically active water at time t .

In contrast, the partial volume of osmotically inactive ballast remains constant at given C , namely

$$a_b = CV_b, \quad (3-C)$$

where V_b is the osmotically inactive cell volume.

Neglecting intracellular solute volume (a reasonable assumption for systems with $a_w \leq 0.5$ and $M \leq 2$ Osm), it is obvious that:

$$a_w = a - a_b. \quad (3-D)$$

Thus, monitoring the cell volume fraction a in the suspension (e.g., using microhematocrit tubes and centrifugation, nephelometry, turbidimetry, conductivity measurements, etc.), we can estimate kinetics of water and solute movements.

In contrast with a single cell model (see the companion poster), the volume of extracellular water

(equals $1 - a$), and the osmolalities of the extracellular solutes are not constant anymore. The actual extracellular osmolality of the i -th solute M_i^{ex} can be easily found from the fact of the constant total amount of the solute in the system (assuming that $N_i = WM_i$), namely:

$$(a - a_b) M_i^{\text{in}} + (1 - a) M_i^{\text{ex}} = (a_0 - a_b) M_{0i}^{\text{in}} + (1 - a_0) M_{0i}^{\text{ex}}, \quad (4)$$

where is M_i^{in} the actual intracellular osmolality of the i -th solute, and subscript 0 refers the values at time zero.

Osmotic equations for concentrated cell suspensions

The actual cell cytocrit can be easily expressed by multiplying both parts of Eq. (1-W) with C . Taking to the advantage that $da/dt = da_w/dt$, we have following differential equation:

$$\frac{da}{dt} = -L_p RTCA \sum_{i=1}^N (M_i^{\text{ex}} - M_i^{\text{in}}). \quad (5-W)$$

The actual intracellular osmolality of the i -th solute can be expressed after multiplying both parts of Eq. (1-i) with C , that combining with (3-D) gives us:

$$M_i^{\text{in}} \frac{da}{dt} + (a - a_b) \frac{dM_i^{\text{in}}}{dt} = P_i CA_c (M_i^{\text{ex}} - M_i^{\text{in}}), \quad (5-i^{\text{in}})$$

where the actual extracellular osmolality can be found from (4):

$$M_i^{\text{ex}} = \frac{(a_0 - a_b) M_{0i}^{\text{in}} + (1 - a_0) M_{0i}^{\text{ex}} - (a - a_b) M_i^{\text{in}}}{1 - a}. \quad (5-i^{\text{ex}})$$

Thus, we have $2N + 1$ equations that express osmotic behavior of the cells in a concentrated cell suspension. Applying the same logic as we did for a single model (see the companion poster), we can obtain the same relationships we have found for a single model substituting W with $(a - a_b)$. The only difference is that the final (equilibrium) extracellular osmolality of the i -th solute is not a constant given at the beginning, but can be found from definition that at $t \rightarrow 0$, $M_i^{\text{in}} = M_i^{\text{ex}} = M_{fi}$, that combining with (4) gives us:

$$M_{fi} = \frac{(a_0 - a_b) M_{0i}^{\text{in}} + (1 - a_0) M_{0i}^{\text{ex}}}{1 - a_b}. \quad (6-A)$$

It is obvious that the value of M_{0i}^{in} is between M_{fi} and M_{0i}^{ex} . For example, the final (equilibrium) cytocrit a_f can be found from the following relationship:

$$a_f - a_b = (a_0 - a_b) \frac{1 + \sum_{i=1}^N M_{0i}^{\text{in}}/C_{pi}}{1 + \sum_{i=1}^N M_{fi}/C_{pi}}, \quad (6-B)$$

which an analogous of the formula (2-B), and so on.

The actual values of the total cell volume and the cell water volume can be now easily found from the reverse transfer using formulas (3-A) and (3-B) receptively. It is useful for further analysis to use the cell water volume normalized to the isotonic value W_{iso} , namely:

$$w \equiv \frac{W}{W_{\text{iso}}} = \frac{a - a_b}{a_{\text{iso}} - a_b}, \quad (7)$$

where $a_{\text{iso}} \equiv CV_{\text{iso}}$ is the cytocrit of the suspension at isotonic conditions.

Influence of cytocrit on the cell osmotic response

Let us now consider a practical example of the sue of the model described above to investigate the influence of cell concentration on the cell osmotic response compare, and to compare with a single cell model.

Cell Parameters and initial conditions. Let us consider a spherical cell with the isotonic cell radius equals $3.1\mu^3$. It gives us the total iso-volume $V_{\text{iso}} = 125\mu^3$, and the cell surface area (assume it as a constant) $A = 121\mu^2$. Let us assume the osmotically inactive fraction as of 0.2 that gives us the osmotically inactive cell volume as of $V_b = 25\mu^3$, and the isotonic cell water $W_{\text{iso}} = 100\mu^3$. The cell membrane water conductivity is assumed as $L_p = 2.0\mu/\text{min}/\text{atm}$, the temperature $T = 300$ K.

Addition of a cryoprotectant.

We assume also that both intra- and extracellular compartments contain two solutes, a highly permeable solute Y with the solute membrane permeability $P_1 = 13.9\mu/\text{min}$ ($C_{p1} = 282$ mOsm), and a low permeable solute Z with 20-fold lower membrane permeability ($P_2 = 0.693\mu/\text{min}$ and $C_{p2} = 14$ mOsm). Initially, the cell is in an isosmotic pre-bath ($M_{\text{iso}} = 290$ mOsm) containing a low-permeable solute only. At the moment zero, the cell suspension then is with a solution containing 800 mOsm of the highly permeable solute, and 290 mOsm of isosmotic low permeable buffer solute.

Case A: highly concentrated suspension. After mixing with the solution of CPA, the concentration of cell in the cell suspension $C = 4$ B/ml. That gives us (assuming that the initial conditions are still isotonic) $a_0 = a_{\text{iso}} = 0.5$, $a_w(0) = 0.4$, and $a_b = 0.1$.

Simultaneous simulation of a system of five equations [5] gives us a pattern of the cell osmotic that is depicted in Fig. 1, a. The solid curve is the actual cytocrit of the suspension a , the long dashed curve is the fraction of intracellular water a_w which is shifted in 0.1 units down the Y-axis. The upper, short-dashed curve is the cell water w normalized to the istic value and calculated from (7). It is essentially the same curve as a_w but the magnitude is 2.5-time (which is $1/(a_{\text{iso}} - a_b)$) higher than the value of a_w .

As we can see, the pattern of the curve is the classical two-phase shrinkage-swelling. The level of maximum volume excursion is about 0.47 of the isosmotic value which is in good prediction with "silver"

formulas taking to account that the final (equilibrium) volume of the CPA (Y_f) is about 443 mOsm. Note that it is not just a result of mixing (initial extracellular osmolality is 800 mOsm), but eventual equilibration of extra- and intracellular components of solutes and water movement. The final water volume is equal to 0.93 of its initial isosmotic value, which is in a full agreement with formulas (2-B) and (6-B).

Case B: low concentrated suspension. Consider now that after mixing with a solution of CPA, the concentration of cell in the cell suspension is 10-time less than in the previous example ($C = 400$ M/ml. That gives us $a_0 = a_{iso} = 0.05$, $a_w(0) = 0.04$, and $a_b = 0.01$. The equilibrium concentration of CPA will be almost equal to its initial extracellular concentration ($Y_f = 768$ mOsm).

The pattern of cytocrit and the fraction of intracellular water are given in Fig. 1, b. Note that the scale of the ordinate axis is 10 larger than in the previous example so the water volume curve is not shown.

Influence of cell concentration. Comparison of the cell water volume for both cases is given on Fig. 1, c. Curve 1 — the cytocrit of the suspension is high ($a_0 = 0.5$), this is essentially the upper curve in Fig. 1, a. Curve 2 — the cytocrit of the suspension is low ($a_0 = 0.05$). Curve 3 — simulation for a single cells (Eqs. (1)). Curve 4 — simulations for a single cell (Eqs. (1)), which is placed in the same osmolality of extracellular CPA that the equilibrium value in case of high cytocrit ($Y_f = 443$ mOsm).

Several conclusions can be made from comparison of the curves depicted on Fig. 1, c:

1. At low cytocrit ($a \leq 0.1$), the cell osmotic response is very similar to those for a single cell (cf. curves 2 and 3).

2. The final water volume in the case of more concentrated suspension is higher than for diluted suspensions and closer to the value which would have been obtained if the second solute were impermeable (w_f would be equal 1). It can be explained by the fact that the final osmolality of CPA is almost twice lower because the extracellular solute is diluted by relatively large volume the water initially located inside the cells.

3. Similarly, the maximum volume excursion during shrinkage in the diluted suspensions is substantially higher ($w_m = 0.48$) than for the concentrated suspension ($w_m = 0.62$). Again, it reflects the fact that fast flux of intracellular water during shrinkage quickly dilutes high extracellular concentration of CPA while for diluted suspensions this effect is negligible.

For comparison, we simulate the situation of a single model cell which is placed in the same osmolality of extracellular CPA that the equilibrium value in Case A ($Y_f = 443$ mOsm). The results of simulations are depicted in the same Figure (curve 4). Comparison with curve 1 shows that the final water volume is identical in both case ($w_f = 0.93$), and the maximum volume excursion is almost the same ($w_m = 0.62$). However, cell in concentrated solutions reach the maximum shrinkage and regain the volume during re-swelling faster than for a single model. The explanation is that in case of concentrated suspension, the initial driving force for water is higher because initial extracellular osmolality of CPA is 800 mOsm, and only after certain period time it decreases to $Y_f = 443$ mOsm while for the case depicted by curve 4, the initial extracellular concentration is already 443 mOsm. As the result it slows the process of cell

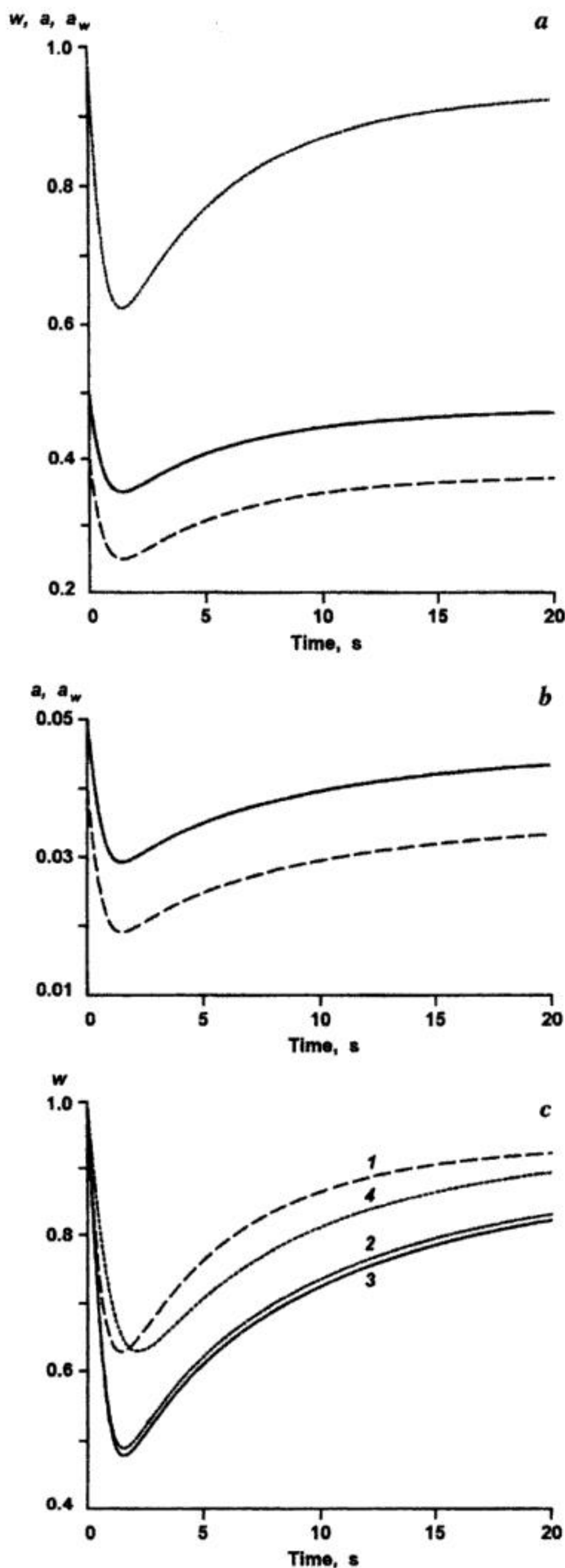


Fig. 1. Pattern of the cell osmotic response and changes in cytocrit during addition of 800 mOsm of CPA obtained by simultaneous simulation of a system of five equations (5) in the text. Other parameters are given in the text.

osmotic response. However, because both w_f and w_m are determined by Y_f , these values are equal in both cases.

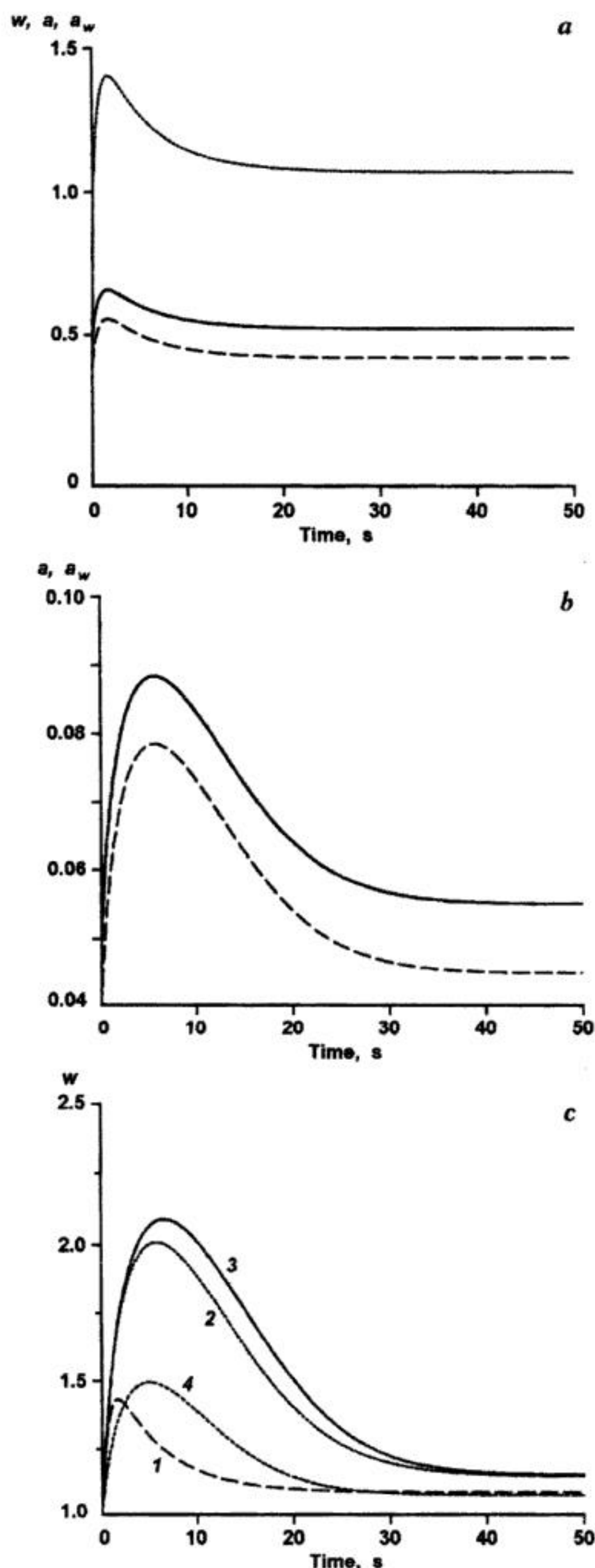


Fig. 2. Pattern of the cell osmotic response and changes in cytocrit during removal of 800 mOsm of CPA preloaded in the cell. Results are obtained by simultaneous simulation of a system of five equations (5) in the text for $M_0^{\text{in}} = 800$ mOsm and $M_0^{\text{ex}} = 0$. Other parameters are given in the text.

Dilution of CPA

Let us now consider reverse situation when cells are preloaded with 800 mOsm of intracellular CPA and placed in a buffer containing only an isosmotic low permeable solute ($Z_0^{\text{ex}} = 290$ mOsm).

The results of simulations for low and highly concentrated solutions (a_0 equals 0.5 and 0.05, respectively) are depicted in Figs. 2, *a* and 2, *b* (for the latter figure, the cell water volume is not shown).

Comparison of cell water volumes is for both cases is given on Fig. 2, *c* (curves 1 and 2). As in case of addition of CPA, curve 3 represents a single cell model with the same initial conditions. Curve 4 depicts the situation when a single cell is preloaded with 800 mOsm of CPA and then placed in the bath containing 357 mOsm of CPA, the value, which is equal to the final concentration Y_f for a highly concentrated suspension.

The difference between the patterns of osmotic response is similar to the described above for addition of CPA, but in case of dilution, they are even more pronounced. Particularly, even 0.1 cytocrit is now high enough to affect the cell response (cf. curves 2 and 3). Suppression of volume excursion for concentrated suspension is also higher ($w_m = 1.45$ vs $w_m = 1.96$ for cases A and B, respectively). The difference between multi- and single-cell models with the same final concentrations of components is also more manifest for dilution of CPA (cf. curves 1 and 4 in Figs. 1, *c* and 2, *c*).

Prediction ability of the theory

The solid curve with filled diamonds on Fig. 3 depicts the values of the maximum volume excursions obtained by simulations (curves in Figs. 1 and 2). The dashed curve with empty circles is the values predicted by the Theory ("silver formulas"). As in the case of a single model (see, e.g. [6]), agreement is good. Small deviations between predicted and simulated values are contributed by internal problems of any computational simulation procedure. In contrast, the "silver formulas" of the relativistic permeability theory are simple and can be calculated with the use of a pocket calculator. Note that the "golden formulas" including the final cell water volume are exact and in full agreement with simulations.

In conclusion, we can assume that the relativistic permeability approach is simple; it can be used for practical modeling of highly concentrated cell suspension such as packed erythrocytes or centrifuged spermatozoa.

Acknowledgements

Sources of Support: Individual initiative and Dr. Peter Mazur's NIH Grant RO1-HD30274 (partially).

REFERENCES

1. Kedem & Katchalsky, BBA.— 1958.— 27.— P. 229–246.
2. Kleinhans, Cryobiol.— 1998.— 37.— P. 271–289.
3. Mazur, Biophys. J.— 1963.— 3.— P. 328–351.
4. Katkov, Problems of Cryobiol.— 1999.— № 2.— P. 3–11.
5. Katkov, Problems of Cryobiol.— 1999.— № 3.— P. 3–9.
6. Katkov, Cryobiol.— 2000.— 40.— P. 64–83.
7. Katkov, Problems of Cryobiol.— 2000.— № 2.— P. 3–9.
8. Katkov, Cryobiol.— 2000 (in press)

Accepted in 30.07.2000

К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга.

Часть 3. Нейрональные газы (NO, CO) как нейротрансмиттерная система “раскачки” гомеостаза

В. С. МАРЧЕНКО, Г. А. БАБИЙЧУК, Л. Н. МАРЧЕНКО, Л. В. ПОЛИЩУК

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

To the Conception of Existo-Encephalic System of Cooled Brain.

Part 3. Neuronal Gases (NO, CO) as Neurotransmitter System of Homeostasis “Kindling”

V. S. MARCHENKO, G. A. BABIYCHUK, L. N. MARCHENKO, L. V. POLISCHUK

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

Показано, что NO и CO как факторы нейрональной пластичности опосредуют терморегуляторные функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) изменением его проницаемости к термокомпетентным нейромедиаторам. Гипотермия приводит к каскадному включению разных изоформ NO-синтазы, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ. При критическом возрастании содержания NO “затапливаются” рецепторные поля нейротрансмиттерных механизмов открытия ГЭБ, происходит экстренное восстановление его резистентности. Если NO является триггером проницаемости ГЭБ для биогенных аминов, то CO — своеобразным переключателем симпатопарасимпатических потоков. В таких условиях CO осуществляет связь ГЭБ с монооксигеназной системой, а NO — с иммунной, объединяя три защитные системы в одну, которую можно условно назвать экзистоэнцефалической системой (ЭЭС).

Показано, що NO і CO як фактори нейрональної пластичності опосередковують терморегуляторні функції гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) зміною його проникності до термокомпетентних нейромедіаторів. Гіпотермія веде до каскадного включення різних ізоформ NO-синтази, створюючи умови для підвищеної проникності ГЕБ. При критичному зростанні вмісту NO “затоплюються” рецепторні поля нейротрансмітерних механізмів відкриття ГЕБ, відбувається екстремне відновлення його резистентності. Якщо NO є тригером проникності ГЕБ для біогенних амінів, то CO — своєрідним перемикачем симпатопарасимпатичних потоків. За таких умов CO здійснює зв'язок ГЕБ з монооксигеназною системою, а NO — з імунною, з'єднуючи три захисні системи в одну, яку можна умовно назвати екзистоенцефалічною системою (ЕЕС).

It has been shown, that NO and CO as the factors of neuronal plasticity mediate BBB thermoregulatory functions by changing its permeability to thermo-competent neuromediators. Hypothermia results in a cascade switching of various isoforms of NO-synthase, making the conditions for an increased BBB permeability. Under a critical augmentation of NO content receptor fields in the neurotransmitter mechanisms of BBB opening were “flooded”, an urgent recovery of its resistance occurred. CO is so-called switch of sympathetic and parasympathetic flux, if NO is the trigger of BBB permeability for biogenic amines. Under these conditions CO binds BBB with mono-oxygenase system, and NO with an immune one, combining three protective systems in one, which conditionally can be named as existo-encephalic system (EES).

Изложенные в [10–12] общетеоретические представления об ЭЭС, организующей биоритмику стресса, могут иметь значение только в том случае, если существует реальный нейрофизиологический процесс реализации такого рода функции и идентифицирована его нейромедиаторная система. Считая ГЭБ и медленную управляющую систему мозга [7] структурно-функциональной основой ЭЭС [10], следует предположить, что таким механизмом обеспечения физиологической картины биокослебаний холодового стресса является активация ГЭБ. При повышении проницаемости барьера для пара- и симпатомиметиков должен синхронизироваться динамический рисунок вегетативных переключений с паттерном биотоков, что приведет к изменению общего уровня активности организма, то есть реализуется

General theoretical notions about EES, organizing the stress biorhythmicity [10–12], may be of a value only in the case, if a real neurophysiological process of such a function realization occurred and its neuromediator system is identified. Considering the BBB and slow controlling brain system [7] as a structural base of EES [10], it should be supposed, that BBB activation is such a mechanism for providing of the physiological picture of cold stress biooscillations. When increasing a barrier permeability for para- and sympathomimetics a dynamic picture of vegetative switchings with the biocurrent pattern, can be synchronized, that resulted in the change of a general level in an organism's activity, i.e. the main EES function is realized. Then the question about “synchromesengers” appears inevitably.

основная функция ЭЭС. Тогда неизбежно возникает вопрос о "синхромессенджерах".

Недавно установлено, что свободнорадикальный газ (монооксиды азота и углерода) является важным посредником физиологических процессов [9, 21, 23]. В сердечно-сосудистой системе NO и CO включаются в механизмы расслабления кровеносных сосудов [17, 23, 28], а в мозге они обеспечивают нейротрансмиттерные процессы типа долговременной потенциации [21, 32, 33], что может играть определенную роль в центральной терморегуляции [5, 6, 20, 22]. Учитывая немаловажное значение ГЭБ в механизмах температурного гомеостаза [10–12], следует ожидать, что NO и CO как факторы нейрональной пластичности опосредуют и терморегуляторные функции ГЭБ изменением его проницаемости к термокомпетентным нейромедиаторам. Иначе говоря, для новой функциональной системы регуляции общего уровня активности организма есть новый класс нейромедиаторов. Это предположение подтверждается и согласуется с результатами других исследований. Так, показано, что NO принимает участие в организации биоритма цикла сон–бодрствование [19], играет существенную роль в центральных механизмах терморегуляции [6, 20], наряду с другими факторами [14, 29, 30] регулирует проницаемость ГЭБ [18, 23–26, 31]. Появились первые работы и о роли CO в организации такого рода процессов [21, 22, 32, 33].

Цель данного сообщения – изучение влияния оксидов азота и углерода на проницаемость ГЭБ для ^3H -норадреналина (^3H -НА), ^3H -ацетилхолина (^3H -АХ), ^3H -серотонина (^3H -СТ), ^3H -гамма-аминомасляной кислоты (^3H -ГАМК) и биоэлектрическую активность (БЭА) при ритмических гипотермических воздействиях.

Исследования проводили на белых крысах массой 180–220 г. Ритмические холодовые воздействия (РХВ) на каудальные терморецепторы длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц осуществляли охлаждением хвоста животного ледяной водой (0 °C) в автоматическом режиме. Проницаемость ГЭБ изучали радиоизотопным методом. Спектрально-корреляционный анализ БЭА проводили в диапазоне 0,1–35 Гц, электронно-микроскопические исследования образцов гипоталамуса выполняли традиционными методами [3, 10–12].

В основе различных реакций организма лежит образование определенных пространственно-временных паттернов БЭА. Известно [8], что для облегчения передачи возбуждения необходимы синхронность биопотенциалов соответствующих пунктов коры (определяется по параметрам функции когерентности), некоторая минимальная площадь синхронно действующих участков, наличие ритмических компонент в определенном диапазоне частот (выявляемых при помощи функции автокорреляции), когерентность и постоянные фазовые отношения этих ритмических составляющих, уве-

Recently it was established, that free-radical gas (nitrogen and carbon mono oxides) was an important mediator of physiological processes [9, 21, 23]. NO and CO in cardiovascular system are involved into the mechanism of vasorelaxation in circulatory vessels [17, 23, 28], and in brain they provide neurotransmitter processes like as a long-term potentiation [21, 32, 33], that may play a certain role in the central thermoregulation [5, 6, 20, 22]. Taking into consideration the BBB importance in the mechanisms of temperature homeostasis [10, 12], it should be supposed, that NO and CO as the factors of neuronal plasticity also mediate the BBB thermoregulatory functions by changing its permeability to thermocompetent neuromediators. In another words, for a new functional system of general level regulation in an organism's activity there is a new class of neuromediators. This supposition is confirmed by the results of our investigations. However, it has been shown, that NO participated in biorhythm organization of sleep-wakefulness cycle [19], played an important role in central mechanisms of thermoregulation [6, 20], at the same time with other factors [14, 29, 30], it regulated BBB permeability [18, 23–26, 31]. The first works about CO role in the organization of such processes, appeared [21, 22, 32, 33].

The aim of the given work was to study the effect of nitrogen and carbon oxides on the BBB permeability for ^3H -noradrenaline (^3H -NA), ^3H -acetylcholine (^3H -ACh), ^3H -serotonin (^3H -ST), ^3H -gamma-amino-oil acid (^3H -GAOA) and bioelectric activity (BEA) under rhythmic hypothermic effects.

Investigations were conducted in 180–220 g white rats. Rhythmic cold effects (RCE) with 1 s duration of caudal thermoreceptors with 0.1 Hz frequency were carried-out by means of cooling of animals' tail with an ice water (0 °C) under an automatic regimen. BBB permeability was investigated by means of radioisotopic method. Spectral and correlational analysis of BEA was conducted within the range of 0.1–35 Hz. Electron-microscopic investigation of hypothalamus samples was done according to traditional methods [3, 10–12].

Formation of the certain spatially-time BEA patterns is the base of various organism's responses. It is known [8] that to facilitate excitation transfer such characteristics are necessary: biopotential synchronization of the corresponding cortex points (is determined according to the parameters of coherence function), some minimum area of synchronically acting sites, the presence of rhythmic components in a certain frequency range (revealed by means of autocorrelation function), coherency and constant phase relations of these rhythmic components, an increase of their manifestation in the BEA spectrum. The works [3, 10–12] demonstrated, that under different programs and cooling methods down to 32–28 °C (general, craniocerebral, rhythmic, trigger hypothermia, repeated coolings) significant changes in BEA spatial

личение их выраженности в спектре БЭА. В [3, 10–12] показано, что при различных программах и способах охлаждения до 32–28 °С (общая, кранио-церебральная, ритмическая, триггерная гипотермии, повторные охлаждения) наблюдаются серьезные изменения пространственной синхронизации БЭА, особенно в секундном диапазоне частот, протекающие с разной интенсивностью, но по сходному сценарию. В начале охлаждения после кратковременного подъема происходит резкое снижение большинства исследованных параметров БЭА. Мощность спектра секундного (ζ) ритма уменьшается более чем в 3 раза. Во столько же раз снижаются значения постоянного потенциала, динамика которого коррелирует с изменением когерентности ζ -ритма. Дальнейшее охлаждение приводит к возрастанию пространственной синхронизации БЭА. При этом скорость охлаждения замедляется в 1,5–2 раза, но только при наличии в БЭА неокортекса квазисинусоидального секундного ритма, мощность спектра которого повышается в 1,5–2 раза. В этих условиях возрастает значение функции когерентности θ - и особенно ζ -диапазона, достигая предельных значений 0,7–0,9, более чем в 2 раза уменьшается фазовый сдвиг. Эти динамические изменения пространственной синхронизации секундного ритма БЭА, свидетельствующие о повышении активности медленной управляющей системы мозга [3, 7, 8], происходят параллельно и однонаправленно с изменениями проницаемости ГЭБ для биогенных аминов. Электрофизиологическими [3], нейрохимическими [9] и электронно-микроскопическими методами [9, 10] была убедительно доказана взаимосвязь процессов, имеющих общую нейрофизиологическую основу. Однако при традиционном стандартном усреднении результатов “исчезли” и оказались за рамками обсуждения интересные данные о единичных случаях, когда при охлаждении температура тела животных не изменялась, а процессы проницаемости ГЭБ и БЭА имели характерную для охлажденного организма динамику. И наоборот при длительной гипотермии вплоть до 28 °С сохранялась эутермная динамика ГЭБ и БЭА. Такого рода факты наводили на мысль, что снижение температуры тела само по себе не всегда является достаточным и не вполне необходимым условием изменения проницаемости ГЭБ и БЭА. Теоретические соображения, анализ собственных и литературных данных позволили нам предположить, что адекватным физиологическим стимулятором этих процессов как структурно-функциональной основы ЭЭС может быть резонансное раздражение терморецепторов [10–12]. Нами показано, что при ритмической стимуляции каудальных терморецепторов, не приводящей к изменению температуры тела более чем на 1–2 °С, имеет место кардинальная перестройка паттернов БЭА, коррелирующая со сложной динамикой изменения проницаемости ГЭБ (рис. 1, 2) На разных

синхронизация были observed, especially in the second frequency range, occurred with a different intensity, but according to similar protocol. During cooling, beginning after a short-term increase, a sharp reduction of the majority of studied BEA parameters occurred. The power of the second rhythm range (ζ) decreased more than by 3 times. The values of constant potential, dynamics of which correlates with coherency change of ζ -rhythm decreased by the same times. Further cooling results to the increase of BEA spatial synchronization. Thereat cooling rate decelerates by 1.5–2 times, but only in the presence of neocortex BEA of quasy-sinusoidal second rhythm, the power of which range increases by 1.5–2 times. Under these conditions the values of θ -coherence function and especially of ζ -range increase, reaching the limiting values of 0.7–0.9, the phase shift decreases more than twice. These dynamic changes of spatial synchronization in BEA second rhythm, testifying to an increase in a slow activity of the brain controlling system [3, 7, 8], occur parallelly and in one direction with the changes of BBB permeability for biogenic amines. Interaction between the processes with general neurophysiological base was convincely proved by means of electrophysiological [3], neurochemical [9] and electron-microscopic methods [9, 10]. However, during traditional standard averaging of the results, interesting data about single cases, when under cooling the temperature of animal's body did not change, and the processes of BBB and EBA permeability had the dynamics typical for a cooled organism, “disappeared” and occurred to be beyond of discussion. In contrast, eutermal dynamics of BBB and EBA remained under a long-term hypothermia up to 28 °C. Such the facts result in the supposition, that the decrease of body temperature is not sufficient and quite necessary condition of the change in BBB and BEA permeability. Theoretical notes, analysis of own and literature data allowed us to suppose, that resonance excitation of receptors may be an adequate physiological stimulator of these processes [10, 12]. It was shown, that at rhythmic stimulation of caudal thermoreceptors, does not resulting in the change of body temperature more than by 1–2 °C, a significant rearrangement of the BEA patterns, correlating with complete dynamics in the change of BBB permeability (Figs. 1, 2), occurred. At different stages of RCE the values of autocorrelation and coherence functions in the second frequency range vary from above zero to limited ones with many times power differentials in the BEA spectrum; BBB permeability within some cooling minutes increases by 3–4 times, then decreases down to zero, returns to a norm and sharply increases. These processes result in synchronous oscillations of an organism vegetative status, to complete sympathetic and parasympathetic switchings up to the change of the symbol of cardiotropic effects (Table). Since it was illegally to explain such a significant change of organism's functional activity by its physical cooling in the given case, nothing

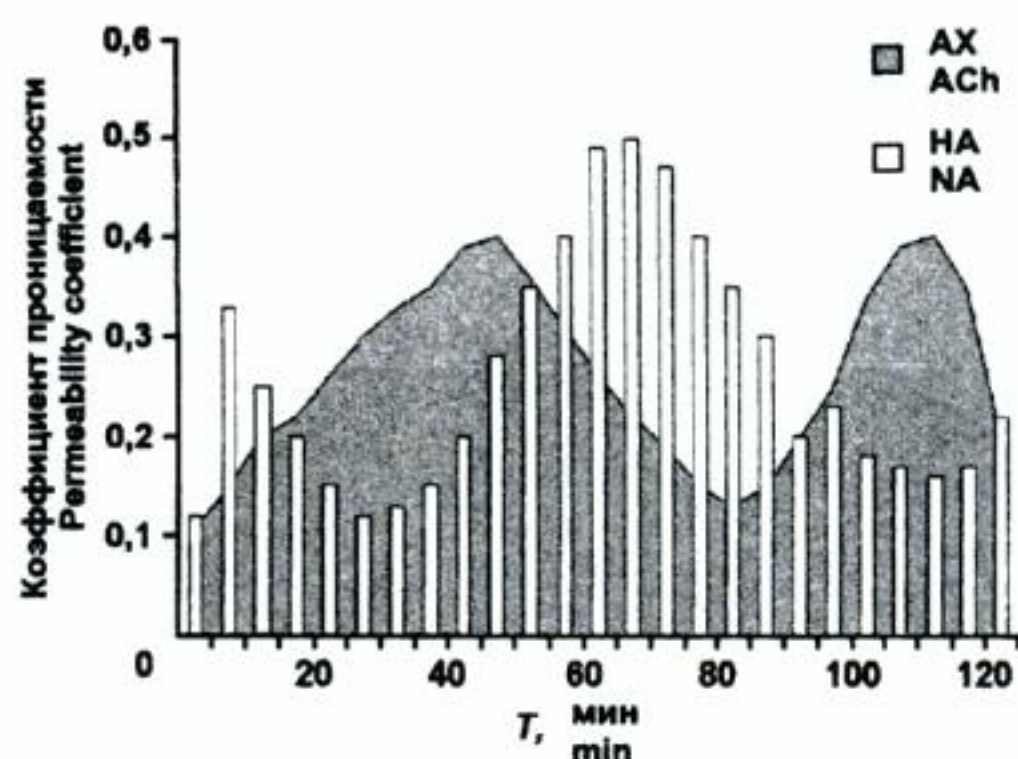


Рис. 1. Проницаемость ГЭБ для норадреналина и ацетилхолина при ритмических холодовых воздействиях.

Fig. 1. BBB permeability for noradrenaline and acetylcholine under rhythmic cold effects.

этапах РХВ значения функций автокорреляции и когерентности в секундном диапазоне частот варьируют от околонулевых до предельных с многократными перепадами мощности спектра БЭА; проницаемость ГЭБ в течение нескольких минут охлаждения увеличивается в 3–4 раза, падает до нуля, возвращается к норме и снова резко возрастает. Эти процессы приводят к синхронным колебаниям вегетативного статуса организма, к полным симпатопарасимпатическим переключениям вплоть до смены знака кардиотропных эффектов (таблица). Поскольку объяснить такое значительное изменение функциональной активности организма его физическим охлаждением в этом случае было неправомерно, оставалось постулировать наличие специального нейрофизиологического процесса или даже функциональной системы, а значит, и особой нейромедиации, обеспечивающей ее функционирование.

Периодическая активация ГЭБ стимулирует нервно-гормональный механизм "раскачки" установочной точки гомеостаза [10–12, 15]. Моделирование этого феномена наиболее успешно при ритмической гипотермии [10–12], когда происходит, например, повышение устойчивости организма к гипо- и гипертермии, инфекционным воздействиям и судорожным состояни-

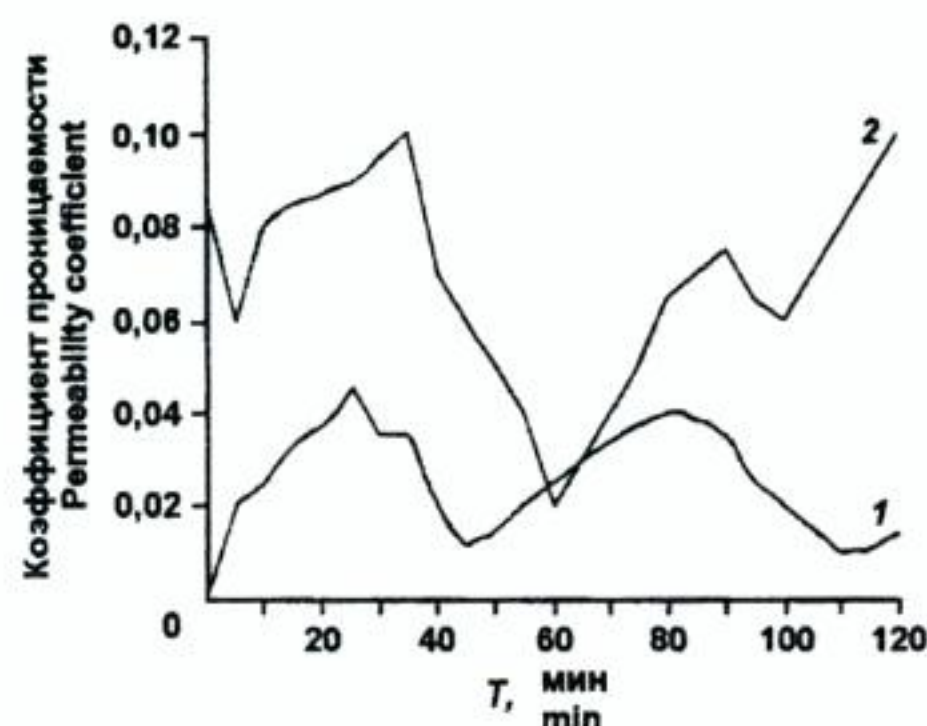


Рис. 2. Проницаемость ГЭБ для серотонина (1) и ГАМК (2) при ритмических холодовых воздействиях.

Fig. 2. BBB permeability for serotonin (1) and GAMK (2) under rhythmic cold effects.

remained as to postulate the presence of a special neurophysiological process or functional system, as well as neuromediation, providing its functioning.

Periodical BBB activation stimulates a nervous-hormonal mechanism of "kindling" in the adjusting homeostasis point [10–12, 15]. This phenomenon modeling is the most successful during rhythmic hypothermia [10–12], when, for example, an increase of organism stability to hyper- and hypothermia, infectious effects and convulsive states occurs [4, 11]. Such a cross adaptation, physiological by its nature, can be explained when making the supposition, that BBB under certain conditions interacted with electro-

The effect of rhythmic hypothermia on BBB permeability and heart rate (HR) on the background of systemic NA and ACh introduction

Pharmacophone	Parameters	Duration, min			
		0	45	65	85
NA	Heart rate, % of the norm	115 ± 5	0.13 ± 0.04	80 ± 5	0.12 ± 0.03
³ H-NA	Pc	110 ± 4	0.2 ± 0.05	120 ± 6*	0.45 ± 0.01*
ACh	Heart rate, % of the norm	60 ± 5*	0.5 ± 0.04*	80 ± 5	0.18 ± 0.05
³ H-ACh	Rc	105 ± 6	0.19 ± 0.05	75 ± 5	0.2 ± 0.06

Notes. NA — 0.5 ml/100 g of 0.2%-solution of noradrenaline hydrotartrate; ACh — 10 mg/100 g of acetylcholine chlorous; ³H-ACh, ³H-NA — 20 µl of the solution 1 µK/1 µl; Pc — ratio of specific brain radioactivity to specific blood radioactivity; * — differences in comparison with an initial value are statistically significant ($P < 0.01$).

Влияние ритмической гипотермии на проницаемость ГЭБ и ЧСС на фоне системного введения НА и АХ

Фармакофон	Параметры	Длительность 0,1 РГ, мин			
		0	45	65	85
НА	ЧСС, % от нормы	115 ± 5	0,13 ± 0,04	80 ± 5	0,12 ± 0,03
³ H-НА	Кп	110 ± 4	0,2 ± 0,05	120 ± 6*	0,45 ± 0,01*
АХ	ЧСС, % от нормы	60 ± 5*	0,5 ± 0,04*	80 ± 5	0,18 ± 0,05
³ H-АХ	Кп	105 ± 6	0,19 ± 0,05	75 ± 5	0,2 ± 0,06

Примечания. НА — 0,5 мл/100 г 0,2%-го раствора норадреналина гидрохлорид ; АХ — 10 мг/100 г ацетилхолина хлористого; ³H-АХ, ³H-НА — 20 мкл раствора 1 мкКи/1 мкл; Кп — отношение удельной радиоактивности мозга к удельной радиоактивности крови; * — различия по сравнению с исходным значением достоверны ($P < 0,01$).

genesis, immune, mono-oxygenase, thermoregulatory systems and other protective mechanisms of an organism. Such interactions can not be completely provided by traditional neuromediators, amino acids, biogenic amines or neuropeptides due to the time and place of their metabolism and diffusion. Therefore we supposed, that BBB functioning as a physiological system of slow regulation provides principally a new class of signal molecules-mediators — NO and CO [22].

ям [4, 11]. Объяснить такую перекрестную, физиологическую по своей природе, адаптацию можно, если предположить, что ГЭБ в определенных условиях взаимодействует с системами электрогенеза, иммунной, монооксигеназной, терморегуляторной и другими защитными механизмами организма. Взаимодействия такого рода в полной мере не могут быть обеспечены традиционными нейромедиаторами, аминокислотами, биогенными аминами или нейропептидами из-за времени и места их метаболизма и диффузии. Поэтому мы предположили, что функционирование ГЭБ в качестве физиологической системы медленной регуляции обеспечивает принципиально новый класс сигнальных молекул-посредников — NO и CO [22].

В настоящее время интенсивно разрабатываются различные методы прямого измерения содержания монооксидов азота и углерода в динамике экспериментальных воздействий [4, 19–21], однако, по нашему мнению, их применение требует осторожности, так как пока эти методики недостаточно стандартизированы. Поэтому для изучения роли NO и CO в регуляции проницаемости ГЭБ мы применили нейрофизиологическую стратегию, используя следующие твердо установленные данные нейробиологии этих монооксидов. Оксид азота (II) синтезируется из L-аргинина при участии фермента NO-синтазы (NOS) путем присоединения молекулярного кислорода к концевому атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина при двустадийной реакции ферментативного окисления с образованием в качестве промежуточного продукта L-гидроксиаргинина. Реакция гидроксирования ускоряется кофактором тетрагидробиоптеринем, является Ca^{2+} -кальмодулинзависимой, блокируется монооксидом углерода. На следующей стадии реакции стехиометрически образуется L-цитруллин и NO в свободнорадикальной форме. NOS существует в нескольких изоформах: конститутивная cNOS и индуцибельная iNOS, она близка по структуре к цитохрому P450 и имеет места связывания для флавин-аденин-нуклеотидов. Оба изофермента представляют собой флавопротеины и используют NADPH в качестве кофактора [9, 17]. Индуцибельная NOS является Ca^{2+} -кальмодулин-независимой и регулируется на генетическом уровне глюкокортикоидами, интерлейкином-4, бета-трансформирующим и тромбоцитарным факторами роста, активируется бактериальными липополисахаридами, эндотоксинами, интерлейкином-1, β , γ -интерфероном, α -тumor-некротизирующим фактором. Она вызывает образование и длительное выделение больших количеств (nmol) NO активированными макрофагами, нейтрофилами, сосудистым эндотелием, микроглиальными клетками, астроцитами [16]. В нервных клетках известна только cNOS, которая является Ca^{2+} -кальмодулинзависимой и в физиологических условиях в ответ на рецепторную стимуляцию катализирует образование NO в не-

Nowadays different methods of the direct measuring of nitrogen mono-oxides and carbon composition in the dynamics of experimental effects [4, 19–21] are intensively worked-out, however, from our point of view, their application required a carefulness, because till now these methods were not enough standardized. Therefore, to study CO and NO role in the BBB regulation we applied neurophysiological strategy, using distinctly fixed data on neurochemistry of these mono-oxides. Nitrogen oxide (II) is synthesized from L-arginine in the participation of NO-synthase enzyme (NOS) by means of the connection of molecular oxygen to final nitrogen atom in the guanidine group of L-arginine under two-stage reaction in enzymic oxidation with the formation of L-hydroxy arginine as a semi-product. Hydroxylation reaction is accelerated by tetrahydrobiopterine cofactor, is Ca^{2+} -calmodulin-dependent, is blocked by carbon monoxide. At the next stage of reaction L-citrulline and NO in a free radical form were stoichiometrically formed. NOS exists in some isoforms: constitutive cNOS and inducible iNOS, similar by structure to P450 cytochrome and having binding sites for flavin-adenine-nucleotides. Both isoenzymes are flavo-proteins, using NADPH as cofactor [9, 17]. Inducible NOS is Ca^{2+} -calmodulin-independent and is regulated at genetic level by glucocorticoids, interleukine-4, beta-transforming and thrombocytic growth factors, activated by bacterial lipopolysaccharides, endotoxines, interleukine-1, β , γ -interferon, α -tumor-necrotizing factor. It causes the formation and long-term releasing of the big numbers (nmol) of NO by activated macrophages, neutrophils, vascular endothelium, microglial cells, astrocytes [16]. In neuronal cells only cNOS is known, which is Ca^{2+} -calmodulin-dependent and under physiological conditions in response to receptor stimulation catalyzes NO formation in small numbers (p-mol). Nitric oxide (II) is a short-term living molecule (5–50 s), conducting a regulatory function, is connected to Fe^{2+} heme, activates soluble guanylate cyclase [16, 17].

CO is the second activator of soluble guanylate cyclase [9]. Therefore, concerning cGMF this molecule is by 30 times less efficient, monoxide itself is more stable comparing to hemoxygenase (HO), transforming heme into biliverdin and CO, as well as NOS, exists in two main forms (isoenzymes): hemoxygenase-1 (HO-1), induced by heme and formed by means of the expression of the corresponding mRNA gene in a spleen and liver, where HO-1 caused heme destruction of the erythrocyte origin. [27, 28]. Constitutive hemoxygenase-2 (HO-2) was widely spread in an organism, however, its highest concentrations were revealed in brain: in granular and cerebellum main cellular elements, hippocampus (especially in its pyramidal cells), olfactory bulb, cortex of big cerebral hemispheres and some other brain parts [21]. Possessing a rapid intercellular diffusion, central and peripheral synthesis systems, NO and CO are potentially ideal transmitters of intersystemic communications.

больших количествах (pmol). Оксид азота (II) — недолгоживущая молекула (5–50 с), — выполняя регуляторную функцию, соединяется с Fe^{2+} гема, активирует растворимую гуанилатциклазу [16, 17].

Другим активатором растворимой гуанилатциклазы является CO [9]. Хотя в отношении цГМФ эта молекула в 30 раз менее эффективна, сам монооксид гораздо более стабилен. Гемоксигеназа (HO), которая превращает гем в биливердин и CO, как и NOS, существует в двух основных формах (изоферментах): гем-оксигеназа-1 (HO-1), индуцируемая гемом и образующая путем экспрессии соответствующего гена мРНК в селезенке и печени, где HO-1 вызывает деструкцию гема эритроцитарной природы [27, 28]. Конститутивная гем-оксигеназа-2 (HO-2) широко распространена в организме, однако наибольшие концентрации ее обнаружены в головном мозге: гранулярных клетках и клетках Пуркинье мозжечка, гиппокампе (особенно в его пирамидальных клетках), обонятельной луковице, коре больших полушарий и некоторых других областях мозга [21]. Обладая быстрой межклеточной диффузией, центральной и периферической системами синтеза, NO и CO потенциально являются идеальными трансмитами межсистемных связей.

Действительно, нами показано, что при 0,1 РХВ монооксиды азота и углерода опосредуют повышение проницаемости ГЭБ, особенно для ^3H -НА и ^3H -АХ. Как свидетельствуют модельные нейрофизиологические опыты, существуют оптимальные для повышения проницаемости ГЭБ концентрации NO и CO [12]. На одних этапах гипотермического воздействия проницаемость ГЭБ не достигает своего максимального уровня из-за того, что оксид азота находится еще не в оптимальной концентрации, так как стимуляция синтеза NO внутрибрюшинным введением L-аргинина (1–2 мг/100 г) увеличивает проницаемость ГЭБ до уровня второго максимума проницаемости, а блокада α - и β -адренорецепторов фентоламином и пропранололом (1 мг/100 г) или Na^+ - K^+ -АТФазы оубаином (1 мг/100 г) снижает проницаемость ГЭБ до уровня контроля. На следующих этапах гипотермического воздействия концентрация NO, очевидно, находится на почти оптимальном для состояния повышенной проницаемости ГЭБ уровне, так как экспериментальное повышение и понижение содержания NO уменьшает проницаемость ГЭБ. Однако более мягкое воздействие на синтез NO внутрибрюшинным введением аспарагина (1 мг/100 г), увеличивающего концентрацию оксида азота опосредованно через аргининсукцинат, ведет к максимальному увеличению проницаемости ГЭБ. На минимумах проницаемости ГЭБ содержание NO, возможно, превышает оптимальный для обеспечения состояния повышенной проницаемости уровень, так как стимуляция синтеза NO аргинином ведет к дальнейшему снижению проницаемости, а опосредованное подавление синтеза оксида азота — к увеличению проницаемости барьера.

Анализ результатов экспериментов показал, что один из первых пиков проницаемости ГЭБ для ^3H -НА при 0,1 РХВ в основном обусловлен активацией не нейрональной (эндотелиальной или гли-

Really, it has been shown, that under 0.1 RCE nitric and carbon monoxides mediate an increase of BBB permeability, especially for ^3H -NA and ^3H -Ach. As model neurophysiological experiments testify, there are optimal for BBB permeability NO and CO concentrations [12]. At some stages of hypothermic storage the BBB permeability does not achieve its maximum level due to the fact, that nitric oxide has not optimal concentration, because NO synthesis stimulation by L-arginine intraperitoneal injection (1–2 mg/100 g) increases BBB permeability up to the level of the second permeability maximum, and blockade of α - and β -adrenoreceptors by phentolamine and propranolol (1 mg/100 g) or Na^+ - K^+ -ATPase by ouabain decreases BBB permeability down to the control level. At further stages of hypothermic effect NO concentration, obviously, is practically at optimal level for the state of BBB increased permeability because experimental rising and reduction of NO content decreases BBB permeability. However more mild effect on the NO synthesis by asparagine intraperitoneal injection (1 mg/100 g), increasing nitric oxide concentration by means of arginine succinate mediation, results in the maximum BBB permeability. At the minimums of BBB permeability NO content, perhaps, exceeds an optimal level for providing the state of increased permeability, because stimulation of NO synthesis by arginine results in further permeability decrease, and mediating suppression of the nitric oxide synthesis — to the augmentation of barrier permeability. The analysis of the experiment results showed, that one of the first permeability excitements of BBB permeability for ^3H -NA at 0.1 RCE mainly is stipulated by the activation of not neuronal (endothelial or glial) constitutive Ca^{2+} -dependent NO-synthase (blockade of calcium channels of L-type by verapamil (1 mg/100 g) reduces permeability, and twice increase of the frequency of cold effect does not shift permeability peak). Further permeability maximums connected to constitutive Ca^{2+} -dependent NO-synthase (blockade of calcium channels reduced permeability, an increase in the effect frequency displaced the peak of a low BBB resistance) and inducible (endothelial, glial, macrophagal) Ca^{2+} -not dependent NO-synthase (blockade of calcium channels did not affect an increased BBB permeability). The maximum period of resistance precedes the maximum peak of BBB permeability for ^3H -NA. At this time the NO content by some times exceeds optimal values for the barrier "opening" (agents, suppressing NO synthesis increase BBB permeability), while at permeability maximums both suppression and stimulation of nitric oxide accumulation reduce ^3H -NA and ^3H -Ach supply into a brain.

Taking into consideration all mentioned above, the following hypothermic scheme of the sequence of neurophysiological events, resulting in the increase of BBB permeability for thermocompetent neuromediators, should be proposed.

альной?) конститутивной Ca^{2+} -зависимой NO-синтазы (блокада кальциевых каналов L-типа верапамилом (1 мг/100 г) снижает проницаемость, а повышение в 2 раза частоты холодового воздействия не смещает пик проницаемости). Следующие максимумы проницаемости связаны с конститутивной Ca^{2+} -зависимой NO-синтазой нервной ткани (блокада кальциевых каналов снижает проницаемость, увеличение частоты воздействия смещает пик низкой резистентности ГЭБ) и индуцируемой (эндотелиальной, глиальной, макрофагальной?) Ca^{2+} -независимой NO-синтазой (блокада кальциевых каналов не влияет на повышенную проницаемость ГЭБ). Максимальному пику проницаемости ГЭБ для ^3H -НА предшествует максимальный период резистентности. В это время содержание NO на несколько порядков превышает оптимальные для "открытия" барьера значения (агенты, угнетающие синтез NO, повышают проницаемость ГЭБ), тогда как на максимумах проницаемости и подавление, и стимуляция наработки оксида азота снижают поступление ^3H -НА и ^3H -АХ в мозг.

Исходя из вышеизложенного, можно предложить следующую гипотетическую схему последовательности нейрофизиологических событий, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ для термокомпетентных нейромедиаторов.

Начальный этап ритмической гипотермии характеризуется комплексом условий (увеличение функциональной активности биогенных аминов и активирующих аминокислот, инициирующих процессы долговременной потенциации [3, 10–12]), которые приводят к каскадному включению разных изоформ NO-синтазы, что сопровождается повышением содержания циклических мононуклеотидов [12], при этом активируются соответствующие протеинкиназы, регулирующие процессы фосфорилирования цитозольных и цитоскелетных белков, создавая условия для повышенной проницаемости ГЭБ [10–12]. Очевидно, на начальных этапах РХВ активно включается в работу конститутивная NO-синтаза васкулярных эндотелиоцитов для "аварийной" компенсации напряжения симпатии периферии парасимпатикой мозга. Этот процесс контролируется компенсаторными механизмами ЦНС. В лимбических структурах мозга усиливается долговременная потенциация, активируется нейрональная cNOS, поддерживая оптимальный уровень NO (pmol). При дальнейшем охлаждении возникают характерные структурные изменения эндотелиоцитов и их нейроглиального окружения [10], в конечном итоге приводящие к усилению фагоцитарной активности, например перicyтов (рис. 3), а значит, и к активации индуцибельной Ca^{2+} -независимой NO-синтазы. Резко, в 1 000 раз (до pmol), возрастает наработка NO, "затапливая" рецепторные поля нейротрансмиттерных механизмов открытия ГЭБ, происходит экстренное восстановление его резистентности.

Цена такой компенсации очевидна — повышается вероятность локальных гипоксических явлений в компартментах эндотелиоцитов капилляров и нейроглиальных комплексов (рис. 4). Известно, что гипоксия приводит к существенному повышению активности гем-оксигеназ, которые считают белками теплового шока [13, 27]. При взаимодействии гемоксигеназы с цитохром-Р450-редуктазой образуется СО [13]. Монооксид углерода вызывает

An initial stage of rhythmic hypothermia is characterized by the complex of conditions (rising of functional activity of biogenic amines and activating amino acids, initiating the processes of long-term potentiation [3, 10–12]), resulting to a cascade switching of different NO-synthase isoforms, that is accompanied by an increase in cyclic mononucleotides content [12], corresponding protein kinases, regulating phosphorylation processes of cytosol and cytoskeletal proteins, making conditions for BBB permeability augmentation, are activated in this case [10–12]. Obviously, constitutive NO-synthase of vascular endotheliocytes for "urgent" tension compensation of periphery sympathetics by brain parasympathetics is actively is beginning to work at initial RCE stages. This process is controlled by CNS compensatory mechanisms. In the brain limbic structures a long-term potentiation accelerates, neuronal cNOS activates, maintaining an optimal NO level (pmol). Under further cooling the characteristic structural changes of endotheliocytes and their neuro-glia microenvironment [10], appear, finally resulting both in an increase of phagocytic activity, for example, of pericytes (Fig. 3) and in the activation of inducible Ca^{2+} -independent NO-synthase. NO working-out sharply increases by 1 000 times (up to nmol), by "flooding" of receptor fields of neurotransmitter mechanisms of BBB opening, an urgent recovery of its resistance occurs.

The cost of such a compensation is obvious — the probability of local hypoxia phenomena in the compartments of capillary endotheliocytes and neuro-glia complexes increase (Fig. 4). It is known, that hypoxia results in a significant rising of hemoxygenase activity, considered as heat shock proteins [13, 27]. During hemoxygenase interaction with cytochrome-P450-reductase CO forms [13]. Carbon monoxide causes adrenoreceptor dissociation with ligands, but does not affect acetylcholine receptors. These processes switch the mechanisms of BBB permeability for NA by partial permeability for Ach.

Further cooling promotes to the reduction of cytochrome P450 and GMF activity under growth of cAMF concentration [12], BBB permeability for Ach slightly decreases, returning optimal NO concentration for BBB functioning, reduces its destructive effect. Therefore, CO is so-called switch of sympathetic and parasympathetic flows, if NO is trigger of BBB permeability for biogenic amines. An increase of BBB permeability for ^3H -NA and ^3H -Ach stimulates adaptive thermospecific processes in brain, optimizing central mechanisms of temperature homeostasis.

Thus, NO and CO may be neuronal mediators of slow controlling brain system, included into regulation processes under extreme or systematically acting irritants, BBB is its structural and functional base. Under these conditions, from our point of view, CO mediates BBB with mono-oxygenase system, and NO — with immune one, combining three protective

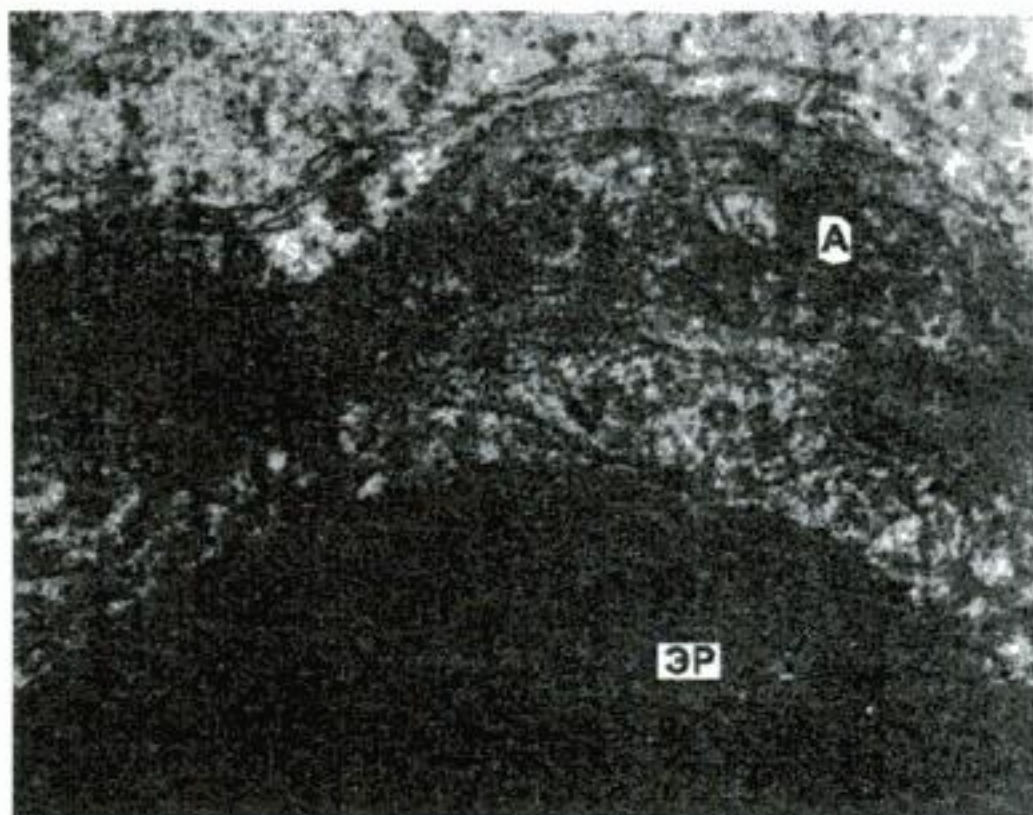


Рис. 3. Отложение пероксидазы хрена в фагоцитирующем перicyте и в месте перicyто-эндотелиального контакта. Капилляр переднего гипоталамуса крысы. $\times 50\,000$.

Fig. 3. Sedimentation of horse-radish peroxidase in the phagocytosing pericyte and in the place of pericyte-endothelial contact. Capillary of rat's interior hypothalamus. $\times 50\,000$.

диссоциацию адренорецепторов с лигандами, но не затрагивает ацетилхолиновые рецепторы. Эти процессы переключают механизмы проницаемости ГЭБ для НА на избирательную проницаемость для АХ.

Дальнейшее охлаждение способствует спаду активности цитохромов-Р450 и цГМФ при нарастании концентрации цАМФ [12], проницаемость ГЭБ для АХ несколько снижается, а для НА снова возрастает, так как СО тормозит синтез оксида азота, возвращая оптимальную для функционирования ГЭБ концентрацию NO, снижает его деструктивное действие. Следовательно, если NO является триггером проницаемости ГЭБ для биогенных аминов, то СО — своеобразным переключателем симпатопарасимпатических потоков. Повышение проницаемости ГЭБ для ^3H -НА и ^3H -АХ стимулирует адаптивные термоспецифические процессы в мозге, оптимизируя центральные механизмы температурного гомеостаза.

Таким образом, NO и СО могут быть нейрональными посредниками медленной управляющей системы мозга, включающимися в процессы регулирования при экстремальных или систематически действующих раздражителях; ее структурно-функциональной основой является ГЭБ. В таких условиях, по нашему мнению, СО осуществляет связь ГЭБ с монооксигеназной системой, а NO — с иммунной, объединяя три защитные системы в одну, которую можно условно назвать экзистоэнцефалической. Интеграция регулирующих систем, участвующих в поддержании гомеостаза, интенсивно изучается во всем мире и рассматривается как наиболее перспективная область современных исследований [1]. Можно думать, что монооксигеназная и иммунная системы составляют две части единой защитной системы организма [2]. В настоящее время имеется обширная информация, проливающая свет на формирование новой интегративной области биологии — нейро-иммуноэндокринологии [1]. При этом особое внимание уделяется анализу многостороннего обмена сигналами в пределах взаимодействующих систем и закономерностям, лежащим в основе интеграции каждого регу-

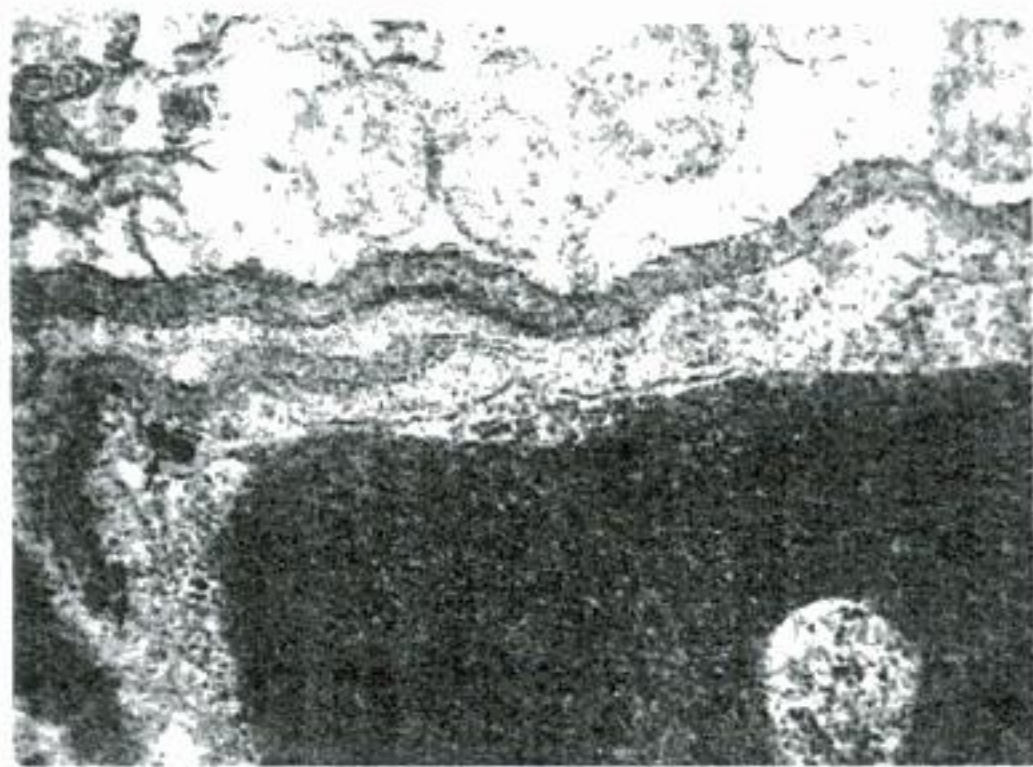


Рис. 4. Ультраструктура стенки капилляра медиопреоптической области гипоталамуса крысы после ритмических холодовых воздействий. Признаки отека концевых отростков астроцитов. $\times 60\,000$.

Fig. 4. Ultrastructure of capillary wall in medio-preoptic region of rat's hypothalamus after rhythmic cold effects. Oedema signs of the astrocyte terminal outgrowths. $\times 60\,000$.

systems into one, which conditionally can be named as existo-encephalic. Integration of the regulating systems, participating in homeostasis maintaining, is intensively studied all over the world and considered as the most perspective field of current investigations [1]. It can be considered, that mono-oxygenase and immune systems are two parts of one protective system of an organism [2]. Nowadays there is an information about the formation of new integral field in biology — neuro-immuno-endocrinology [1]. Thereat a special attention is given to the analysis of versatile exchange with signals in the limits of interacting systems and regularities, which are the base of the integration of each regulatory link. Namely from this point of view it is better to consider our data, testifying to the existence of brain integral protective system with not only BBB or immune-oxygenase processes. Protective function of EES is important, but not the only one, and interaction of the system with thermoregulatory processes defines its the most intriguing cryobiological function.

Principally, it is possible to “switch EES” by any quite significant effect, but temperature factors are more physiological and, probably, are used under natural conditions. Cryobiological aspects of the EES investigation elucidate a well-reasoned hypothesis of Yu. F. Pastukhov about “switching” of the adjusting point of homeostasis as neuro-hormonal mechanism of periodic broadening of its temperature limits. It is supposed, that “switching” phenomenon is characteristic for seasonal dynamics of different forms of torpid states in mammals and birds, as well as for the process of natural adaptation of the Northern eutherms animals [15].

ляторного звена. Именно под этим углом зрения наиболее продуктивно рассматривать наши данные, которые свидетельствуют о существовании единой защитной системы мозга, не сводящейся только к гематоэнцефалическому барьеру или иммунооксигеназным процессам. Защитная функция ЭЭС — важная, но не единственная, взаимодействие системы с терморегуляторными процессами определяет ее наиболее интригующую криобиологическую функцию.

В принципе “запустить” ЭЭС можно любым достаточно значимым воздействием, однако температурные факторы кажутся более физиологичными и вероятно используются в природных условиях. Криобиологические аспекты изучения ЭЭС конкретизируют аргументированную гипотезу акад. Ю. Ф. Пастухова о “раскачке” установочной точки гомеостаза как нервно-гормональном механизме периодического расширения его температурных границ. Предполагается, что феномен “раскачки” характерен для всей сезонной динамики разных форм торпора млекопитающих и птиц, а также для процесса природной адаптации северных эутермных животных [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И. Г. Современные представления о взаимодействиях регулирующих систем: нервной, эндокринной и иммунной // *Успехи физиол. наук.*— 1996.— 27, № 1.— С. 3–19.
2. Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран.— М.: Наука, 1982.— 56 с.
3. Бабичук Г. А., Марченко В. С., Шило А. В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 2. Ритмические холодовые воздействия повышают проницаемость гематоэнцефалического барьера для терморегуляторных нейромедиаторов // *Пробл. криобиологии.*— 1995.— № 2.— С. 3–9.
4. Башкатова В. Г., Вицкова Ю. Г., Наркевич В. Б. и др. Возможная роль оксида азота в патогенезе модельных судорожных состояний различной природы // *Бюл. экперим. биол. и мед.*— 1998.— 125, № 1.— С. 26–29.
5. Булдакова С. Л., Дутова Е. А., Ивлеев С. В. Вызванная температурой длительная потенциация в срезах гиппокампа // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.*— 1993.— 29, № 4.— С. 364–370.
6. Гурин В. Н., Гурин А. В. Роль процессов растормаживания пейсмекеров в рефлекторной деятельности нервных центров // *Физиология человека.*— 1997.— 23, № 2.— С. 147–149.
7. Илюхина В. А. Физиология функциональных состояний головного мозга человека в норме и при патологии // *Механизмы деятельности мозга человека. Часть 1. Нейрофизиология человека* / Под ред. Н. П. Бехтерева.— Л.: Наука, 1988.— С. 358–425.
8. Ливанов М. Н., Русин В. С., Симонов П. В. и др. Диагностика и прогнозирование функционального состояния мозга человека.— М.: Наука, 1988.— 206 с.
9. Марков Х. М. Окись азота и окись углерода — новый класс сигнальных молекул // *Успехи физиол. наук.*— 1996.— 27, № 4.— С. 30–43.
10. Марченко В. С. К концепции экзистэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 1 // *Пробл. криобиологии.*— 1997.— № 4.— С. 14–20.
11. Марченко В. С. Экзистэнцефалические механизмы повышения устойчивости организма к гипо- и гипертермии // *Пробл. криобиологии.*— 1998.— № 1.— С. 64–65.
12. Марченко В. С., Бабичук Г. А., Шило А. В. и др. К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) — один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? // *Пробл. криобиологии.*— 1995.— № 3.— С. 10–19.
13. Моттерлини Р., Форести Р., Грин К. Дж. Повышенная экспрессия БТШ32 (гем-оксигеназы-1) в эндотелиальных

REFERENCES

1. Akmaev I. G. Modern ideas about the interrelations of regulating systems: nerve, endocrinic and immune // *Successes in Physiol. Sciences.*— 1996.— 27, № 1.— P. 3–19.
2. Archakov A. I. Oxygenases of biological membranes.— M.: Nauka, 1982.— 56 p.
3. Babichuk G. A., Marchenko V. S., Shilo A. V. et al. To the mechanisms of BBB permeability regulation in a cooled brain. Report 2. Rhythmic cold effects increase permeability of BBB for thermoregulatory neuromediators // *Probl. kriobiologii.*— 1995.— № 2.— P. 3–9.
4. Bashkatova V. G., Vitskova Yu. G., Narkevich V. B. Possible role of nitric oxide in pathogenesis of model convulsive states of different origin // *Bul. experim. biol. i med.*— 1998.— 125, № 1.— P. 26–29.
5. Buldakova S. L., Dutova E. A., Ivlev S. V. Long-term potentiation in hippocampus sections, caused by temperature // *Zhurn. evolutsii i fiziologii.*— 1993.— 29, № 4.— P. 364–370.
6. Gurin V. N., Gurin A. V. The role of the processes of pacemakers unbrake in the reflectory activity of nerve centers // *Fiziologiya cheloveka.*— 1997.— 23, № 2.— P. 147–149.
7. Ilyukhina V. A. Physiology of human brain functional states in the norm and during pathology // *Mechanisms of human brain activity. Part 1. Human neurophysiology* / Ed. by N. P. Bekhterev.— L.: Nauka, 1988.— P. 358–425.
8. Livanov M. N., Rusinov V. S., Simonov P. V. et al. Diagnosis and forecasting of the human brain functional state.— M.: Nauka, 1988.— 206 p.
9. Markov Kh. M. Nitric oxide and carbon oxide — new class of signal molecules // *Uspehi fiziol. nauk.*— 1998.— 27, № 4.— P. 30–43.
10. Marchenko V. S. To the conception of existo-encephalic system of cooled brain. Part 1 // *Probl. kriobiologii.*— 1997.— № 4.— P. 14–20.
11. Marchenko V. S. Existo-encephalic mechanisms of the increase of organism's stability to hypo- and hyperthermia // *Probl. kriobiologii.*— 1998.— № 1.— P. 64–65.
12. Marchenko V. S., Babichuk G. A., Shilo A. V. et al. To the mechanisms of the cooled brain BBB regulation. Report 3. Nitric oxide (II) is one of the triggers of BBB permeability in the structure of super-slow controlling system of an organism? // *Probl. kriobiologii.*— 1995.— № 3.— P. 10–19.
13. Motterlini R., Foresti R., Green C. J. An increased expression of heat shock proteins CSP32 (hemoxygenase-1) in vascular endothelial cells under hypoxia conditions // *Probl. kriobiologii.*— 1997.— № 1–2.— P. 104.
14. Otellin V. A. Intercellular space and non-synaptic interneuronal links of mammalian brain // *Arhiv anatomii, gistologii i embriologii.*— 1987.— XCIII, № 9.— P. 5–19.
15. Pastukhov Yu. F. Phenomenon of mammalian seasonal hypometabolism // *Termofiziologiya. Inform. Bul. Issue 2.*— Minsk, 1991.— P. 7–18.
16. Raevsky K. S. Nitric oxide — new physiological messenger: possible role at the pathology of nerve system // *Bul. eksperim. biol. i med.*— 1997.— 123, № 5.— P. 484–490.
17. Tkachenko M. M. Nitric oxide and vascular regulation (literature review) // *Zhurn. AMN Ukrainy.*— 1997.— 3, № 2.— P. 241–254.
18. Boje K. M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis // *Brain Res.*— 1996.— 720, № 1–2.— P. 75–83.
19. Cespuglio R., Bulet S., Marinesco S. et al. Voltametric detection of cerebral NO in rats. Variations of the signal throughout the sleep-wakefulness cycle // *C. R. Acad. Sci. III.*— 1996.— 319, № 3.— P. 191–200.
20. Gourine A. V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits // *Gen. Pharmac.*— 1995.— 26, № 4.— P. 835.
21. Ingi T., Ronnett G. V. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons // *J. Neuroscience.*— 1995.— 15, № 12.— P. 8214–8222.

- клетках сосудов в условиях гипоксии // Пробл. криобиологии.— 1997.— № 1–2.— С. 104.
14. Отеллин В. А. Межклеточное пространство и несинаптические межнейронные связи головного мозга млекопитающих // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.— 1987.— XCIII, № 9.— С. 5–19.
 15. Пастухов Ю. Ф. Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Термофизиология. Информ. бюл. Вып. 2.— Минск, 1991.— С. 7–18.
 16. Раевский К. С. Оксид азота — новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии нервной системы // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1997.— 123, № 5.— С. 484–490.
 17. Ткаченко М. М. Оксид азота та судинна регуляція (огляд літератури) // Журн. АМН України.— 1997.— 3, № 2.— С. 241–254.
 18. Boje K. M. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates blood-brain barrier disruption during experimental meningitis // Brain Res.— 1996.— 720, № 1–2.— P. 75–83.
 19. Cespuglio R., Burlet S., Marinesco S. et al. Voltametric detection of cerebral NO in rats. Variations of the signal throughout the sleep-wakefulness cycle // C. R. Acad. Sci. III.— 1996.— 319, № 3.— P. 191–200.
 20. Gourine A. V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits // Gen. Pharmac.— 1995.— 26, № 4.— P. 835.
 21. Ingi T., Ronnett G. V. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons // J. Neuroscience.— 1995.— 15, № 12.— P. 8214–8222.
 22. Marchenko V. S. Neuronal gas (NO and CO) in the mechanisms of permeability of the blood-brain barrier of the cooled brain // Problems of cryobiology.— 1997.— № 3.— P. 57–59.
 23. Mayhan W. G. Role of nitric oxide in histamine-induced increases in permeability of the blood-brain barrier // Brain res.— 1996.— 743, № 1–2.— P. 70–76.
 24. Mayhan W. G. Role of nitric oxide in the blood-brain barrier during acute hypertension // Brain Res.— 1995.— 686, № 1.— P. 99–103.
 25. Mayhan W. G., Didion S. P. Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. // Stroke.— 1996.— 27, № 5.— P. 965–970.
 26. Miller R. D., Monsul N. T., Vender J. R., Lehmann J. C. NMDA and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow // J. Neurol. Sci.— 1996.— 136, № 1–2.— P. 37–40.
 27. Motterlini R., Hidalgo A., Sammut I. et al. A precursor of the nitric oxide donor SIN-1 modulates the stress protein heme oxygenase-1 in rat liver // Biochem. and Biophys. Research Commun.— 1996.— 225.— P. 167–172.
 28. Motterlini R., Vandergriff K. D., Winslow R. M. Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications // Transfusion Medicine Reviews.— 1996.— X, № 2.— P. 77–84.
 29. Nag S. Role of the endothelial cytoskeleton in blood-brain-barrier permeability to protein // Acta Neuropathol. (Berl).— 1995.— 90, № 5.— P. 454–460.
 30. Olesen S. P. An electrophysiological study of microvascular permeability and its modulation by chemical mediators // Acta Physiol. Scand. Suppl.— 1989.— 579.— P. 1–28.
 31. Shukla A., Dikshit M., Srimal R. C. Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain // Experientia.— 1996.— 52, № 2.— P. 136–140.
 32. Stevens C. F., Wang Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase // Nature.— 1993.— 364.— P. 147–148.
 33. Zhuo M., Small S. A., Kandel E. R., Hawkins R. D. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus // Science.— 1993.— 260.— P. 1946–1950.

Accepted in 30.03.99

Поступила 30.03.99

Чувствительность к программному и циклическому замораживанию-отогреву клеток эмбриональной печени человека 7–12 недель гестации

В. И. ГРИЩЕНКО, А. И. ТАРАСОВ, С. В. РУДЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Sensitivity to a Programmed and Cyclic Freeze-Thawing of Human Embryonic Liver Cells of 7–12 Weeks of Gestation

V. I. GRISCHENKO, A. I. TARASOV, S. V. RUDENKO, A. Yu. PETRENKO

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

Исследовались клетки эмбриональной печени человека (ЭПЧ) 7–12 недель гестации. Оценивались общее количество клеток, полученное от доноров различного возраста, а также жизнеспособность клеточных суспензий ЭПЧ до и после программного криоконсервирования и нескольких циклов быстрого замораживания-отогрева. Методами морфометрии и проточной кондуктометрии были получены распределения клеток суспензии по объему и поверхностно-объемному отношению. Отмечено линейное увеличение содержания клеток в ЭПЧ с возрастом. Жизнеспособность оттаянной суспензии после программного замораживания не зависела от возраста образцов. Напротив, к быстрому замораживанию-отогреву препараты 7–9 недель оказались более стойкими, чем образцы 10–12 недель гестации. Объем клеток ЭПЧ варьирует в диапазоне 50–350 фл, при этом более половины клеток имеет объем 100–200 фл; изменений объема с возрастом не обнаружено. Достоверные отличия между поверхностно-объемным отношением клеток ЭПЧ 7–9 и 10–12 недель, а также уменьшение среднего по суспензии поверхностно-объемного отношения после каждого цикла замораживания-отогрева подчеркивают роль процессов массопереноса в развитии криоповреждений.

Вивчалися клітини ембріональної печінки людини (ЕПЛ) 7–12 тижнів гестації. Оцінювалися загальна кількість клітин, отриманих від донорів різного віку, а також життєздатність клітинних суспензій ЕПЛ до й після програмного криоконсервування та кількох циклів швидкого заморожування-відігрівання. Методами морфометрії та проточної кондуктометрії було отримано розподіли клітин суспензії за об'ємом і поверхнево-об'ємним відношенням. Відмічено лінійне збільшення вмісту клітин в ЕПЛ з віком. Життєздатність суспензії, яка відтала після програмного заморожування, не залежала від віку препаратів. До швидкого заморожування-відігрівання, навпаки, препарати віком 7–9 тижнів виявилися більш стійкими, ніж препарати 10–12 тижнів гестації. Об'єм клітин ЕПЛ варіює в діапазоні 50–350 фл, при цьому більша частина клітин має об'єм 100–200 фл, змін в об'ємному розподілі з віком не визначено. Достовірна різниця між поверхнево-об'ємним відношенням клітин ЕПЛ 7–9 і 10–12 тижнів, а також зменшення середнього по суспензії поверхнево-об'ємного відношення після кожного циклу заморожування-відігрівання підкреслює роль процесів масопереносу у розвитку крипошкоджень.

Human embryonic liver (HEL) cells of 7–12 weeks of gestation were investigated. Total number of cells, obtained from donors of different age, as well as the viability of HEL cellular suspensions before and after programmed cryopreservation and several cycles of rapid freeze-thawing were estimated. Using the morphometry and flow conductometry techniques we obtained the distributions of the suspension cells by volume and surface-volume ratio. A linear increase of cell content in HEL with the age was noted. The viability of frozen-thawed suspension after programmed freezing did not depend on a sample age. In contrast, the preparations of 7–9 weeks occurred to be more resistant to rapid freeze-thawing, than the samples of 10–12 gestation weeks. The volume of HEL cells varies within the range of 50–350 fl; in this case the majority of cells having the volume of 100–200 fl; no changes in the volume with the age were revealed. Statistically significant differences between the surface-volume ratio of HEL cells of 7–9 and 10–12 weeks, as well as a decrease in the mean by suspension surface-volume ratio after each freeze-thawing cycle underline the role of mass-transfer processes in the development of cryoinjuries.

Клетки эмбриональной печени человека могут быть использованы для лечения целого ряда заболеваний кроветворной системы и различного рода печеночных недостаточностей [4, 11]. Такому широкому применению способствует гетерогенность клеточного состава этого органа, в котором представлены предшественники паренхимальных клеток печени и кроветворных клеток различной степени коммитированности [3].

Известны работы, посвященные выделению и применению клеток ЭПЧ для трансплантации [8]. Однако вопросы о механизме действия клеток на организм реципиента и влиянии криоконсервирования на их состояние не получают однозначных

The cells of human embryonic liver can be used for treatment of a number of diseases of hematopoietic system and some kinds of hepatic insufficiencies [4, 11]. Heterogeneity of cell composition of this organ, where the precursors of liver parenchymal cells and hematopoietic cells of different degree of commitment are presented [3], contributes to such a wide application.

The papers are well-known devoted to the HEL cells isolation and application for transplantation [8]. However the questions on the mechanism of cell effect to a recipient's organism and cryopreservation effect on their state are not unequivocally answered. Such an ambiguity is one of the causes, due to which the

ответов. Такая неопределенность является одной из причин, по которым трансплантация клеток ЭПЧ не занимает надлежащего места в современной медицинской практике. Высказывается предположение [6], что гемопоэтические клетки-предшественники обладают большей устойчивостью к действию низких температур, так как используют мембранонезависимый путь генерации энергии. Однако вопрос их криоустойчивости до настоящего времени не исследован.

Цель данной работы — изучение чувствительности клеток ЭПЧ различного срока гестации к криоконсервированию и последующему циклическому замораживанию-отогреву. В задачи исследования входило определение общего содержания клеток в суспензии ЭПЧ различного возраста, влияния режимного криоконсервирования и последующего циклического замораживания-отогрева на их жизнеспособность, а также изучение геометрических параметров наиболее устойчивых клеток.

Суспензию клеток ЭПЧ получали из печени доноров 7–12 недель гестации и смешивали с равным объемом криозащитной среды, содержащей 10% диметилсульфоксида. Программное охлаждение производили в три этапа: до температуры -40°C со скоростью $1^{\circ}/\text{мин}$, затем до -80°C со скоростью $10^{\circ}/\text{мин}$, после чего образец погружали в жидкий азот. Отогрев образцов выполняли на водяной бане с температурой 40°C до 0°C .

Для циклического замораживания-отогрева деконсервированные криоконтейнеры с одинаковым объемом суспензии ЭПЧ со льда помещали в жидкий азот и быстро отогревали. После каждого цикла замораживания-отогрева аликвоту суспензии отбирали для анализа.

Жизнеспособность суспензии ЭПЧ до и после криоконсервирования определяли по прокрашиванию трипановым синим. Для исключения вклада лизиса клеток в процессе замораживания-отогрева, а также учитывая, что измерения проводились на одном и том же образце, относительную жизнеспособность определяли по формуле

$$R = C_{(i)} / C_{(0)},$$

где $C_{(i)}$ — содержание жизнеспособных (непрокрашивающихся) клеток в единице объема исследуемой суспензии; $C_{(0)}$ — изначальное содержание жизнеспособных клеток.

Подсчет клеток производился под микроскопом JENAVAL (Karl Zeiss, Jena, ФРГ).

При морфометрических измерениях использовали видеокамеру, совмещенную с компьютером. Данные анализировали с помощью прикладной программы. Измерение геометрических параметров двумерных проекций клеток проводили, аппроксимируя их эллипсоидами. Исходя из этого приближения, рассчитывали объем и площадь поверхности клетки [5]. Программная погрешность измерения длины составляла $0,35\text{ мкм}$.

transplantation of HEL cells does not occupy the proper place in modern medical practice. One suggests [6], that hematopoietic cells — precursors have a high resistance to low temperature effect, because they use a membrane-independending way of the energy generation. However the question of their cryoresistance has not been studied yet.

The aim of the work was to study the sensitivity of HEL cells of different gestation term to cryopreservation and following cyclic freeze-thawing. The determination of total content of cells in HEL suspension of different age, the effect of a regimen cryopreservation and following cyclic freeze-thawing on their viability, as well as the study of geometrical parameters of the most resistant cells comprised the tasks of the investigation.

HEL cell suspension was obtained from donors' livers of 7–12 gestation weeks and mixed with an equal volume of cryoprotective medium, containing 10% of dimethyl sulphoxide. A programmed freezing was accomplished by three stages: down to the temperature of -40°C with $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate, down to -80°C with $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ rate, after that a sample was immersed into liquid nitrogen. Sample thawing was performed in a water bath with the temperature of 40°C up to 0°C .

For cyclic freeze-thawing, the frozen-thawed cryocontainers with an equal volume of HEL suspension were placed from ice into a liquid nitrogen and rapidly thawed. After each freeze-thawing cycle the suspension aliquote was taken for analysis.

The viability of HEL suspension before and after cryopreservation was determined by trypane blue staining. To exclude the contribution of cell lysis during freeze-thawing process and taking into consideration the fact, that the estimation was conducted in the same sample, the relative viability was determined by the formula:

$$R = C_{(i)} / C_{(0)},$$

where $C_{(i)}$ — viable (non-stained) cell content in unit volume of studied suspension; $C_{(0)}$ — the initial content of viable cells.

The calculation was done with JENAVAL microscope (Karl Zeiss, Jena, Germany).

The videocamera, aligned with computer was used at morphometrical measurements. The data was analyzed by means of an applied program. The measurement of geometrical parameters of cell two-dimensional projections was accomplished by approximating them with ellipsoids. The volume and the area of cell surface were calculated proceeding from this approximation [5]. The program error of the length measurement made $0.35\text{ }\mu\text{m}$.

The distribution of HEL cell suspension by the volume was investigated using the method of flow conductometry (Coulter's counter). To estimate statistical significance of differences between the data groups we used the Wilcoxon's non-parametric test,

Распределение суспензии клеток ЭПЧ по объему было исследовано методом проточной кондуктометрии (счетчик Коултера). Для оценки достоверности различий между группами данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона, считая достоверными различия с показателем значимости $p < 0,05$.

В работе анализу были подвергнуты 150 препаратов, полученных в 1998–1999 гг. Все образцы были разделены на 7 групп в соответствии со сроками гестации: 6–7, 7–8, 8–9, 9, 9–10, 10 и более недель. Количество образцов каждой группы составляло не менее 15. В противном случае (для получения статистически достоверных результатов) образцы соседних групп объединяли. Печень удавалось дифференцировать, начиная с 6–7 недель гестации; общее содержание клеток в образцах этого возраста составляло 25 млн. На рис. 1 показано относительное изменение общего количества клеток ЭПЧ с увеличением срока гестации. За единицу принята средняя величина содержания клеток в печени плода 11–12 недель гестации. Видно, что с увеличением срока гестации общее количество клеток, выделяемое из ЭПЧ, росло. Относительное увеличение средних значений количества клеток с возрастом может быть представлено уравнением:

$$N = 0,19t - 0,09,$$

где t — возраст образца, недели.

Жизнеспособность препаратов, полученных из печени эмбрионов различных сроков гестации, не имела достоверных отличий и превышала 80%.

Криоконсервирование, включавшее эквilibрацию с криозащитной средой, программное трехэтапное замораживание, хранение в жидком азоте (более суток) и быстрый отогрев, приводило к снижению жизнеспособности образцов на 15–20%. При этом достоверных возрастных различий выявлено не было. Этот факт при рассмотрении результатов дальнейшего циклического замораживания-отогрева позволил принять жизнеспособность клеток ЭПЧ после программного криоконсервирования за 100%.

На рис. 2 показано влияние четырех циклов замораживания-отогрева на сохранность клеток ЭПЧ. Препараты были разделены на 4 возрастные

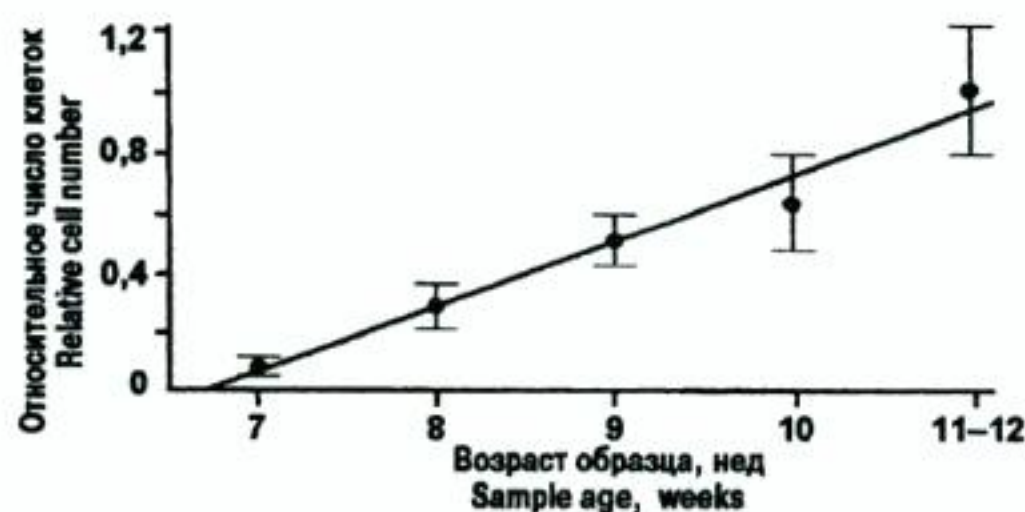


Рис. 1. Относительное содержание клеток в печени плодов различных сроков гестации.

Fig. 1. Relative cell content in fetal liver of different gestation terms.

considering the differences with $p < 0.05$ as statistically significant.

In the work 150 preparations, obtained in 1998–1999 were analysed. All samples were divided into 7 groups according to the gestation terms: 6–7, 7–8, 8–9, 9, 9–10, 10 and more than 10 weeks. A number of samples of each group was not lesser, than 15. Otherwise (to obtain statistically significant results) the samples of neighbouring groups were combined. We managed to differentiate liver, beginning from the 6–7 gestation weeks; total cell content in the samples of this age made 25 mln. Relative change in total number of HEL cells with increase of gestation term is shown in Fig. 1. The mean value of cell content in fetal liver of the 11–12 gestation weeks was accepted as a unit. It is seen, that with an increase in gestation term the total number of cells, isolated from HEL, augmented. The relative increase in the mean values of cell number with age can be presented by the equation:

$$N = 0.19t - 0.09,$$

where t — sample age, weeks.

The viability of preparations, obtained from embryos' liver of different gestation terms did not have significant differences and exceeded 80%.

Cryopreservation, including equilibration with a cryoprotective medium, programmed three-stage freezing, storage in liquid nitrogen (more than 1 day) and rapid thawing resulted in a decrease in sample viability by 15–20%. Statistically significant age differences were not revealed. This fact, when considering the results of following cyclic freeze-thawing, allowed to accept HEL cell viability after programmed cryopreservation as 100%.

The effect of four freeze-thawing cycles on HEL cell survival is shown in Fig. 2. The preparations were divided into 4 age-specific groups: 6–7, 8–9, 10 and 11–12 weeks. It is obvious, that the first freeze-thawing cycle results in the death of more than 50% of cells, the second and the following ones allowed to reveal the differences in fetal liver cell sensitivity of

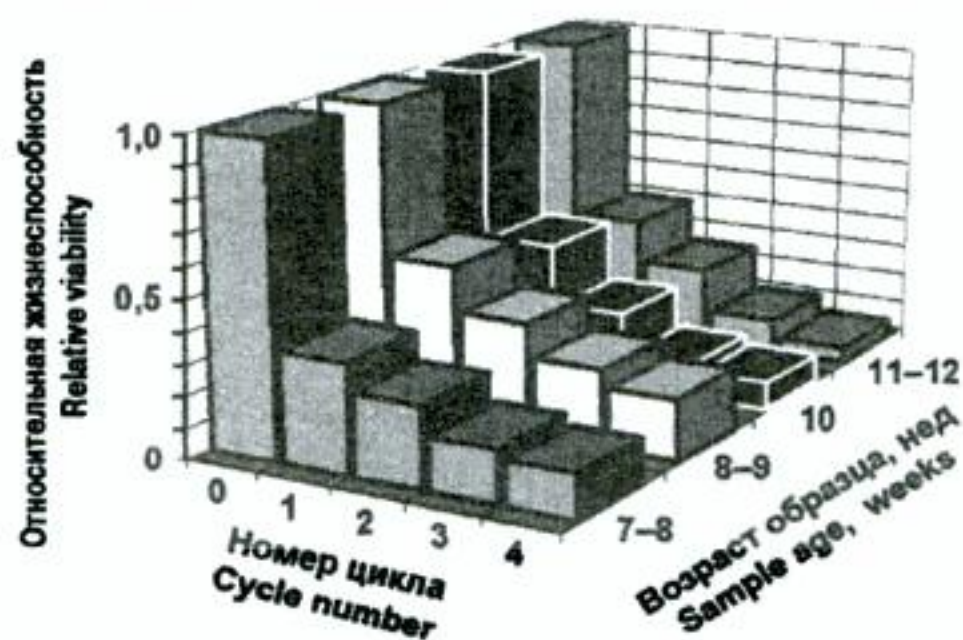


Рис. 2. Влияние циклического замораживания-отогрева на жизнеспособность клеточных суспензий ЭПЧ различных сроков гестации.

Fig. 2. Effect of cyclic freeze-thawing on HEL cell suspension viability of different gestation terms.

группы: 6–7, 8–9, 10 и 11–12 недель. Видно, что первый цикл замораживания-отогрева приводил к гибели более 50% клеток, второй и последующие циклы позволили выявить различия в чувствительности клеток печени плодов разных сроков гестации к действию низких температур. Жизнеспособность клеточных суспензий, полученных из плодов 6–7 и 8–9 недель гестации, с каждым циклом замораживания-отогрева изменяется сходным образом. Также не было выявлено существенных различий между жизнеспособностью образцов 10 и 11–12 недель. Опираясь на эти данные, в ходе последующих экспериментов мы рассматривали лишь две возрастные категории образцов: 7–9 и 10–12 недель гестации (рис. 3). После четвертого цикла сохранность образцов позднего срока составляла около 10%, для раннего срока эта величина превышала 20%.

Объемные характеристики клеток печени эмбрионов различных сроков гестации изучали двумя независимыми методами — морфометрическим и кондуктометрическим. Распределения клеток по объему, полученные с помощью счетчика Коултера (рис. 4), показывают, что в препаратах присутствуют объекты малых объемов (50–70 фл) наряду с клетками среднего объема. Однако наличие клеток объемом 50–70 фл противоречит не только литературным данным [1], но и морфометрическим измерениям. Полагаем, что эти объекты представляют собой везикулы или обломки клеток. Поэтому мы считаем, что основные пики распределений клеток соответствуют объемам 115 (7–9 недель) и 105 фл (10–12 недель). Несмотря на некоторое отличие гистограмм 7–9 и 10–12 недель гестации, существенных возрастных различий распределения выявлено не было.

Распределение клеток по объему, полученное с помощью микрофотографирования (рис. 5), показывает, что в исследуемых препаратах большинство клеток имеют объем от 50 до 350 фл. Так, мак-

various gestation terms to the low temperature effect. The viability of cell suspension, obtained from fetuses of 6–7 and 8–9 gestation weeks, changes in a similar way with each freeze-thawing cycle. We did not also reveal any considerable differences between the sample viability of 10 and 11–12 weeks. Basing on these data during following experiments we considered only two age categories of the samples: 7–9 and 10–12 gestation weeks (Fig. 3). After the fourth cycle the survival of late term samples made approximately about 10%, as for the samples of early term this value exceeded 20%.

Volume characteristics of embryos' liver cells of various gestation terms were studied using two independent methods — morphometrical and conductometrical ones. Cell distributions by volume, obtained by means of Coulter's counter (Fig. 4) demonstrate, that the objects of small volumes (50–70 fl) are present in the preparations among with the mean volume cells. However the cell presence of 50–70 fl volume contradicts not only the literature data [1], but morphometrical measurements. We believe, that these objects represent vesicles or cell fragments. Therefore we suppose, that main peaks of cell distribution correspond to 115 (7–9 weeks) and 105 fl (10–12 weeks) volumes. In spite of some difference in histograms of 7–9 and 10–12 gestation weeks, there were no considerable age-specific differences of the distributions.

Cell distribution by the volume, obtained by means of microphotography (Fig. 5) demonstrates, that in studied preparations the majority of cells has the volume from 50 to 350 fl. So, their maximal number in the preparations of 7–9 gestation weeks corresponds to 130 fl volume, and in the preparations of 10–12 weeks — 170 fl. This method did not also reveal any considerable age-specific differences.

Thus the main peak of cell distribution by volume, obtained by various methods, is in the range of 100–200 fl, and histograms have a visible asymmetry

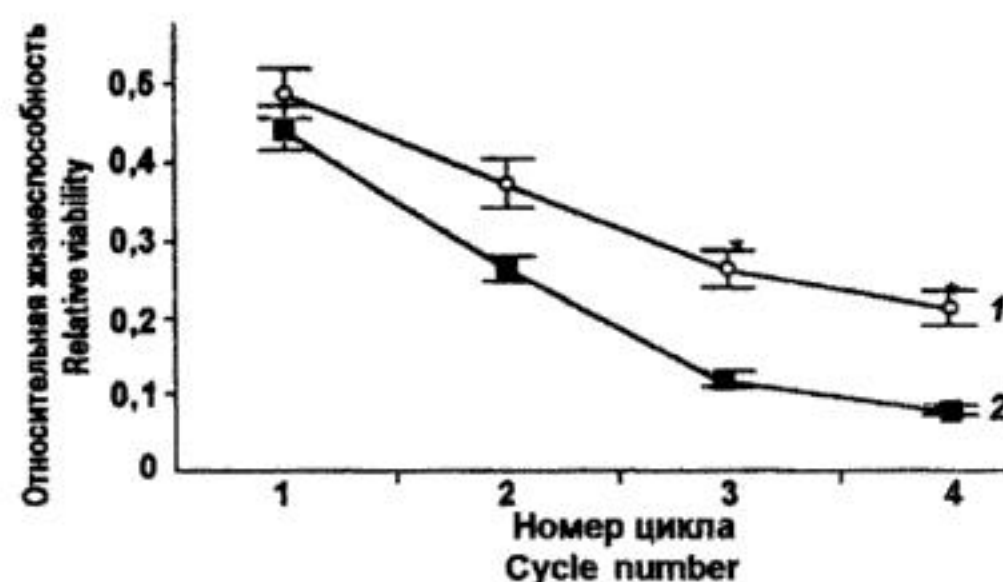


Рис. 3. Влияние циклического замораживания-отогрева на жизнеспособность клеточных суспензий ЭПЧ 7–9 (1) и 10–12 (2) недель. * — различия по отношению к возрастной группе 10–12 недель достоверны ($p < 0,05$).

Fig. 3. Effect of cyclic freeze-thawing on HEL cell suspension viability of 7–9 (1) and 10–12 weeks (2). * — differences in respect to the 10–12 weeks age groups are statistically significant ($p < 0.05$).

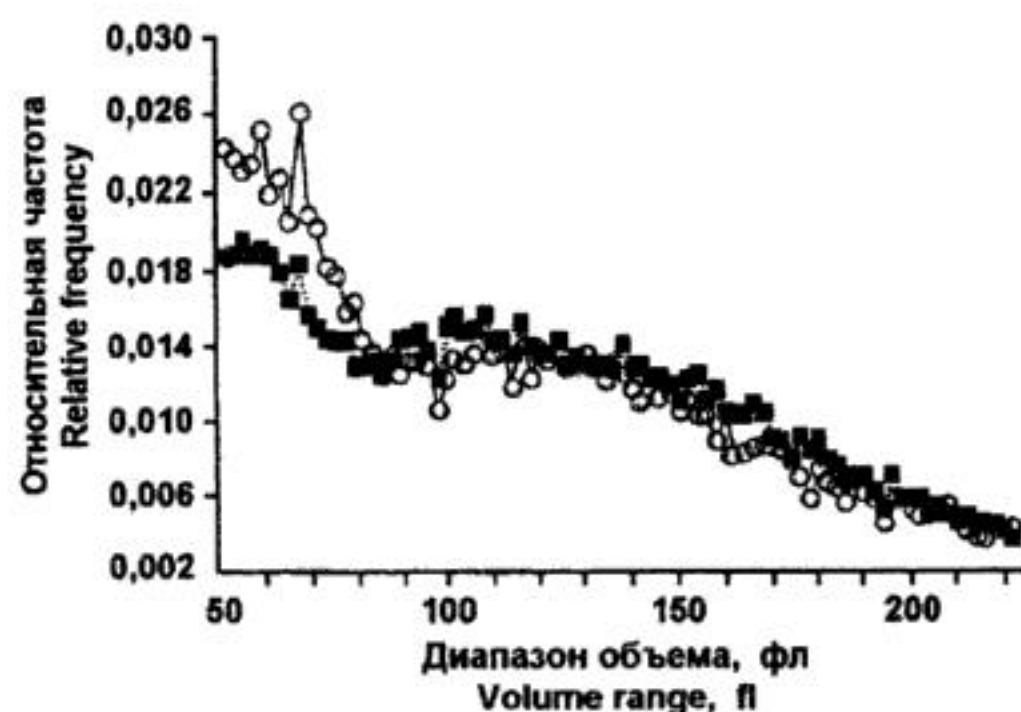


Рис. 4. Распределение клеток по объему, полученное на счетчике Коултера: ○ — 7–9, ■ — 10–12 недель развития. Приведены кривые, характерные для серии из 9–10 экспериментов.

Fig. 4. Cell distribution by volume, obtained by Coulter's counter: ○ — 7–9, ■ — 10–12 development weeks. The curves, typical for the series of 9–10 experiments, are presented.

симальное их количество в препаратах 7–9 недель гестации соответствует объему 130 фл, а в препаратах 10–12 недель — 170 фл. Существенных возрастных различий этот метод также не выявил.

Таким образом, основной пик распределений клеток по объему, полученных различными методами, лежит в диапазоне 100–200 фл, а гистограммы имеют заметную асимметрию в сторону малых объемов. Диапазону 100–200 фл, согласно морфометрическим измерениям, принадлежит 53% клеток образцов 7–9 недель и 70% клеток образцов 10–12 недель. По данным кондуктометрии этому диапазону соответствуют 51 и 56% клеток образцов 7–9 и 10–12 недель гестации.

Для выяснения роли процессов массопереноса в гибели клеток при замораживании после каждого цикла замораживания-отогрева по микрофотографиям определялась величина поверхностно-объемного отношения (ПОО) жизнеспособных клеток двух возрастных групп: 7–9 и 10–12 недель гестации. Из рис. 6 видно, что среднее ПОО клеток ЭПЧ 7–9 недель после программного криоконсервирования составляла 0,96, а 10–12 недель — 0,86. В ходе циклического замораживания-отогрева среднее ПОО увеличивалось в обеих исследованных возрастных группах, причем в группе 7–9 недель оно всегда было больше. Различия между ПОО двух возрастных групп были достоверными только до второго цикла. После четырех циклов эта величина составляла 1,3 у образцов 7–9 недель и 1,14 у образцов 10–12 недель.

Таким образом, клеточный состав ЭПЧ гетерогенен и зависит от сроков гестации. Согласно данным [3, 7], в период 7–12 недель развития преобладают гемопоэтические клетки, представленные в основном эритроидной линией (БОЕ-Э, КОЕ-Э, различные виды эритробластов). Эритробласты, имеющие высокий пролиферативный потенциал, являются основным звеном эритропоэза. Известно [3, 8], что эритропоэз в печени устанавливается лишь к 10–12-й неделе, а до этого времени число эритробластов невелико. Это подтверждается полученным нами объемным распределением: объем большинства клеток на гистограммах лежит в пре-

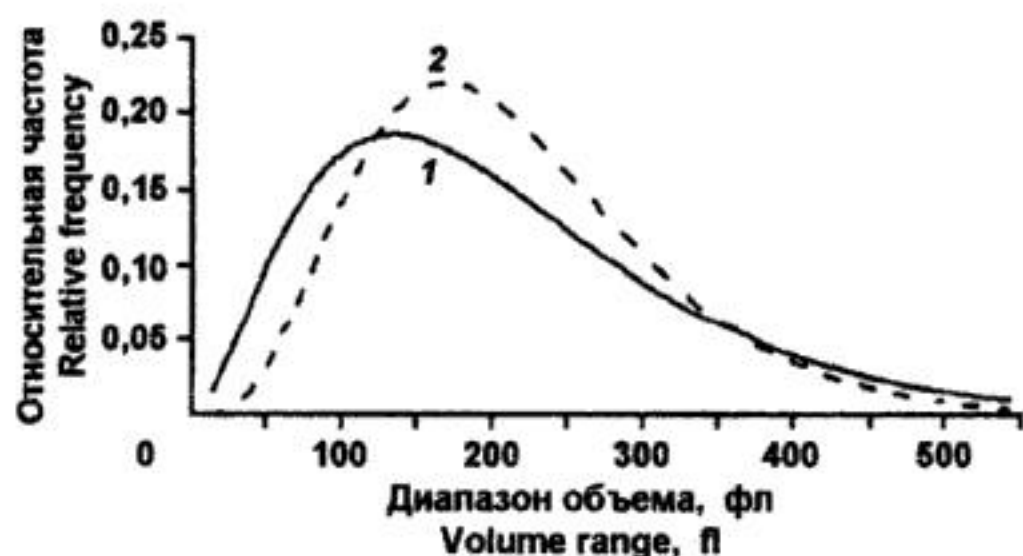


Рис. 5. Распределение клеток по объему, полученное с помощью микрофотографирования: 1 — 7–9, 2 — 10–12 недель развития.

Fig. 5. Cell distribution by volume, obtained by means of microphotographing: 1 — 7–9, 2 — 10–12 development weeks.

to the side of smaller volumes. According to morphometrical measurements, 53% of cells of 7–9 weeks samples and 70% of cells of 10–12 weeks samples belong to the range of 100–200 fl. By the conductometry data 51 and 56% of cells of samples of 7–9 and 10–12 gestations weeks correspond to this range.

In order to reveal the role of mass transfer processes in cell death during freezing the value of surface-volume ratio (SVR) of viable cells of two age groups of 7–9 and 10–12 gestation weeks was determined by microphotos after each freeze-thawing cycle. Fig. 6 shows, that the average SVR of HEL cells of 7–9 weeks after programmed cryopreservation made 0.96, and 10–12 weeks — 0.86. During cyclic freeze-thawing the average SVR increased in both studied age groups, moreover in the group of 7–9 weeks it was always higher. The differences between SVR of two age groups were statistically significant only till the second cycle. After 4 cycles this value made 1.3 in the samples of 7–9 weeks and 1.14 in those of 10–12 weeks.

Thus, HEL cell composition is heterogeneous and depends on gestation terms. According to the data [3, 7] within the period of 7–12 weeks of development, hemopoietic cells, mainly represented by erythroid line (BFU-E, CFU-E, different kinds of erythroblasts) predominate. The erythroblasts, with high proliferative potential are the main erythropoiesis link. It is of common knowledge [3, 8] that erythropoiesis in liver gets stable only to the 10th–12th week, and till this time the erythroblast number is not significant. This fact is confirmed by volume distribution, obtained by us: the volume of majority of cells in histograms is within the limits of 50–300 fl, meanwhile the erythroblast volume, according to the [1] exceeds 500 fl. Thus, the majority of embryonic liver cells, used in the work is related to earlier precursors — BFU-E and CFU-E.

It is obvious, that the cells of different type have diverse cryobiological parameters, and consequently,

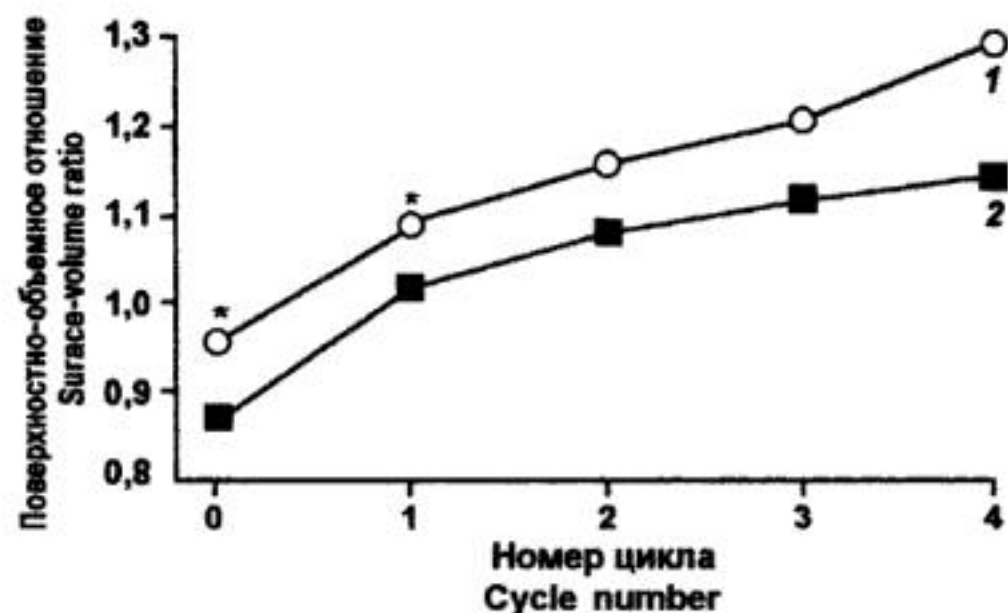


Рис. 6. Поверхностно-объемное отношение суспензии жизнеспособных клеток ЭПЧ 7–9 (1) и 10–12 (2) недель развития. * — различия по отношению к возрастной группе 10–12 недель достоверны ($p < 0,05$).

Fig. 6. surface-volume ratio of HEL viable cell suspension of 7–9 (1) and 10–12 (2) development weeks. * — differences in respect to the 10–12 weeks age group are statistically significant ($p < 0.05$).

делах 50–300 фл, в то время как объем эритроцитов, согласно [1], превышает 500 фл. Таким образом, большинство клеток эмбриональной печени, использованных в данной работе, относится к более ранним предшественникам — БОЕ-Э и КОЕ-Э.

Очевидно, что клетки различного типа имеют разные криобиологические параметры, значит, и разные оптимальные режимы криоконсервирования. Программное замораживание, позволяющее сохранить высокую жизнеспособность суспензии, не выявило различий в криочувствительности образцов различного срока гестации. Однако тот факт, что часть клеток повреждается, позволяет полагать, что используемый протокол не является оптимальным для каждого конкретного типа клеток. Циклическое замораживание-отогрев, следующее за программным криоконсервированием, использовалось в качестве дополнительного повреждающего фактора для выявления наиболее устойчивой популяции. Уже второй цикл позволил выявить достоверные различия между сравниваемыми группами: замораживание-отогрев оказалось менее разрушительным для образцов ранних (7–9 недель) сроков гестации. Последующие циклы усилили это различие. Можно сказать, что непрограммное циклическое замораживание-отогрев обладает более фокусированным действием на определенные популяции клеток ЭПЧ. Известно, что внутриклеточное кристаллообразование является основным фактором криоповреждения при быстром замораживании (около 270 °/мин), использованном в данной работе. Следовательно, вероятность кристаллообразования внутри более резистентных клеток при замораживании суспензии ниже. Эта величина зависит от нескольких клеточных параметров [2], одним из которых является ПОО. Чем больше ПОО клетки, тем более интенсивный массообмен с внешним раствором способна данная клетка производить. При замораживании, в частности, величина ПОО может влиять на скорость потока воды из клетки по осмотическому градиенту. С усилением этого потока уменьшается вероятность внутриклеточной кристаллизации.

Наши эксперименты показали, что средняя величина ПОО в клеточной суспензии возрастает после каждого цикла замораживания-отогрева, т.е. более криорезистентные клетки имеют большее ПОО. Это свидетельствует не только о важности процессов трансмембранного массопереноса при охлаждении, но и об интенсивности этих процессов в клетках ЭПЧ. Способность клетки дегидратироваться за короткое время позволяет говорить о высоких коэффициентах проницаемости клеточной мембраны для воды, что может быть обусловлено, например, наличием большого количества специфических водных переносчиков — аквапоринов [10].

Различия в объемных распределениях клеток 7–9 и 10–12 недель развития могут быть объяснены изменением как клеточного состава печени, так

various optimal cryopreservation regimens. The programmed freezing, allowing to preserve a high viability of suspensions, did not reveal the differences in sample cryoresistance of various gestation terms. However the fact, that a part of cells is damaged, allows to consider, that the used protocol is not an optimal one for each distinct cell type. Cyclic freeze-thawing, following programmed cryopreservation, was used as an additional damaging factor for revealing the most resistant population. Even the second cycle allowed to reveal statistically significant differences between the compared groups: a freeze-thawing occurred to be less destructive for the samples of early (7–9 weeks) gestation terms. The following cycles strengthened this difference. It should be mentioned, that a non-programmed cyclic freeze-thawing has more focused effect on certain HEL cell populations. It is known, that intracellular crystal formation is the main cryodamage factor at rapid freezing (about 270 °/min), used in the given work. Consequently, a probability of crystal formation inside of more resistant cells during the suspension freezing is lower. This value depends on some cellular parameters [2], one of those is SVR. The more cell SVR is, the more intensive mass exchange with an external solution the given cell is capable to produce. During freezing SVR value in particular can affect the rate of water flux out of cell on osmotic gradient. This flux strengthening, the probability of intracellular crystallization decreases.

Our experiments demonstrated, that the mean SVR value in cell suspension increased after each cycle of freeze-thawing, i. e. more cryoresistent cells had higher SVR. That testifies not only to the importance of processes of transmembrane mass transfer at cooling, but to the intensity of these processes in HEL cells. Cell capability for dehydration within a short time permits to speak about high coefficients of cell membrane permeability for water, that can be stipulated by the presence of a large number of specific aqueous carriers — aquaporines [10].

The differences in cell volume distributions of 7–9 and 10–12 development weeks can be explained by the change of both liver cellular composition and the certain cell division stage. The attempts to interpret the similar differences by cell growth are also known [9]. From our point of view, the growth (in term of volume increase) of proliferating cells is quite unequivocal and non-monotonous characteristic due to cell volume oscillation in a cycle. An increase in cell volume from cycle to cycle can be the sign of cell differentiation. A new cell of another type occurs to be a result of differentiation, i. e. we face the change in cell composition. Anyway the results of volumetric histograms demonstrate, that in the samples of 7–9 gestation weeks there is a greater amount of cells of small volume in comparison with the samples of 10–12 weeks.

In order to determine the cell volume and their SVR we used an ellipsoid approximation. The SVR of

и стадией деления конкретных клеток. Известны также попытки истолковать подобные различия ростом клеток [9]. С нашей точки зрения понятие рост (в смысле увеличения объема) пролиферирующих клеток — характеристика достаточно неоднозначная и немонотонная из-за колебания клеточного объема в цикле. Увеличение объема клетки от цикла к циклу может являться признаком клеточной дифференцировки. Результатом дифференцировки становится новая клетка уже другого типа, т.е. мы имеем дело с изменением клеточного состава. Как бы то ни было, результаты объемных гистограмм демонстрируют, что в образцах 7–9 недель гестации больше клеток малого объема по сравнению с образцами 10–12 недель.

Для определения объема клеток и их ПОО мы использовали эллиптическую аппроксимацию. ПОО эллипсоида вращения растет [5] с уменьшением его объема и удалением формы от сферической. Таким образом, предположение о вкладе в повышенную устойчивость образцов раннего возраста клеток малого объема вполне согласуется с существующими представлениями о механизмах криоповреждения клеток. В будущем возможно разделение общей суспензии на несколько популяций, учитывая их специфику, что может весьма упростить вид гистограмм.

Согласно полученным результатам, количество клеток ЭПЧ увеличивается с возрастом линейно. Можно предположить, что в суспензии клеток ЭПЧ исследуемого возраста присутствует доминирующая в количественном отношении популяция. Известно, что особенности митотического цикла отдельной клеточной популяции способны влиять на ее интегральные характеристики. К примеру, распределение клеток по объему будет иметь существенную асимметрию в сторону малых значений, если период G_1 клеточного цикла окажется сравним с продолжительностью всего цикла. Ясно, что свойства суспензии в целом будут при этом определяться свойствами клетки в G_1 фазе. С точки зрения существования G_0 [12], особой фазы клеточного цикла стволовых гемопоэтических клеток эти рассуждения кажутся достаточно весомыми. Клетки, находящиеся в G_0 фазе, продолжительное время имеют малый объем, а ниспадающий характер объемного распределения и высокая резистентность к замораживанию-отогреву непосредственно вытекают из наличия большого количества клеток малого объема.

Таким образом, установлено, что клетки ЭПЧ разного срока гестации обладают различной устойчивостью к действию физико-химических факторов низких температур. Клетки, выделенные из печени плодов ранних сроков (7–9 недель) гестации, обнаруживают большую устойчивость к циклическому замораживанию-отогреву по сравнению с более поздними (10–12 недель). Можно предположить, что это связано с повышенным содержанием

эллипсоид вращения увеличивается [5] с уменьшением его объема и удалением формы от сферической. Таким образом, предположение о вкладе в повышенную устойчивость образцов раннего возраста клеток малого объема вполне согласуется с существующими представлениями о механизмах криоповреждения клеток. В будущем возможно разделение общей суспензии на несколько популяций, учитывая их специфику, что может весьма упростить вид гистограмм.

Согласно полученным результатам, количество клеток ЭПЧ увеличивается с возрастом линейно. Можно предположить, что в суспензии клеток ЭПЧ исследуемого возраста присутствует доминирующая в количественном отношении популяция. Известно, что особенности митотического цикла отдельной клеточной популяции способны влиять на ее интегральные характеристики. К примеру, распределение клеток по объему будет иметь существенную асимметрию в сторону малых значений, если период G_1 клеточного цикла окажется сравним с продолжительностью всего цикла. Ясно, что свойства суспензии в целом будут при этом определяться свойствами клетки в G_1 фазе. С точки зрения существования G_0 [12], особой фазы клеточного цикла стволовых гемопоэтических клеток эти рассуждения кажутся достаточно весомыми. Клетки, находящиеся в G_0 фазе, продолжительное время имеют малый объем, а ниспадающий характер объемного распределения и высокая резистентность к замораживанию-отогреву непосредственно вытекают из наличия большого количества клеток малого объема.

Таким образом, установлено, что клетки ЭПЧ разного срока гестации обладают различной устойчивостью к действию физико-химических факторов низких температур. Клетки, выделенные из печени плодов ранних сроков (7–9 недель) гестации, обнаруживают большую устойчивость к циклическому замораживанию-отогреву по сравнению с более поздними (10–12 недель). Можно предположить, что это связано с повышенным содержанием

эллипсоид вращения увеличивается [5] с уменьшением его объема и удалением формы от сферической. Таким образом, предположение о вкладе в повышенную устойчивость образцов раннего возраста клеток малого объема вполне согласуется с существующими представлениями о механизмах криоповреждения клеток. В будущем возможно разделение общей суспензии на несколько популяций, учитывая их специфику, что может весьма упростить вид гистограмм.

REFERENCES

1. Bone marrow and blood atlas / Ed. by G. I. Kozinets. — M.: Triada-X, 1998. — 160 p.
2. Gordienko E. A., Pushkar N. S. Physical grounds of low temperature preservation of cellular suspensions. — Kiev: Naukova dumka, 1994. — 144 p.
3. Grischenko V. I., Lobyntseva G. S., Votyakova I. A., Shereshevskiy S. I. Hematopoietic cells of embryonic liver. — Kiev: Naukova dumka, 1988. — 192 p.

в суспензии определенной клеточной популяции, устойчивой к действию низких температур.

Повышенное поверхностно-объемное отношение, характерное для клеток ЭПЧ 7–9 недель гестации, может быть как причиной криорезистентности, так и признаком наиболее устойчивой клеточной популяции. Вопрос, какая именно клеточная популяция ЭПЧ обладает криорезистентностью, может быть решен с помощью фенотипического анализа. Решение этого вопроса явится основанием для разработки новых методологических подходов для криосепарации клеточных суспензий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас крови и костного мозга / Под ред. Г. И. Козинца. – М.: Триада-Х, 1998. – 160 с.
2. Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.
3. Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. – Киев: Наук. думка, 1988. – 192 с.
4. Грищенко В. И., Юрченко Г. Г. Влияние факторов низкотемпературного консервирования на репродуктивные эмбриональные и фетальные клетки // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 4. – С. 7–13.
5. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров. – М.: Наука, 1984. – 832 с.
6. Репин В. С., Сухих Г. Т. Медицинская клеточная биология. – М., 1998. – 200 с.
7. Anderson E. M., Jones D. R. E., Liu D. T. Y., Evans A. A. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage of human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. & Ther. – 1996. – 11. – P. 427–432.
8. Golfier F., Barcena A., Cruz J. et al. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34+/++ cells for transplantation // Bone Marrow Transplant. – 1999. – 24, № 5. – P. 451–461.
9. Hubel A., Norman J., Darr T.B. Cryobiophysical Characteristics of Genetically Modified Hematopoietic Progenitor Cells // Cryobiology. – 1999. – 38, № 1. – P. 140.
10. Kleinhans F. W. Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky as a Two-Parameter Formalism // Cryobiology. – 1998. – 37, № 4. – P. 271.
11. Mychaliska G. B., Muench M. O., Rice H. E. et al. The biology and ethics of banking fetal liver hematopoietic stem cells for in utero transplantation // J. Pediatr. Surg. – 1998. – 33, № 2. – P. 394–399.
12. Ogawa M. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells // Blood. – 1993. – 81, № 11. – P. 2844–2853.
4. Grischenko V. I., Yurchenko G. G. The effect of low temperature preservation factors on reproductive, embryonic and fetal cells // Problemy kriobiologii. – 1998. – № 4. – P. 7–13.
5. Korn G., Korn T. Reference book on mathematics for scientific workers and engineers. – M.: Nauka, 1984. – 832 p.
6. Repin V. S., Sukhikh G. T. Medical cellular biology. – M., 1998. – 200 p.
7. Anderson E. M., Jones D. R. E., Liu D. T. Y., Evans A. A. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage of human fetal HPC preparations // Fetal Diagn. & Ther. – 1996. – 11. – P. 427–432.
8. Golfier F., Barcena A., Cruz J. et al. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34+/++ cells for transplantation // Bone Marrow Transplant. – 1999. – 24, № 5. – P. 451–461.
9. Hubel A., Norman J., Darr T.B. Cryobiophysical Characteristics of Genetically Modified Hematopoietic Progenitor Cells // Cryobiology. – 1999. – 38, № 1. – P. 140.
10. Kleinhans F. W. Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky as a Two-Parameter Formalism // Cryobiology. – 1998. – 37, № 4. – P. 271.
11. Mychaliska G. B., Muench M. O., Rice H. E. et al. The biology and ethics of banking fetal liver hematopoietic stem cells for in utero transplantation // J. Pediatr. Surg. – 1998. – 33, № 2. – P. 394–399.
12. Ogawa M. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells // Blood. – 1993. – 81, № 11. – P. 2844–2853.

Accepted in 03.06.2000

Поступила 13.06.2000

Электронно-микроскопическое гистохимическое изучение аденилатциклазы в клетках щитовидной железы после замораживания

А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ, Л. Н. МАРЧЕНКО, Р. К. МИГУНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Electron Microscopic Histochemical Study of Adenylate Cyclase in Thyroid Gland Cells After Freezing

A. S. KAPRELYANTS, L. N. MARCHENKO, R. K. MIGUNOVA

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

Методом электронно-микроскопической гистохимии изучали локализацию аденилатциклазы в клетках щитовидной железы кроликов при замораживании и действии ДМСО. Показан характер распределения фермента в тироцитах и эндотелиальных клетках микрососудов при замораживании.

Методом електронно-мікроскопічної гістохімії вивчалась локалізація аденілатциклази в клітинах щитовидної залози кролів при заморожуванні і дії ДМСО. Показано характер розподілу ферменту в тироцитах і ендотеліальних клітинах мікросудин при заморожуванні.

Adenylate cyclase localization in rabbit thyroid gland cells under freezing and DMSO effect was studied by means of electron microscopic histochemistry. The character of enzyme redistribution in thyrocytes and endothelial cells of microvasculars under freezing has been shown.

С помощью свинцового гистохимического метода [4] исследовалась аденилатциклаза в клетках щитовидной железы кроликов обоего пола породы Шиншилла с массой тела 2–3 кг. Щитовидную железу быстро извлекали, измельчали на кусочки до 1 мм³, которые помещали в среду Хенкса. Были проведены 4 серии экспериментов: быстрое замораживание до –196 °С погружением образцов в жидкий азот в контейнерах из алюминиевой фольги; медленное замораживание со скоростью 1 °С/мин до –70 °С и далее погружением в жидкий азот до –196 °С; медленное замораживание с 10%-м ДМСО и контрольная серия. Время нахождения образцов в жидком азоте для первых 3-х серий 10 мин. Все образцы отогревали на воздухе. Для их фиксации использовали 1%-й глутаральдегид на 0,05 М какодилат-нитратном буфере (pH 7,4) с 4,5%-й декстрозой. Кусочки ткани промывали в течение 10–12 ч в буферном растворе и помещали в инкубационную среду на 30 мин при 30 °С. Для устранения неспецифических реакций и усиления активности аденилатциклазы контрольные гистохимические опыты проводили с помощью инкубации в средах без субстрата и с 0,0125 М фторида натрия. Объекты заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Полутонкие срезы ткани щитовидной железы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-6 и исследовали в оптическом микроскопе. Ультратонкие срезы ткани с гистохимической реакцией дополнительно не контрастировали и фотографировали в трансмиссионном электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Adenylate cyclase in thyroid gland cells of 2–3 kg chinchilla rabbits of both sexes was investigated by means of lead histochemical method [4]. Thyroid gland was rapidly removed, cut by 1 mm³ fragments up put into the Hanks' medium. Four series of the experiments have been carried-out: rapid freezing down to –196 °C by immersing samples into a liquid nitrogen in aluminium foil containers; slow freezing with the rate of 1 °C/min down to 70 °C and further immersion into a liquid nitrogen down to –196 °C; slow freezing with 10%-DMSO and the control series. The time of samples being in a liquid nitrogen for the first three series made 10 min. All samples were thawed in air. 1% glutaraldehyde with 0.05 M cacodylate-nitrate buffer (pH 7.4) with 4.5% dextrose was used for fixation. Tissue pieces were washed in a buffer solution during a night and put into incubation medium for 30 min at 30 °C. To remove non-specific reactions and accelerate adenylate cyclase activity the control histochemical experiments were conducted by means of incubation in the media with 0.0125 M sodium fluoride and in media without a substrate. Objects were put into the mixture of epon and araldit epoxy resins. Semi-thin sections of the thyroid gland tissue were done by means of UMTP-6 ultramicrotome and studied in light microscope. Ultra-thin tissue sections with histochemical reaction additionally were not contrasted and photographed in transmission electron microscope at 75 kV accelerating voltage.

Microscopic analysis of thyroid gland after a slow freezing testifies to the fact, that tissue architecture

Микроскопический анализ щитовидной железы после медленного замораживания свидетельствует о том, что архитектура ткани подвергается сильным изменениям: трещины в ткани, разрывы, нарушения структуры фолликулов, расслоения соединительно-тканых прослоек. Большое количество клеток имеет выраженные повреждения структуры. Трансмиссионная электронная микроскопия этих образцов показала, что цитоплазма тироцитов вакуолизирована, ядра имеют изрезанный контур или пикнотические изменения. Формы и размеры ядер изменены. Нарушена структура десмосом. Наблюдается набухание митохондрий и эндоплазматического ретикулума (рис. 1). В цитоплазме тироцитов обнаруживаются миелиноподобные структуры, связанные с изменениями митохондрий (рис. 2). Электронно-микроскопическая гистохимия аденилатциклазы в этих объектах свидетельствует о том, что локализация фермента связана с апикальной частью плазматических мембран тироцитов и люминальной плазматической мембраной эндотелиальных клеток микрососудов. Обнаружено неравномерное увеличение (фрагментарное распределение) отложения осадка гистохимической реакции, связанное с апикальной плазматической мембраной тироцита, в образцах, инкубированных в среде с добавлением фторида натрия (рис. 3). На апикальной поверхности мембраны отсутствуют микроворсинки и псевдоподии. На люминальной поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток микрососудов обнаруживается отложение продукта цитохимической реакции в виде электронно-оптически плотного слоя вдоль всей поверхности мембран.

После быстрого замораживания объектов микроскопический анализ свидетельствует о том, что структура ткани сохранена лучше, чем при медленном замораживании. Имеют место вакуолизация цитоплазмы отдельных тироцитов и небольшое набухание соединительно-тканых элементов. Встре-

was subjected to significant changes: cracks in the tissue, ruptures, impairments in a follicle structure, segregation of connective tissue interlayers. A significant number of cells have manifested structure damages. Transmission electron microscopy of these samples demonstrated, that thyrocytes cytoplasm was vacuolized, nuclei have jagged contour or pycnotic changes. Shapes and sizes of nuclei were changed. Desmosome structure was injured. The swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum is observed (Fig. 1). In thyrocyte cytoplasm myelin-like structures, related to mitochondria changes, were revealed (Fig. 2). Electron microscopic histochemistry of adenylyl cyclase in these objects testify, that enzyme localization is related to the apical part of thyrocyte plasmatic membranes and luminal plasmatic membrane of microvascular endothelial cells. Irregular augmentation (fragmentary distribution) of the sedimentation in histochemical reaction, connected to apical plasmatic membrane of thyrocyte, in the samples incubated in the medium adding sodium fluoride, is observed (Fig. 3). Microfibers and pseudopodii were absent in the membrane apical surface. Sedimentation of the product of cytochemical reaction like as electronically dense layer along the whole membrane surface was revealed on the luminal surface of plasmatic membrane of microvascular endothelial cells.

Microscopic analysis of the objects after a rapid freezing testifies to the fact, that tissue structure is better preserved, than at slow one. Cytoplasm vacuolization of the separate thyrocytes and a slight swelling of connective tissue elements are seen. Small cracks in the tissues, impairments of microvascular channel are seen. Transmission electron microscopy of these samples showed, that the majority of cells have nuclei with rounded shape and ordinary structure, in some thyrocytes mitochondria injuries and an increase of the ducts in endoplasmic net are observed. Nuclei of the separate cells are pycnotically changed. Thyrocyte

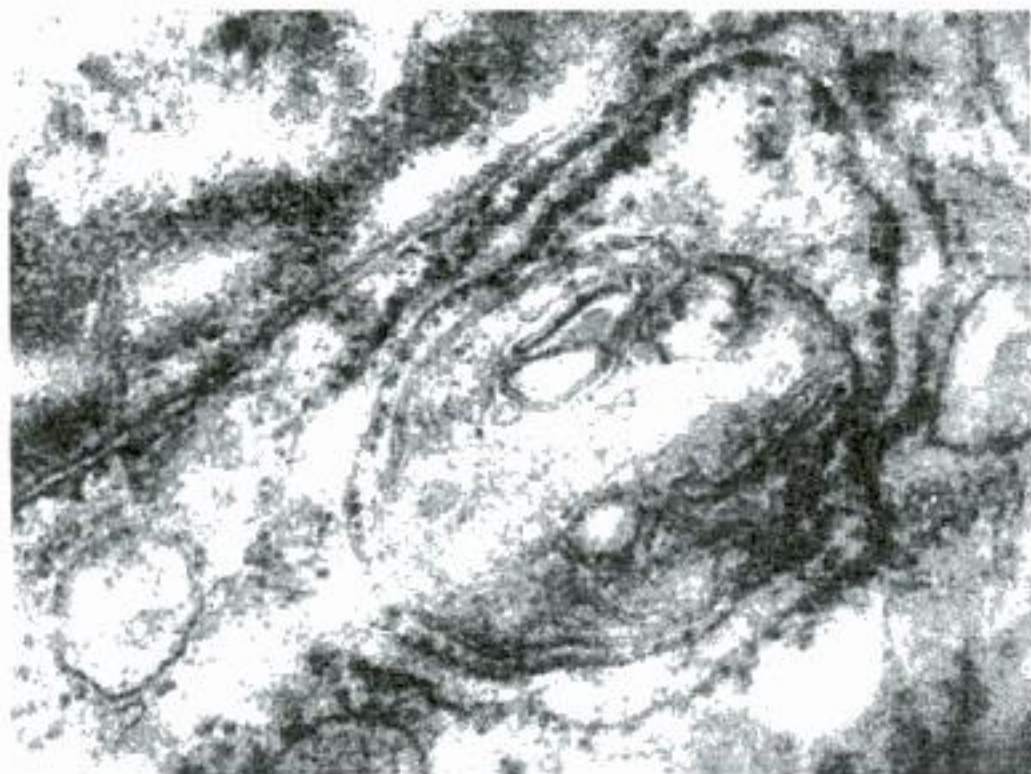


Рис. 1. Участок цитоплазмы и ядра тироцита после медленного охлаждения до -196°C ($\times 55\,000$).

Fig. 1. The region of cytoplasm and thyrocyte nucleus after a slow cooling down to -196°C ($\times 55\,000$).

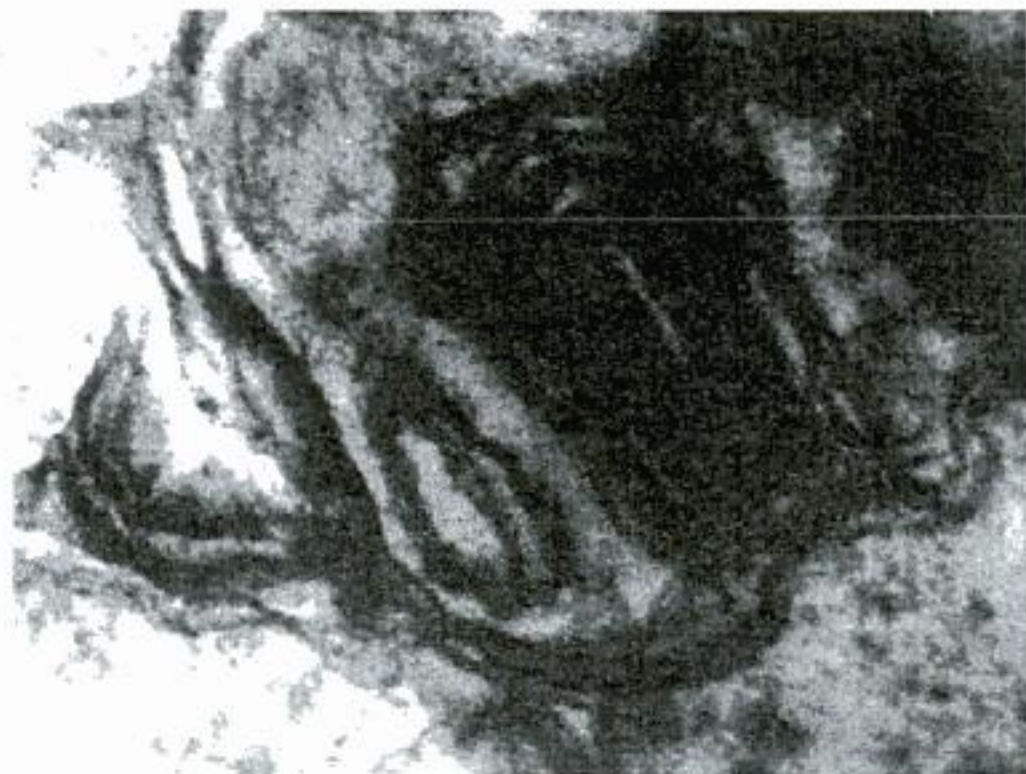


Рис. 2. Миелиноподобные структуры в цитоплазме тироцита после медленного охлаждения и отогрева ($\times 110\,000$).

Fig. 2. Myelin-like structures in thyrocyte cytoplasm after a slow cooling and warming ($\times 110\,000$).

чаются небольшие трещины в тканях, нарушения микрососудистого русла. Трансмиссионная электронная микроскопия этих образцов показала, что большинство клеток имеет ядра округлой формы и обычной структуры, в некоторых тироцитах наблюдаются повреждения митохондрий и увеличение канальцев эндоплазматической сети. Ядра отдельных клеток пикнотически изменены. Апикулярная поверхность тироцитов имеет характерные микроворсинки. Электронно-микроскопическая гистохимия аденилатциклазы в клетках щитовидной железы, замороженной в быстром режиме, свидетельствует о том, что локализация фермента связана с апикулярной частью плазматических мембран тироцитов и люминальной плазматической мембраной эндотелиальных клеток микрососудов. На апикулярной поверхности плазматической мембраны тироцитов наблюдаются отложения единичных гранул продукта цитохимической реакции, которые не образуют непрерывного слоя. Иногда продукт гистохимической реакции обнаруживается в местах контакта боковых поверхностей тироцитов. Электронно-оптически плотный продукт гистохимической реакции имеет вид округлых образований, расположенных в апикулярной части цитоплазмы тироцитов и связанных с канальцами эндоплазматического ретикула (рис. 4). На люминальной поверхности плазматической мембраны эндотелиальных клеток микрососудов замечено отложение продукта цитохимической реакции в виде электронно-оптически плотных отдельных скоплений вдоль поверхности мембраны и на микроворсинках.

Микроскопический анализ объектов после медленного замораживания с ДМСО свидетельствует о том, что ткань в целом сохраняет свою структуру.

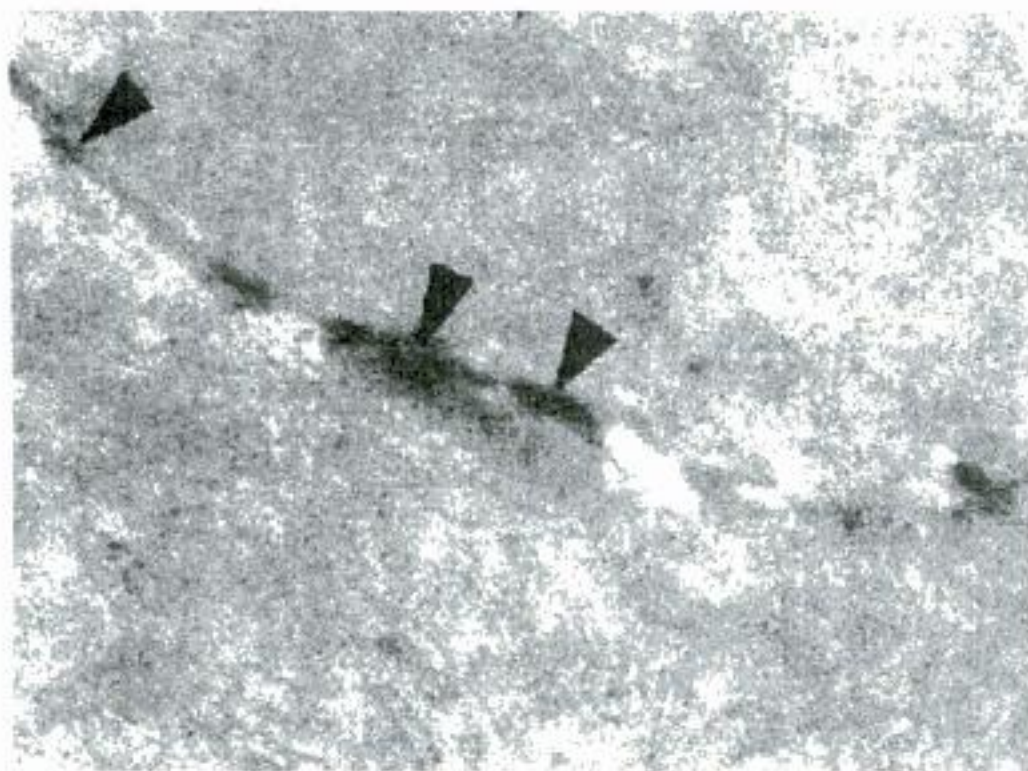


Рис. 3. Электронно-микроскопическая гистохимическая реакция на выявление аденилатциклазы. Апикулярный участок тироцита при медленном охлаждении с отложением плотного продукта гистохимической реакции (указан стрелками) ($\times 23\,000$).

Fig. 3. Electron-microscopic histochemical reaction on adenylate cyclase revealing. Thyrocyte apical region at a slow cooling with sedimentation of the dense product of histochemical reaction (shown by arrows) ($\times 23\,000$).

apical surface has typical microfibers. Electron and microscopic histochemistry of adenylate cyclase in the thyroid gland cells, frozen by means of a rapid regimen, testifies to the fact, that enzyme localization is related to apical part of thyrocyte plasmatic membranes and luminal plasmatic membrane of the microvascular endothelial cells. On the apical surface of thyrocyte plasmatic membrane sedimentations of single granules of cytochemical reaction products, which does not form unbrocken layer, are found. Sometimes the product of histochemical reaction is revealed in the places of the contact of thyrocyte lateral surfaces. Electronically dense product of histochemical reaction has the view of rounded formation, located in the apical part of thyrocyte cytoplasm and connected to the canaliculi of endoplasmic reticulum (Fig. 4). On the luminal surface of plasmatic membrane of microvascular endothelial cells sedimentation of the product of cytochemical reaction like as electronically dense separate accumulations along the membrane surface and on microfibers is noted.

Microscopic analysis of the objects after a slow freezing with DMSO testifies to the fact, that tissue in a whole preserves its structure. However sometimes one can reveal the cells with cytoplasm and nucleus impairments. Transmission electron microscopy of these samples demonstrated the presence of cells with similar to norm ultrastructure, and some changes in cytoplasm organoid structure in separate cells (Fig. 5). Widening of endoplasmic net canaliculi, mitochondria enlightening, cristas desorganisation are found. The changes in thyrocytes nuclear apparatus as nuclear pores widening are observed. The structure of an apical part of plasmatic membranes is preserved and has typical microfibers.



Рис. 4. Отложение продукта гистохимической реакции (стрелки) в апикулярном участке быстро замороженного до $-196\,^{\circ}\text{C}$ тироцита ($\times 12\,000$).

Fig. 4. Sedimentation of the product of histochemical reaction (arrows) in an apical region of the thyrocyte rapidly frozen down to $-196\,^{\circ}\text{C}$ ($\times 12\,000$).

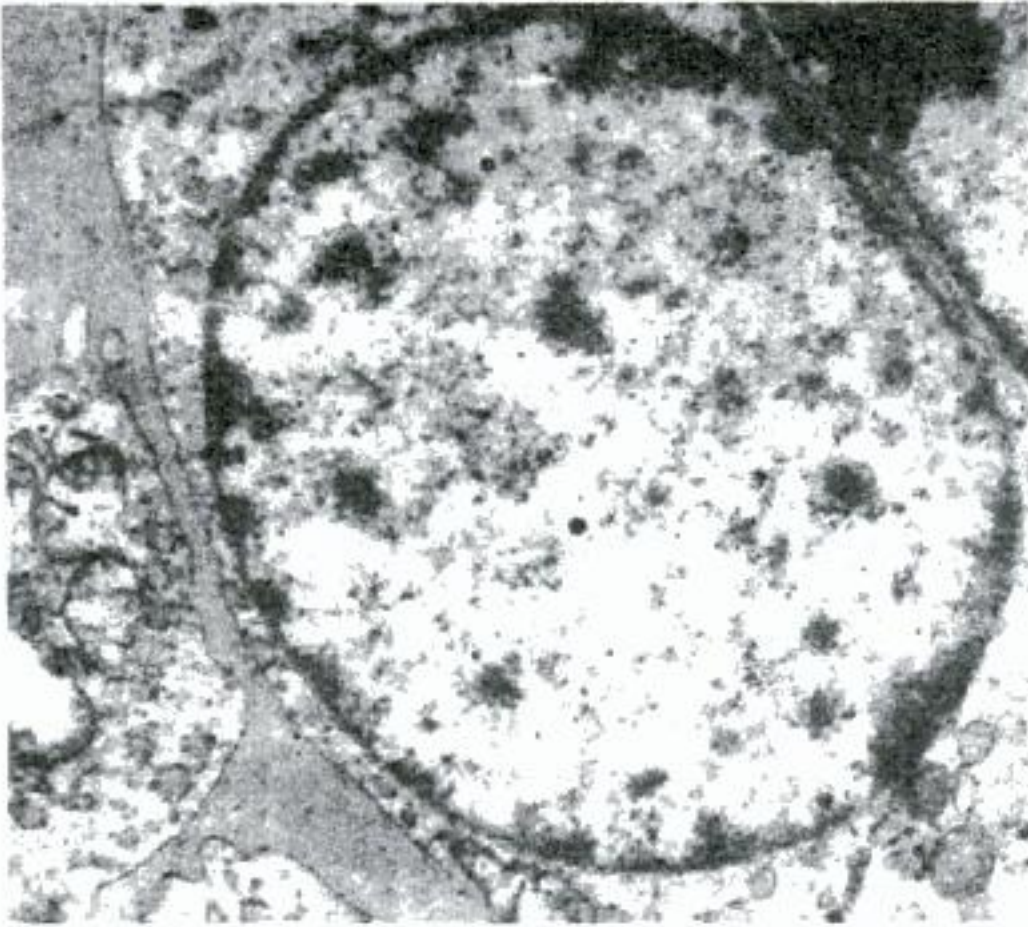


Рис. 5. Тироцит после медленного охлаждения до -196°C с 10%-м ДМСО ($\times 9\,000$).

Fig. 5. Thyrocyte after a slow cooling down to -196°C with 10% DMSO ($\times 9\,000$).

Однако иногда удается выявить клетки с повреждениями цитоплазмы и ядра. Трансмиссионная электронная микроскопия этих образцов показала наличие клеток с ультраструктурой, близкой к норме, и отдельное изменение структуры органоидов цитоплазмы отдельных клеток (рис. 5). Обнаруживаются расширение канальцев эндоплазматической сети, просветление митохондрий, дезорганизация крист. Отмечаются изменения ядерного аппарата тироцитов в виде расширения ядерных пор. Структура апикальной части плазматических мембран сохранена и имеет характерные микроворсинки.

Электронно-микроскопическая гистохимия аденилатциклазы в ткани щитовидной железы, замороженной с ДМСО, показала, что продукт гистохимической реакции имеет вид электронно-оптически плотных образований, локализованных на поверхности микроворсинок (рис. 6). Кроме этого, фермент обнаруживается в апикальной части цитоплазмы тироцита в виде электронно-оптически плотных включений (гранул) округлой формы (рис. 7). Отложение продукта гистохимической реакции наблюдается также на люминальной поверхности эндотелиальных клеток микрососудов, расположенных в соединительно-тканной части щитовидной железы.

Таким образом, замораживание ткани щитовидной железы до -196°C под защитой 10%-го ДМСО способствует сохранению мембранных комплексов органоидов клеток и аденилатциклазы, которая выявляется в плазматических мембранах тироцитов и эндотелиальных клетках микрососудов.

В целом изменения органоидов тироцитов при действии низких температур имеют однонаправ-

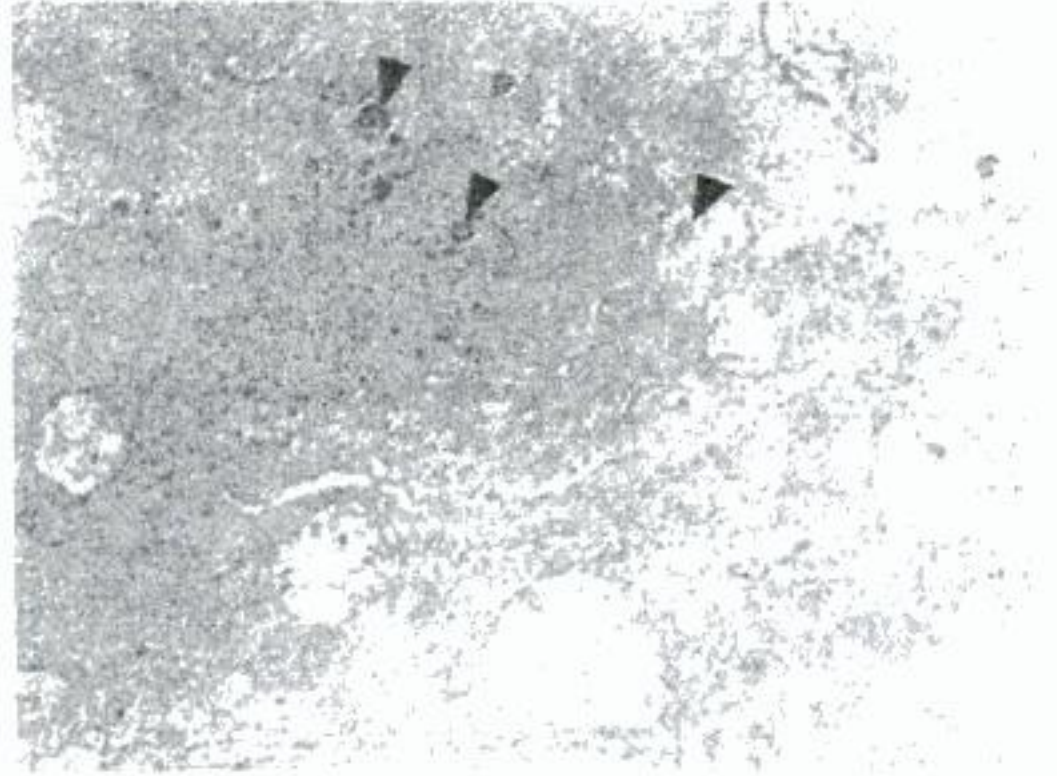


Рис. 6. Отложение продукта гистохимической реакции на выявление аденилатциклазы на поверхности микроворсинок тироцита (стрелки) в медленно замороженной щитовидной железе с ДМСО ($\times 26\,000$).

Fig. 6. Sedimentation of the product of histochemical reaction on adenylate cyclase revealing in the surface of thyrocyte microvascular (стрелки) in thyroid gland, slowly frozen with DMSO ($\times 26\,000$).

Electron microscope histochemistry of adenylate cyclase in thyroid gland tissue, frozen with DMSO, showed, that the product of histochemical reaction look like electronically dense formations, localized on the microfibers surface (Fig. 6). Besides, enzyme is revealed in an apical part of thyrocyte cytoplasm like as electronically and optically dense rounded inclusions (granules) (Fig. 7). Sedimentation of histochemical reaction product is also observed on a luminal surface of microvascular endothelial cells, located in connective tissue part of thyroid gland.

Thus, freezing of thyroid gland tissue down to -196°C under 10% DMSO protection promotes to the maintenance of membrane complexes of cell or-

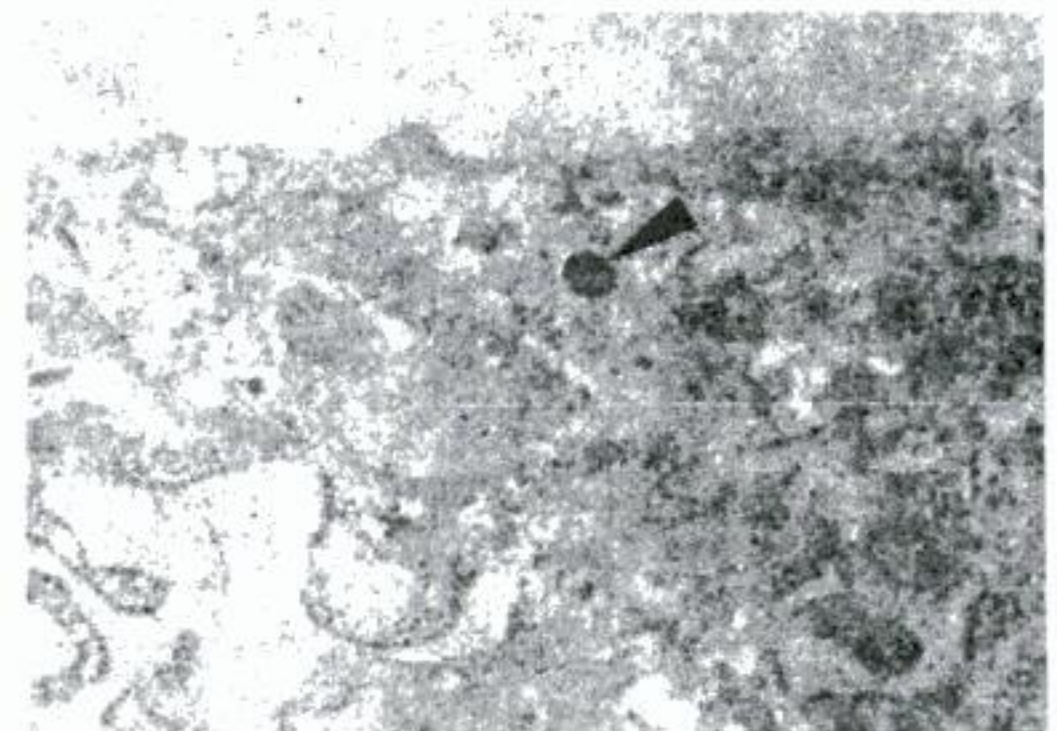


Рис. 7. Продукт гистохимической реакции в виде электронно-оптически плотного округлого образования (стрелка) в апикальной части цитоплазмы тироцита. Замораживание до -196°C с 10%-м ДМСО ($\times 31\,700$).

Fig. 7. The product of histochemical reaction like as electronically and optically dense rounded formation (arrow) in an apical part of thyrocyte cytoplasm. Freezing down to -196°C with 10% DMSO ($\times 31\,700$).

ленный характер и проявляются в основном в изменении объема гетерохроматина ядер и некотором уменьшении органоидов цитоплазмы, что может быть следствием дегидратационных процессов. Данное положение согласуется с полученными нами результатами [1–3]. Следует отметить, что межклеточные отношения в фолликулярном эпителии и тесный контакт коллоида с апикальной поверхностью тироцитов в основном сохраняются, что может указывать на роль коллоида в механизме криоустойчивости тироцита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я. Ультраструктура клеток при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1978. – 140 с.
2. Kaprelyants A. S., Migunova R. K. Electron Microscopy of Organoids of Rat Liver Cells after General and Local Cooling // *Cryobiology*. – 1995. – 32, № 6. – P. 542.
3. Kaprelyants A. S., Kaprelyants A. A., Reylan A. N., Migunova R. K. Morphometrical ultrastructural studies of the rat's hepatocytes under cooling // *Inter. Congr. "Microscopy & Microanalysis'97"*, USA, 10–14 Aug. 1997. – P. 245.
4. Reik J., Petzold G., Higgins J. Hormonesensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver // *Science*. – 1970. – 168. – P. 382–384.

Поступила 06.06.2000

ganoids and adenylyl cyclase, revealed in thyrocyte plasmatic membranes and microvascular endothelial cells.

In the whole, the changes in thyrocyte organoids under the effect of low temperatures have one-way orientated character and manifest mainly in the change of the volume of nuclei heterochromatin and some decrease of cytoplasm organoids, that may be the cause of dehydration processes. The given conception is confirmed by the obtained results [1–3]. It should be noted, that intercellular relations in follicular epithelium and close contact of a colloid with the thyrocyte apical surface mainly is kept, that may testify to colloid role in the mechanism of thyrocyte cryostability.

REFERENCES

1. Pushkar N. S., Kaprelyants A. S., Pankov E. Ya. Ultrastructure of the cells under low temperatures. – Kiev: Nauk. Dumka, 1978. – 140 p.
2. Kaprelyants A. S., Migunova R. K. Electron Microscopy of Organoids of Rat Liver Cells after General and Local Cooling // *Cryobiology*. – 1995. – 32, № 6. – P. 542.
3. Kaprelyants A. S., Kaprelyants A. A., Reylan A. N., Migunova R. K. Morphometrical ultrastructural studies of the rats' hepatocytes under cooling // *Inter. Congr. "Microscopy & Microanalysis'97"*, USA, 10–14 Aug 1997. – P. 245.
4. Reik J., Petzold G., Higgins J. Hormone sensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver // *Science*. – 1970. – 168. – P. 382–384.

Accepted in 06.06.2000

Влияние ингибиторов анионного транспорта и гипертонического воздействия на транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом

Е. Б. АЛМАЗОВА, В. В. РАМАЗАНОВ, В. А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Anion Transport Inhibitors and Hypertonic Effect on Proton Transport in Sulphate-Loaded Erythrocytes

E. B. ALMAZOVA, V. V. RAMAZANOV, V. A. BONDARENKO

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

Исследовали транспорт протонов в эритроцитах, нагруженных сульфатом, в средах, которые содержат изотонический и гипертонический растворы хлорида натрия. Установлено, что гипертоническое воздействие, как и воздействие ингибитором анионного транспорта, вызывает рост уровня поглощения протонов клетками. Полученные результаты позволяют предположить, что в эритроцитах, нагруженных сульфатом, осуществляется противотранспорт протонов, который сопровождает обмен внутриклеточного сульфата на внеклеточный хлорид.

Досліджували транспорт протонів в еритроцитах, навантажених сульфатом, в середовищах, які містять ізотонічний і гіпертонічний розчини хлориду натрію. Установлено, що гіпертонічна дія, як і дія інгібітором аніонного транспорту, викликає зростання рівня поглинання протонів клітинами. Отримані результати дозволяють передбачати, що в еритроцитах, навантажених сульфатом, здійснюється протитранспорт протонів, який супроводжує обмін внутріклітинного сульфату на позаклітинний хлорид.

Proton transport in sulphate-loaded erythrocytes, in the media containing isotonic and hypertonic sodium chloride solutions, was investigated. It has been established, that both hypertonic effect and those by anion transport inhibitor cause an increase in the level of proton absorption by cells. The results obtained allow to suppose, that in sulphate-loaded erythrocytes an anti-transport of protons, accompanying an exchange of intracellular sulphate for extracellular chloride, occurs.

Внесение эритроцитов в сульфатную среду вызывает двухфазное изменение *pH* суспензии клеток [6]. Фаза закисления может представлять собой транспорт хлорида и протона из клетки по каналному механизму [2], фаза защелачивания отражает вход сульфата с протоном в клетку в обмен на внутриклеточный хлорид [5]. Значительные гипертонические воздействия (или модификация эритроцитов геминном) приводят к ингибированию как анионного канала, так и анионного переносчика. При этом отмечается различная чувствительность двух типов транспорта к ингибиторам и температуре [1]. Согласно данным [3], анион-транспортная система эритроцитов обладает внутренней асимметрией, которая заключается в том, что сродство анионов к транспортному сайту внутри клетки выше, чем с внешней ее стороны.

Цель работы — исследовать транспорт хлорида и сульфата в ситуации, когда градиент хлорида был направлен в клетку, а сульфата — из клетки. Объектом исследования служила донорская кровь II группы. Кровь 4 раза отмывали раствором, содержащим 0,08 М Na_2SO_4 , 0,04 М K_2SO_4 , 0,01 М трис (*pH* 7,4). Затем эритроциты с 10%-м гематокритом нагружали сульфатом в указанном растворе 3-разовой инкубацией по 15 мин (37 °C) [7]. После инкубации клетки осаждали 3 мин при 3 000 об/мин. Последний раз осадок отмывали в

Introduction of erythrocytes into sulphate medium causes a two-phase change in a cell suspension *pH* [6]. Acidation phase may represent the transport of chloride and proton from a cell through channel mechanism [2], the alkalization phase reflects the entrance of sulphate with proton into a cell in exchange for an intracellular chloride [5]. Considerable hypertonic effects (or erythrocyte modification by hemin) result in the inhibition of both anion channel and anion carrier. Thereat different sensitivity of two types of transport to the inhibitors and temperature [1] is observed. According to the data [3] the erythrocyte anion transport system possesses an internal asymmetry, consisting in higher affinity of anions to a transport site inside of a cell in comparison with outside.

The aim of the work was to investigate a chloride and sulphate transport in the situation when chloride gradient was directed into a cell, and sulphate — out of a cell. A donor's blood of II_{nd} group served as the investigation object. The blood was 4 times washed out using the medium, containing 0.08 M of Na_2SO_4 , 0.04 M of K_2SO_4 , 0.01 M of TRIS (*pH* 7.4). Then the erythrocytes with a 10% hematocrit were sulphate-loaded in the mentioned solution by means of a 3 times incubation by 15 min (37 °C) [7]. After incubation the cells were precipitated within 3 min at 3 000 rot/min. Last time the sediment was washed-

течение 5 мин раствором, содержащим 0,12 М Na_2SO_4 .

Транспорт анионов в эритроцитах исследовали методом *pH*-метрии в термостатируемой ячейке. В ячейку помещали по 2 мл 0,15 М NaCl (изотонический вариант) или 0,4 М NaCl (гипертонический вариант), доводили *pH* раствором NaOH до внутриклеточного *pH* (7,0–7,2), после чего в ячейку вносили по 50 мкл эритроцитов и с помощью самописца проводили измерения анионного транспорта по изменению *pH*.

Для блокирования анионного транспорта использовали его ингибиторы: ДИДС (4,4'-диизоцианостильбен-2,2'-дисульфат) — ингибитор необратимого действия — и дипиридамола — ингибитор обратимого действия, который по своей природе является блокатором каналов доступа анионов к транспортному сайту. Концентрация ДИДС 2 мкМ, дипиридамола 100 мкМ. Перед внесением эритроцитов в ячейку добавляли ингибиторы. Эксперименты проведены на эритроцитах, взятых от 6–8 доноров. Средняя ошибка находилась в интервале 10–20%. Данные, полученные в результате экспериментов, показали, что комбинация эритроцитов, нагруженных сульфатом, с раствором, содержащим 0,15 М NaCl, вызывает защелачивание суспензии эритроцитов. Присутствие в этой среде ДИДС в концентрации 2 мкМ приводит к возрастанию как скорости, так и уровня защелачивания, *pH* 7,8 (рис. 1, кривая 3). Если среда инкубации содержала 0,4 М NaCl, то уровень защелачивания достигает *pH* 7,7. При комбинации указанной гипертонической среды с 2 мкМ ДИДС происходит дополнительное возрастание как скорости, так и уровня защелачивания (рис. 1, кривая 4).

Использование дипиридамола выявило, что присутствие в среде 0,15 М NaCl указанного блокатора в концентрации 100 мкМ вызывает такой же уровень защелачивания (рис. 2, кривая 1), как и в концентрации 2 мкМ ДИДС. Если среда инкубации содержала 0,4 М NaCl, то присутствие дипиридамола приводило к снижению как скорости, так и уровня защелачивания (рис. 2, кривая 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что внесение в хлоридную изотоническую среду эритроцитов, нагруженных сульфатом, вызывает перераспределение анионов сульфата из клетки, а анионов хлорида в клетку. Этот вывод является следствием того, что присутствие ингибиторов анионного транспорта ДИДС (рис. 1) и дипиридамола (рис. 2) приводит к активации входа протонов в клетку. Итак, данные блокаторы вызывают в среде ингибирование транспорта протонов из клетки, тогда как транспорт протонов в клетку имеет более выраженный характер. Отсюда следует, что транспорт протонов с хлоридом в клетку нечувствителен к использованным концентрациям ингибиторов, тогда как транспорт сульфата с протоном из клетки выявляет чувствительность к ним.

out within 5 min with the solution, containing 0.12 M of Na_2SO_4 .

Anion transport in erythrocytes was studied by means of the *pH*-metry method in a thermostated cell. 2 ml of NaCl 0.15 M NaCl (isotonic variant) or 0.4 M of NaCl (hypertonic variant) were placed into a cell, *pH* was added by NaOH solution for an intracellular *pH* (7.0–7.2), after that by 50 μl of erythrocytes were introduced into a cell and the measurements of anion transport according to the *pH* change were carried out using a recorder.

In order to block an anion transport we used its inhibitors: DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate) — inhibitor of an irreversible action — and a dipyridamole — inhibitor of reversible one, which by its nature is a blocker of the channels of anion access to a transport site. DIDS concentration was 2 μM , dipyridamole — 100 μM . The inhibitors were added into a cell before introduction of erythrocytes. The experiments were performed in erythrocytes, taken from 6–8 donors. An average error was within the range of 10–20%. The data, obtained as a result of experiments demonstrated that the combination of sulphate-loaded erythrocytes, with the solution, contained 0.15 M of NaCl, caused an alkalization of erythrocyte suspension. DIDS presence in this medium in 2 μM concentration results in an increase of both alkalization rate and level, *pH* 7.8 (Fig. 1, curve 3). If the incubation medium contained 0.4 M of NaCl, the level of alkalization would reach the value of *pH* 7.7. During the combination of the mentioned hypertonic medium with 2 μM of DIDS an additional augmentation both of the rate and level of alkalization occurs (Fig. 1, curve 4).

The usage of dipyridamole revealed, that in the presence in the medium of NaCl 0.15 M of the mentioned blocker in 100 μM concentration caused the same alkalization level (Fig. 2, curve 1), as under 2 μM concentration of DIDS (Fig. 1, curve 3). If the incubation medium contained 0.4 M of NaCl, dipyridamole presence resulted in a decrease both of the rate and level of alkalization (Fig. 2, curve 2).

The results obtained testify to the fact, that the introduction of sulphate-loaded erythrocytes into an chloride isotonic medium results in a redistribution of sulphate anions from a cell and chloride anions into a cell. This conclusion results from the fact, that the presence of anion transport inhibitors DIDS (Fig. 1) and dipyridamole (Fig. 2) leads to the activation of proton entrance into a cell. Thus, the given blockers provoke in the medium the inhibition of proton transport out of cell, meanwhile the proton transport into a cell has a more manifested character. From this fact proceeds the following: the proton transport with chloride into a cell is not sensitive to the used inhibitor concentrations, meanwhile the transport of sulphate with proton out of a cell reveals its sensitivity to them.

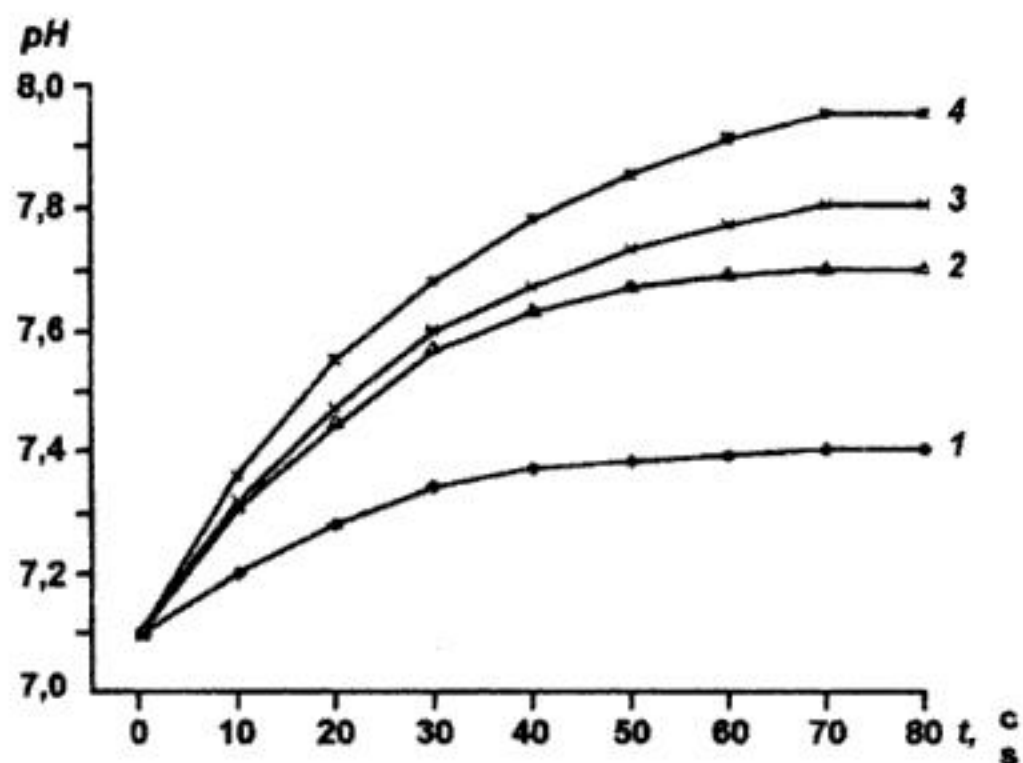


Рис. 1. Влияние гипертонического воздействия и ДИДС на динамику защелачивания суспензии эритроцитов, нагруженных сульфатом, в среде, содержащей NaCl: 0,15 М (1, 3); 0,4 М (2, 4); в присутствии 2 мкМ ДИДС (3, 4).

Fig. 1. Influence of DIDS and hypertonic effect on the dynamics of suspension alkalization of sulphate-loaded erythrocytes in the medium, containing NaCl: 0.15 M (1, 3); 0.4 M (2, 4); in the presence of 2 μ M of DIDS.

Известно, что в интактных эритроцитах, помещенных в сульфатную среду, происходят транспорт хлорида с протоном из клетки и обмен хлорида на внеклеточный сульфат и протон. При этом обменный тип транспорта более чувствителен к ингибиторам анионного транспорта, к снижению температуры и гипертоническому воздействию. Учитывая данные результаты, предположили, что выход хлорида с протоном совершается по канальному механизму транспорта [2]. Вход хлорида с протоном в эритроциты, нагруженные сульфатом, вероятно, также происходит по канальному механизму, тогда как выход сульфата с протоном — по обменному механизму в обмен на внеклеточный хлорид.

Следует отметить значительную разницу в концентрациях ингибиторов, необходимых для одной и той же степени активации входа протонов: 2 мкМ ДИДС (рис. 1), 100 мкМ дипиридамола (рис. 2). Такая разница является следствием того, что ДИДС при ингибировании связывается с анионным сайтом, а дипиридамол блокирует анионный канал [4]. Гипертоническое воздействие в присутствии ДИДС вызывает дополнительную активацию транспорта протонов в клетку (рис. 1, кривая 4), дипиридамола — блокирование транспорта протонов (рис. 2, кривая 2). Это может быть связано с тем, что гипертоническое воздействие приводит к блокированию анион-транспортной системы, что и проявляется в большем ингибировании обмена сульфата на внеклеточный хлорид и протон. Данный результат можно наблюдать при воздействии ДИДС (рис. 1, кривая 4). При действии дипиридамола в гипертонической среде выявляется блокирование канального входа хлорида с протоном (рис. 2, кривая 2). Это свидетельствует о том, что гипертоническое воздействие модифици-

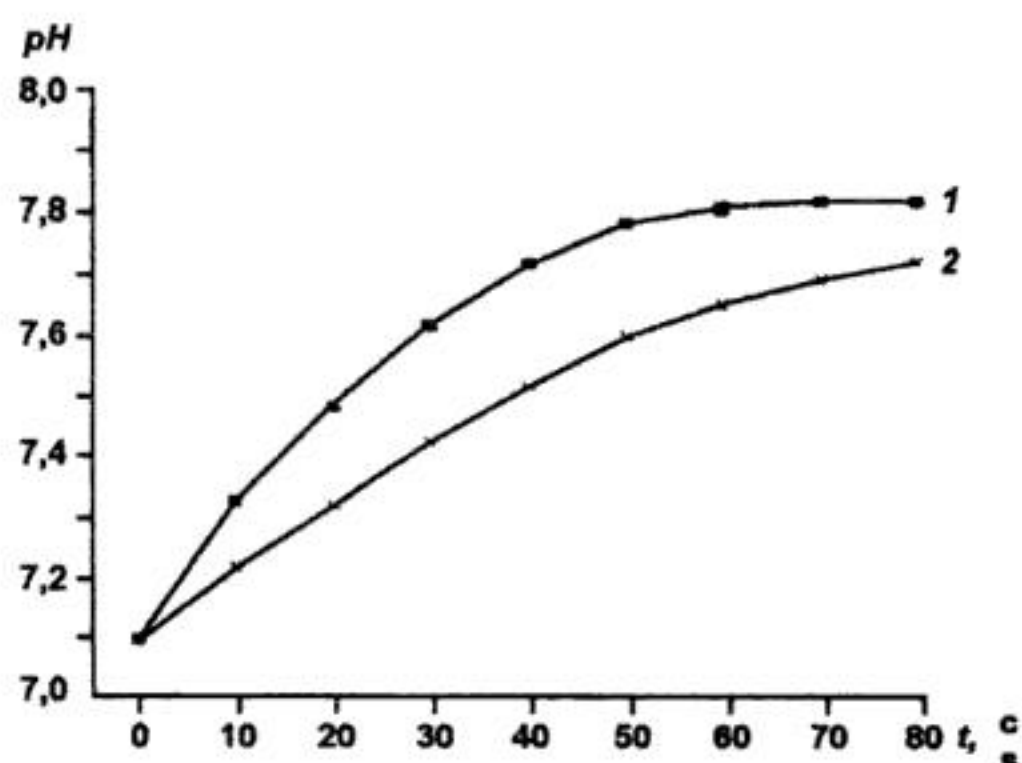


Рис. 2. Влияние дипиридамола в концентрации 100 мкМ на динамику защелачивания суспензии сульфат-нагруженных эритроцитов в среде, содержащей NaCl: 1 — 0,15 М; 2 — 0,4 М.

Fig. 2. Dipyridamole effect in 100 μ M concentration on the dynamics of suspension alkalization of sulphate-loaded erythrocytes in the medium, containing NaCl: 1 — 0.15 M; 2 — 0.4 M.

It is of common knowledge, that in intact erythrocytes, placed in sulphate medium, the transport of chloride with proton out of a cell and the exchange of chloride for extracellular sulphate and proton occur. Thereat an exchangeable type of transport is more sensitive to the anion transport inhibitors, to a decrease in temperature and hypertonic effect. Taking into account the given results we supposed that the release of chloride with proton was realized according to a channel mechanism of transport [2], the entrance of chloride with proton into sulphate-loaded erythrocytes occurred by a channel mechanism, while the release of sulphate with proton realized by an exchange mechanism in exchange for an extracellular chloride.

We should note a significant difference in inhibitor concentrations, that are necessary for the same activation degree of proton entrance: 2 μ M of DIDS (Fig. 1), 100 μ M of dipyrindamole (Fig. 2). Such difference results from the fact, that DIDS during the inhibition is bound with an anion site, and dipyrindamole blocks an anion channel [4]. Combination of hypertonic effect with DIDS causes an additional activation of proton transport into a cell (Fig. 1, curve 4), with dipyrindamole — the blockage of proton transport (Fig. 2, curve 2). That can be related to the fact, that a hypertonic effect results to the blockage of anion-transport system, that manifests in a greater inhibition of sulphate exchange for an extracellular chloride and proton. The given result can be observed under DIDS effect (Fig. 1, curve 4). During dipyrindamole effect in hypertonic medium a blockage of a channel entrance of chloride with proton is revealed (Fig. 2, curve 2). That may testify to the fact, that a hypertonic effect modifies anion channel, in such a way, that dipyrindamole presence causes the channel blockage, that was not found at DIDS presence. That correlates to the fact, that DIDS is a blocker of anion-

рует анионный канал так, что присутствие дипиридамола вызывает его блокирование, в отличие от ДИДС. Это согласуется с тем, что ДИДС является блокатором анион-транспортного сайта, а дипиридамола — анионного канала [4].

Ранее было установлено, что модификация цитоскелета эритроцитов гемин, а также значительное гипертоническое воздействие приводят к блокированию как анионного канала, так и анионного переносчика [1]. В этом случае градиент концентрации хлорида был направлен из клетки, а сульфата — в клетку, поэтому транспорт хлорида по каналу и по переносчику происходил из клетки и был нечувствителен к незначительным гипертоническим воздействиям. В наших экспериментальных условиях градиент концентрации хлорида направлен в клетку и обмен внутриклеточного сульфата на внеклеточный хлорид чувствителен к незначительным гипертоническим воздействиям (рис. 1, кривые 1, 2).

Из полученных данных можно сделать вывод, что ингибиторы анионного транспорта, ДИДС и дипиридамола, а также гипертоническое воздействие вызывают активацию транспорта протонов в клетку за счет блокирования обмена внутриклеточного сульфата с протоном на внеклеточный хлорид. При этом гипертоническое воздействие параллельно с блокированием анионного переносчика модифицирует анионный канал таким образом, что транспорт хлорида и протона в клетку становится чувствительным к дипиридамолу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лупилова Н. А. Вплив інгібіторів аніонного транспорту і модифікаторів цитоскелета на бар'єрні характеристики еритроцитів в умовах осмотичного стресу: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.— Харків, 1999.— 16 с.
2. Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Тодрин А. Ф., Бондаренко Т. П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии.— 1999.— № 4.— С. 34–41.
3. Cabantchik Z. J., Knauf P. A., Roshtein A. The anion transport system of the red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1978.— 515.— P. 239–302.
4. Falke J. J., Chan S. I. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors // *Biochemistry.*— 1986.— 25.— P. 1888–1898.
5. Jennings M. L., Al-Rhaiyel S. Modification of carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // *J. Gen. Physiol.*— 1988.— № 92.— P. 161–178.
6. *Red cell membranes — a methodological approach* / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.— London: Acad. Press, 1982.— 369 p.
7. Schnell K. F. Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores // *J. Membrane Biol.*— 1977.— 37.— P. 39–136.

Поступила 10.05.2000

transport site, and dipyridamole — an anion channel blocker [4].

It has been established earlier, that erythrocyte cytoskeleton modification by hemin, as well as a considerable hypertonic effect result in a blockage of both anion channel and anion carrier [1]. In this case the gradient of chloride concentration was directed out of a cell, and a sulphate one — into a cell, therefore chloride transport through a channel and a carrier occurred from a cell and it was not sensitive to insignificant hypertonic effects. Under our experimental conditions the gradient of chloride concentration is a cell-directed. In this case the exchange of intracellular sulphate for intracellular chloride is sensitive to slight hypertonic effects (Fig. 1, curves 1, 2).

From obtained experimental data we can conclude, that DIDS anion transport inhibitors and dipyridamole, as well as hypertonic effect cause the proton transport activation into a cell due to the exchange blockage of intracellular sulphate with proton for intracellular chloride. In this case a hypertonic effect in a parallel way with anion carrier blockage modifies an anion channel by such a way, that chloride and proton transport into a cell becomes sensitive to dipyridamole.

REFERENCES

1. Lupilova N. A. Effect of anion transport inhibitors and cytoskeletal modifiers on erythrocyte barrier characteristics under osmotic stress conditions: Author's abstract of thesis for the PhD (biology) obtaining.— Kharkov, 1999.— 16 p.
2. Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Todrin A. F., Bondarenko T. P. Osmotic modification of proton transport in erythrocytes in sulphate medium // *Problemy kriobiologii.*— 1999.— № 4.— P. 34–41.
3. Cabantchik Z. J., Knauf P. A., Roshtein A. The anion transport system of the red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1978.— 515.— P. 239–302.
4. Falke J. J., Chan S. I. Molecular mechanisms of band 3 inhibitors // *Biochemistry.*— 1986.— 25.— P. 1888–1898.
5. Jennings M. L., Al-Rhaiyel S. Modification of carboxyl group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // *J. Gen. Physiol.*— 1988.— № 92.— P. 161–178.
6. *Red cell membranes — a methodological approach* / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.— London: Acad. Press, 1982.— 369 p.
7. Schnell K. F. Anion transport across the red blood cell membrane mediated by dielectric pores // *J. Membrane Biol.*— 1977.— 37.— P. 39–136.

Accepted in 10.05.2000

Иммунологические свойства криоконсервированных кожных трансплантатов

А. А. ЦУЦАЕВА, Н. П. ЛОБАСЕНКО, К. К. КАЛМЫКОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Immunobiological Properties of Cryopreserved Skin Transplants

A. A. TSUTSAYEVA, N. P. LOBASENKO, K. K. KALMYKOV

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

Показано, что в результате криоконсервирования кожных лоскутов снижается их иммуногенность, о чем свидетельствуют степень выраженности и характер клеточных реакций, время приживления криоконсервированных трансплантатов в организме реципиентов после их трансплантации.

Показано, що в результаті криоконсервування шкірних кусків зменшується їх імуногенність, про що свідчать ступінь вираження і характер клітинних реакцій, час приживлення криоконсервованих трансплантатів в організмі реципієнта після їх трансплантації.

It has been shown, that in the result of skin grafts cryopreservation their immunogeneity decreases, manifestation degree and the character of cell responses, the time of retention of cryopreserved transplants in a recipient's organism after their transplantation testify to this fact.

Активность реакций трансплантационного иммунитета зависит в большей степени от иммуногенности трансплантатов, которая определяется HLA-DR антигенной совместимостью, наличием в трансплантате белковых фракций, образующихся при разрушении клеток в межклеточной жидкости, присутствием в трансплантате клеток крови, особенно лимфоцитов, на мембранах которых представлен весь спектр антигенов гистосовместимости.

Было показано [1, 3, 5], что криоконсервирование влияет на физико-химические свойства мембран клеток, в частности, происходят кластеризация белков, погружение белков внутрь мембран, конформация макромолекул белка, в результате чего временно изменяется антигенный спектр мембран, в тканях разрушаются элементы крови, что может быть причиной иммуногенности трансплантатов. Цель данного исследования — изучение свойств криоконсервированных трансплантатов кожи.

Объектом исследования были кожные трансплантаты мышей линии Balb/c и CBA в возрасте 2–4 мес. Способ консервирования кожи разработан в ИПКиК НАНУ. Перед началом эксперимента животных подвергали анестезии. Для обеспечения полноценного насыщения ткани лоскута криопротектором ПЭО-400 и сокращения времени пребывания лоскута вне организма до замораживания участок кожи после анестезии инфильтрировали внутрикожно 15%-м раствором ПЭО-400 на буфер-

The activity of transplantational immunity responses depends in a greater extent on transplant immunogeneity, that is determined by HLA-DR antigenic compatibility, the presence of protein fractions in a transplant, formed during cell and intercellular liquid damage, by the presence of blood cells in a transplant, especially lymphocytes, in the membranes of those the whole spectrum of histocompatibility antigens is presented.

It has been shown [1, 3, 5], that cryopreservation affects physical and chemical properties of cell membranes, especially protein clusterization, protein immersion inside membranes, conformation of protein macromolecules occur, in the result of those membrane antigen spectrum temporarily changes, blood elements in tissues are damaged, that may be the cause of transplant immunogeneity. The aim of given work was to study the properties of cryopreserved skin transplants.

Skin transplants of 2–4 months Balb and CBA mice were the objects under study. The way for skin cryopreservation has been elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Before the experiment beginning the animals were anesthetized. To provide valuable saturation of graft tissue by PEO-400 cryoprotectant and reduction of graft being out of the organism before freezing, skin site after anesthesia was intracutaneously infiltrated with 15% PEO-400 solution on the Hanks buffer saline solution.

ном солевом растворе Хэнкса. Шерсть на участке кожи донора удаляли за три дня до эксперимента механическим способом. Криопротектор ПЭО-400 обладает смешанным типом действия, частично проникает внутрь клеток, имеет слабую токсичность и не требует своего удаления перед введением в организм.

Обработанный таким образом участок кожи донора через 4 ч отделяли от окружающих тканей, очищали от подкожной клетчатки и в герметичных пакетах из фторопласта, содержащих 0,3–0,5 мл раствора криопротектора, погружали в жидкий азот для замораживания и хранения. Скорость охлаждения образцов кожных лоскутов была близкой к 400 °C/мин. Образцы отогревали быстрым погружением пакетов в водяную баню с температурой 41 °C.

Основным показателем эффективности способов криоконсервирования служит жизнеспособность тканей. Были использованы два критерия оценки жизнеспособности консервированной кожи: приживание кожи *in vivo* у сингенных реципиентов и способность клеток консервированных тканей к пролиферации *in vitro*.

Для определения жизнеспособности кожи *in vivo* криоконсервированные лоскуты кожи мышей СВА пересаживали сингенным реципиентам ортотопически по методу [2]. Свидетельством их жизнеспособности было полное приживание криоконсервированных трансплантатов у сингенных реципиентов, однако при этом отмечалась очаговая депигментация отросшей шерсти в течение всего срока наблюдения. Это, по-видимому, связано с необратимыми нарушениями пигментообразующей функции части клеток кожи после криоконсервирования.

За состоянием трансплантатов наблюдали с момента снятия повязок, обычно спустя 4–5 сут после пересадки. Состояние трансплантата оценивали визуально. Первично прижившимися считали трансплантаты, которые в течение 3–5 сут были бледно-розового цвета, теплыми, эластичными, плотно прилежали к тканям реципиента. Впоследствии на трансплантатах вырастал волосной покров в обратном направлении. Началом отторжения аллогенных трансплантатов принимали момент появления геморрагий, либо цианоза и отека трансплантата. Днем отторжения считали тот, на который трансплантат имел вид корки, плотной на ощупь.

Для определения жизнеспособности криоконсервированных лоскутов кожи *in vitro* эпидермальные клетки получали по методу [4]. Суспензию клеток культивировали в среде 199 с добавлением 5% инактивированной эмбриональной сыворотки теленка, 1% глутамина, 50 ед./мл канамицина [16].

В процессе культивирования эпидермальных клеток криоконсервированных кожных лоскутов отчетливая пролиферативная активность отмеча-

Hairs in donor's skin site were mechanically removed in 3 days before the experiment. PEO-400 cryoprotectant possesses a combined effect, particularly penetrates inside a cell, has a weak toxicity, does not require its removal before the introduction into an organism.

Treated by such a way the donor's skin site in 4 hrs was separated from the surrounded tissues, washed-out from subcutaneous fat and in fluoroplastic hermetic bags, containing 0.3–0.5 ml of cryoprotectant solution immersed into a liquid nitrogen for freezing and storage. Cooling rate of graft skin samples was about 400 °C/min. Samples were warmed by a rapid immersing of bags into a water bath with 41 °C temperature.

Tissue viability serves as the main index in the efficiency of cryopreservation ways. Two criteria for the estimation of cryopreserved skin viability have been used: *in vivo* skin retention in syngenic recipients and cell capability of cryopreserved tissues to *in vitro* proliferation.

To detect *in vivo* skin viability, cryopreserved skin grafts of CBA mice were orthotopically transplanted to syngenic recipients according to the method [2]. A complete retention of cryopreserved transplants in syngenic recipients testified to this, but a focal depigmentation of the hairs grew within a whole observation term was thereat noted. This is connected, obviously, to irreversible damages of pigment forming function of some skin cells after cryopreservation.

The state of transplants was observed from the moment of bandage removal, usually in 4–5 days after transplantation. Transplant state was visually estimated. Transplants, that within 3–5 days were pale rose, warm, elastic, closely adjacent to recipient's tissue were considered as initially retained. In future a hair cover in transplants grew backwards. The moment of hemorrhages or cyanosis appearance and transplant edema was considered as the beginning of allogenic transplants rejection. The day, when transplant has crust-like view, dense to the touch, was considered as the day of rejection.

For *in vitro* determination of cryopreserved skin grafts viability, epidermal cells were obtained by the method [4]. Cell suspension was cultured in the 199 medium adding 5% inactivated embryonic calf serum, 15% glutamine, 50 units/ml of kanamycin [16].

During the process of epidermal cell culture of cryopreserved skin grafts a distinct proliferative activity was noted to 7.6 ± 0.12 day, when the islets of fissioned cells were formed. To 11.2 ± 0.2 day separate islets fused and were the sites of entire growth.

In the cultures of epidermal cells, obtained from native skin grafts, proliferation foci appeared earlier ($p < 0.01$) to the 4.4 ± 0.09 day in comparison with cell culture of cryopreserved graft cells, proliferative activity of native cells was more intensive. To the 8.37 ± 0.17 day monolayer formed.

Inhibition of cell proliferation processes after cryopreservation occurred, probably, in the result of development in them of non-lethal damages, a certain time

лась на $7,6 \pm 0,12$ сут, когда образовывались островки размножившихся клеток. На $11,2 \pm 0,2$ сут отдельные островки сливались и представляли собой участки сплошного роста.

В культурах эпидермальных клеток, полученных из нативных кожных лоскутов, очаги пролиферации появлялись раньше ($p < 0,01$) на $4,4 \pm 0,09$ сут, чем при культивировании клеток криоконсервированных лоскутов, пролиферативная активность нативных клеток была интенсивнее. На $8,37 \pm 0,17$ сут сформировался монослой.

Ингибция процессов пролиферации клеток после криоконсервирования происходила, вероятно, в результате развития в них нелетальных повреждений, для их репарации требовался определенный промежуток времени, в течение которого клетки не пролиферировали.

Для оценки свойств кожных лоскутов до и после криоконсервирования исследовали спектр водорастворимых белков с помощью "оконного" электрофореза по методу [11, 12] в модификации с использованием стандартного прибора для вертикального диск-электрофореза Multifor фирмы "LKB".

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле, помещая фрагмент дермо-эпидермального лоскута массой 0,025 г в верхнюю часть концентрирующего геля после предварительного электрофореза без внесения образца кожи. После электрофореза гели фиксировали 24 ч в 7%-й трихлоруксусной кислоте, на 6 ч помещали в краситель кумасси голубой, отмывали избыток красителя этой кислотой в течение 24 ч, после чего проводили денситометрирование гелей.

Во время отработки метода был установлен режим электрофореза, не влияющий на жизнеспособность обработанных образцов кожи.

В электрофоретическом спектре белков нативных кожных лоскутов были выявлены пять фракций: из них две с более высокой электрофоретической подвижностью, две со средней и одна с низкой (рисунок).

В следующей серии экспериментов образцы нативной и криоконсервированной кожи после отогрева помещали в буферный раствор при температуре 4°C на 24 ч. После инкубации в растворе их подвергали электрофорезу. Обнаружено, что содержание всех медленно движущихся фракций белков снижалось, кроме фракции, которая повышалась в коже после криоконсервирования. Вероятно, увеличение содержания этой фракции не являлось следствием простой деструкции клеток, а скорее происходило в результате нарушения проницаемости мембран клеток кожи после криоконсервирования.

В следующей серии экспериментов исследовалась иммуногенность криоконсервированных кожных трансплантатов по скорости их отторжения в аллогенной системе. Первые признаки отторжения криоконсервированных аллотрансплантатов отмечались на $6,7 \pm 0,18$ сут, полное их отторжение про-

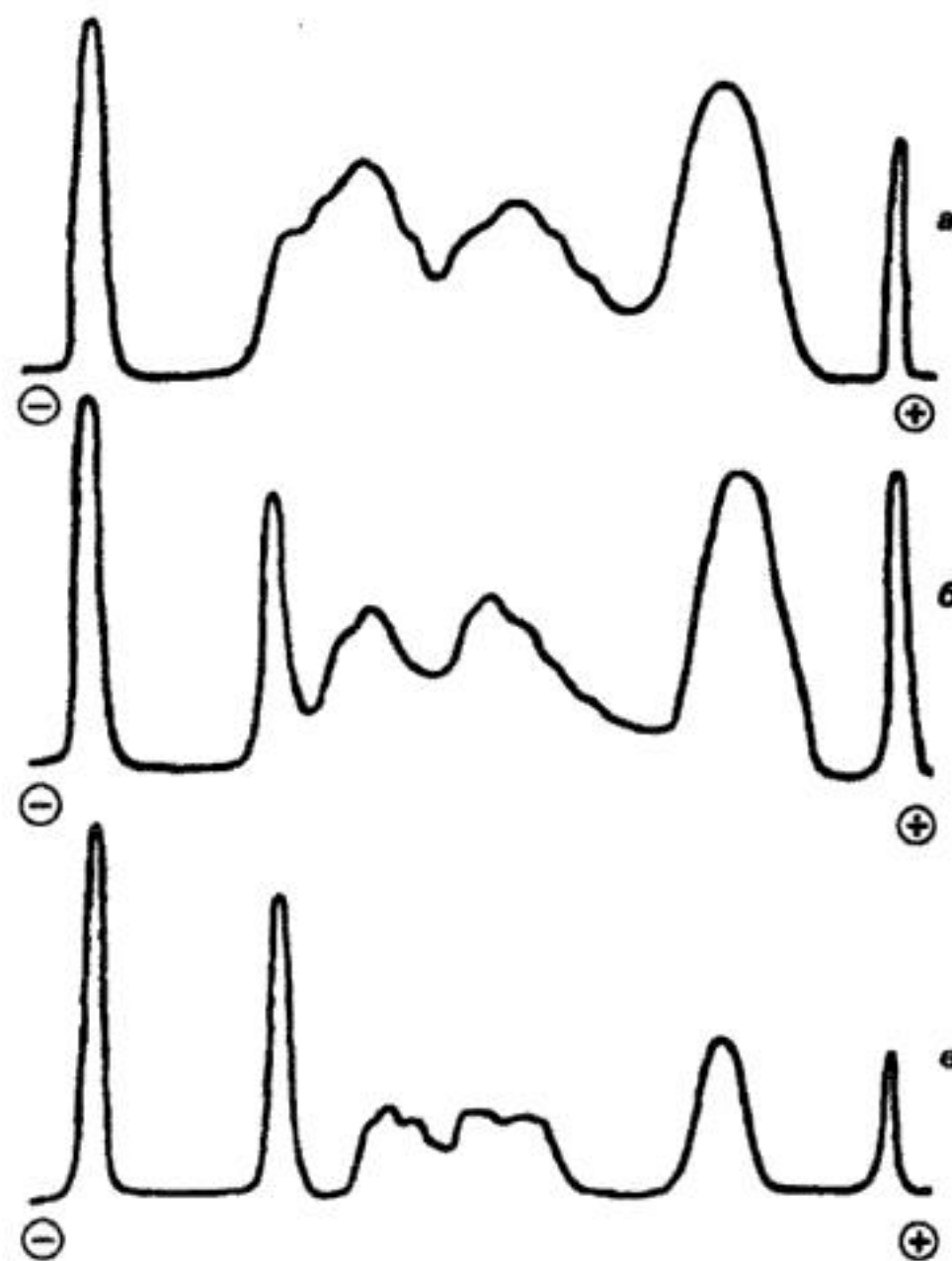
interval, within of which the cells did not proliferate, was essential for their reparation.

For the estimation of skin grafts properties before and after cryopreservation the range of water-soluble proteins by means of vertical electrophoresis on Laemly [11, 12] in the modification using a standard device for Multiphor vertical disk-electrophoresis of the "LKB" firm was studied.

Electrophoresis was conducted in polyacrilamide gel, by storing the fragment of dermo-epidermal graft with 0.025 g mass into an upper part of concentrating gel after preliminary electrophoresis without the introduction of a skin sample. After electrophoresis the gels were fixed within 24 hrs in 7% trichloroacetic acid, put for 6 hrs into cumassie blue dye, washed-out dye surplus by means of 7% trichloroacetic acid within 24 hrs, after this gel densitometry has been conducted. During the mastering of the method electrophoresis regimen, does not affecting viability of treated skin samples, has been established.

In electrophoretic protein spectrum of native skin grafts 5 fractions were revealed, where 2 fractions with a higher electrophoretic motility, two — with an average one and one with a low electrophoretic motility (Figure).

In the next series of experiments the samples of native and cryopreserved skin after warming were put into buffer solution under 4°C within 24 hrs. After the incubation in solution they were subjected to electrophoresis. It was found, that the composition of all slowly moving protein fractions decreased besides the fraction, that increased in a skin after cryopreservation. Probably,



Денситограммы белковых фракций кожи: а — нативной; б — криоконсервированной; в — криоконсервированной и экспонированной в буферном растворе.

Densitograms of skin protein fractions: а — native; б — cryopreserved; в — cryopreserved and exposed in bufer solution.

исходило на $12,6 \pm 0,24$ сут. После пересадки нативных кожных лоскутов первые признаки отторжения отмечались на $5,4 \pm 0,17$ сут после трансплантации, т.е. достоверно раньше ($p < 0,01$). Отторжение нативных аллотрансплантатов наступало на $10,2 \pm 0,22$ сут.

Изменения гистологического строения трансплантатов обнаруживались в период отсутствия визуальных и пальпаторных признаков отторжения. Так, со 2-х суток посттрансплантационного периода в отдельных клетках эпидермального слоя, волосяных фолликулов и сальных желез происходит вакуолизация цитоплазмы.

На 3-и сутки наблюдались набухание и дезинтеграция эпителиальных клеток эпидермиса и волосяных фолликулов. Дермальный слой выглядел отечным, коллагеновые волокна, прилегающие к эпидермису, образовывали гомогенные участки. В глубоких слоях дермы структура отдельных коллагеновых волокон сохранялась, определялись тяжи, состоящие из эндодермальных и соединительных волокон.

На 5-е сутки после пересадки нативных, в меньшей степени криоконсервированных аллогенных трансплантатов, формировались отдельные фолликулы. Отечность дермального слоя была менее выражена, чем на 3-и сутки наблюдения. Отмечалась выраженная реваскуляризация нативных трансплантатов. Возрастала инфильтрация их лимфоидными элементами. В криоконсервированных трансплантатах перечисленные изменения выявлялись на 7-е сутки посттрансплантационного периода.

На 10-е сутки после аллотрансплантации в нативных лоскутах отмечались некротизация, слущивание участков эпидермального слоя, деструкция дермального слоя. В криоконсервированных аллотрансплантатах в это время еще сохранился ряд структур и в целом выраженность деструктивных изменений была значительно меньшей.

Показано, что под влиянием криоконсервирования с помощью предложенного метода снижается иммуногенность кожных трансплантатов, в результате чего пролонгируется время их приживания в организме реципиентов. Снижение иммуногенности криоконсервированных кожных трансплантатов отмечалась в большей степени, когда трансплантаты хранились при умеренно низких температурах [6, 8, 9, 14, 19].

В то же время [18] не отмечено изменения спектров антигенов в криоконсервированных кожных трансплантатах. Одной из возможных причин указанных различий является использование разных методов криоконсервирования и конечных температур охлаждения.

Полученные нами результаты по изучению электрофоретической подвижности белковых фракций нативных и криоконсервированных кожных лоскутов после экспозиции их в физрастворе свидетельствуют о том, что проницаемость кожи после криоконсервирования возрастает, в результате чего внеклеточные фракции белков более активно выходят из кожи, что может быть одной из причин снижения иммуногенности криоконсервированных кожных трансплантатов. Известно, что от используемых криопротекторов, скоростей и конечной температуры охлаждения будет зависеть степень сохранности физико-химических свойств мембран

an increase of this fraction composition did not cause a simple cell destruction, but rather, this occurred in the result of the damage of skin cells membrane permeability after cryopreservation.

In the next series of experiments immunogeneity of cryopreserved skin transplants on the rate of their rejection in an allogenic system has been investigated. The first signs of the cryopreserved allotransplants rejection was observed to 6.7 ± 0.18 day, a complete their rejection occurred to 12.6 ± 0.24 day. After the transplantation of native skin grafts the first signs of rejection were observed to 5.4 ± 0.17 day after transplantation, i.e. significantly earlier ($p < 0.01$). The rejection of native allotransplants was observed to 10.2 ± 0.22 day.

The changes in structure of the transplants were revealed within the period of the absence of visual and palpatory rejection signs. However beginning from the 2nd day of posttransplantational period in separate cells of epidermal layer, hair follicles and fat glands cytoplasm vacuolization occurs.

To the 3rd day swelling and disintegration of epidermal epithelial cells and hair follicles were observed. Dermal layer was oedematic, collagenic fibers adjoined to epidermis, formed homogenous sites. In deep derma layers the structure of some collagenic fibers remained, cords, consisted of endodermal and connective fibers were detected.

To the 5th day after transplantation of native, in lesser extent cryopreserved allogenic transplants, separate follicles formed. Oedema in a dermal layer was slightly manifested, than in the 3rd day of observation. Manifested revascularization of native transplants was noted. Their infiltration by lymphoid elements increased. In cryopreserved transplants the changes noted were revealed to the 7th day of posttransplantational period.

To the 10th day after allotransplantation necrosis, exfoliation of epidermal layer sites, destruction of dermal layer in native grafts were observed. In cryopreserved allotransplants the series of structures was still maintained and in the whole manifestation of destructive changes was significantly less.

It has been shown, that under the effect of cryopreservation by means of the method proposed, immunogeneity of skin transplants decreases, in the result of which the time of their retention in recipients' organism rises. A decrease of the cryopreserved skin transplants immunogeneity was noted in a greater degree, when transplants were stored at moderately low temperatures [6, 8, 9, 14, 19].

At the same time [18] the change of antigen spectra in the cryopreserved skin transplants has not been noted. The usage of different cryopreservation methods and final cooling temperatures is one of possible causes of the differences found.

Obtained by us results on the studying of electrophoretic mobility of protein fractions of native and cryopreserved skin grafts after their exposure in a physiological solution testify to the fact, that skin permeability after cryopreservation increases, in the result of that extracellular protein fractions actively leave a skin, that may be one of the causes of immunogeneity reduction of cryopreserved skin transplants. It is known, that the integrity degree of physical and chemical cell membrane characteristics, subcellular organelles, conformation of protein macromolecules,

клеток, субклеточных органелл, конформации белковых макромолекул, их топографии в мембранах клеток, которые входят в состав кожных трансплантатов. Степенью выраженности и характером изменений свойств клеток в криоконсервированных трансплантатах определяются иммуногенность последних и степень выраженности реакций трансплантационного иммунитета [7, 10, 13, 15, 17].

Полученные результаты позволяют обоснованно отдавать предпочтение использованию в клинике криоконсервированных кожных трансплантатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. — Киев: Наук. думка, 1982. — 257 с.
2. Billingham R. E., Medawar P. B. The technique of free skin grafting in mammals // J. Exp. Biol. And Med. — 1951. — 28. — P. 385–402.
3. Crowe J. H., Crowe L. M., Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose // Science. — 1984. — 223, № 4637. — P. 701–703.
4. Fusenig N. E., Worst P. K. N. Mouse epidermal cell cultures. 1. Isolation and cultivation of epidermal cells from adult mouse skin // J. Invest. Dermatol. — 1974. — 63, № 2. — P. 187–193.
5. Grout B. W. N., Fuller B. J. Hepatocyte plasma membrane response to hypertonic stress and related cell viability // Cryo-Lett. — 1982. — 3, № 1. — P. 51–56.
6. Hibino J., Hata K. et al. Structural changes and cell viability of cultured epithelium after freezing storage // J. Craniomaxillofac surg. — 1996. — 24, № 6. — P. 346–351.
7. Ingham E., Matthews J.B. et al. The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogenic skin grafts // Cryobiology. — 1993. — 30, № 5. — P. 443–458.
8. Jia X., Zhu L., Li C. Antigenic changes in skin after cryopreservation // Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai ko Tsa Chin. — 1994. — 10, № 5. — P. 382–384.
9. Jia X., Zhu L., Li C. Viability and antigenic changes in the skin after preservation under different temperatures. // Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chin. — 1995. — 11, № 6. — P. 436–439.
10. Khatib H., Lupinetti F.M. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts // Transplantation. — 1990. — 49, № 4. — P. 765–767.
11. Klaue P., Golley W. B. Prolongation of rabbit skin allograft survival following treatment of skin with electrophoresis prior transplantation // Transplant. — 1971. — 11, № 1. — P. 30–34.
12. Kohnlein H. E., Schoenenberger G. A. et al. Immunologic activity of antigens separated from skin by electrophoresis // Europ. Surg. Res. — 1972. — 4, № 1. — P. 10–17.
13. Limat A., Hunziker T. et al. Postmitotic human dermal fibroblasts preserve intact feeder properties for epithelial cell growth after long-term cryopreservation // In vitro Cell Dev. Biol. — 1990. — 26, № 7. — P. 709–712.
14. Lupinetti F. M., Christy J. P. et al. Immunogenicity, antigenicity and endothelial viability of aortic valves preserved at 4 degrees C. In a nutrient medium // J. Card. Surg. — 1991. — 6, № 4. — P. 454–461.
15. Omi T., Kawanami O. et al. Histological characteristics of the healing process of frozen skin allograft used in the treatment of burns // Burns. — 1996. — 22, № 3. — P. 206–211.
16. Speid M., Boyse E. A., Carswell E. A. Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells // J. Exper. Med. — 1972. — 135, № 3. — P. 938–942.
17. Taylor W. Y., Bank H. L. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity // Cryobiology. — 1988. — 25, № 1. — P. 1–17.
18. Tomita J., Zhang Q. W. et al. Lack of effect of cryopreservation on the class I and class II antigenicities of skin allografts // Transplant Proc. — 1998. — 30, № 1. — P. 60–62.
19. Wendt I. R. Decreasing the antigenicity and repopulation of skin allografts. [Letter; comment.] // Plast. Reconstr. Surg. — 1994. — 93, № 7. — P. 1525–1527.

their topography in cell membranes, comprised by skin transplants, will depend on the cryoprotectants used, rates and final cooling temperatures. Immunogenicity of the latter ones and manifestation degree of transplantational immunity responses [7, 10, 13, 15, 17] are determined by the manifestation degree and the character of cell characteristics changes.

The results obtained allow to substantially prefer the usage of cryopreserved skin transplants in clinics.

REFERENCES

1. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural changes of biological membranes at cooling. — Kiev: Nauk. dumka, 1982. — 257 p.
2. Billingham R. E., Medawar P. B. The technique of free skin grafting in mammals // J. Exp. Biol. And Med. — 1951. — 28. — P. 385–402.
3. Crowe J. H., Crowe L. M., Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose // Science. — 1984. — 223, № 4637. — P. 701–703.
4. Fusenig N. E., Worst P. K. N. Mouse epidermal cell cultures. 1. Isolation and cultivation of epidermal cells from adult mouse skin // J. Invest. Dermatol. — 1974. — 63, № 2. — P. 187–193.
5. Grout B. W. N., Fuller B. J. Hepatocyte plasma membrane response to hypertonic stress and related cell viability // Cryo-Lett. — 1982. — 3, № 1. — P. 51–56.
6. Hibino J., Hata K. et al. Structural changes and cell viability of cultured epithelium after freezing storage // J. Craniomaxillofac surg. — 1996. — 24, № 6. — P. 346–351.
7. Ingham E., Matthews J.B. et al. The effects of variation of cryopreservation protocols on the immunogenicity of allogenic skin grafts // Cryobiology. — 1993. — 30, № 5. — P. 443–458.
8. Jia X., Zhu L., Li C. Antigenic changes in skin after cryopreservation // Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai ko Tsa Chin. — 1994. — 10, № 5. — P. 382–384.
9. Jia X., Zhu L., Li C. Viability and antigenic changes in the skin after preservation under different temperatures. // Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chin. — 1995. — 11, № 6. — P. 436–439.
10. Khatib H., Lupinetti F.M. Antigenicity of fresh and cryopreserved rat valve allografts // Transplantation. — 1990. — 49, № 4. — P. 765–767.
11. Klaue P., Golley W. B. Prolongation of rabbit skin allograft survival following treatment of skin with electrophoresis prior transplantation // Transplant. — 1971. — 11, № 1. — P. 30–34.
12. Kohnlein H. E., Schoenenberger G. A. et al. Immunologic activity of antigens separated from skin by electrophoresis // Europ. Surg. Res. — 1972. — 4, № 1. — P. 10–17.
13. Limat A., Hunziker T. et al. Postmitotic human dermal fibroblasts preserve intact feeder properties for epithelial cell growth after long-term cryopreservation // In vitro Cell Dev. Biol. — 1990. — 26, № 7. — P. 709–712.
14. Lupinetti F. M., Christy J. P. et al. Immunogenicity, antigenicity and endothelial viability of aortic valves preserved at 4 degrees C. In a nutrient medium // J. Card. Surg. — 1991. — 6, № 4. — P. 454–461.
15. Omi T., Kawanami O. et al. Histological characteristics of the healing process of frozen skin allograft used in the treatment of burns // Burns. — 1996. — 22, № 3. — P. 206–211.
16. Speid M., Boyse E. A., Carswell E. A. Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells // J. Exper. Med. — 1972. — 135, № 3. — P. 938–942.
17. Taylor W. Y., Bank H. L. Function of lymphocytes and macrophages after cryopreservation by procedures for pancreatic islets: potential for reducing tissue immunogenicity // Cryobiology. — 1988. — 25, № 1. — P. 1–17.
18. Tomita J., Zhang Q. W. et al. Lack of effect of cryopreservation on the class I and class II antigenicities of skin allografts // Transplant Proc. — 1998. — 30, № 1. — P. 60–62.
19. Wendt I. R. Decreasing the antigenicity and repopulation of skin allografts. [Letter; comment.] // Plast. Reconstr. Surg. — 1994. — 93, № 7. — P. 1525–1527.

Accepted in 11.04.2000

Поступила 11.04.2000

Сравнительное изучение жизнеспособности криоконсервированных культур эндокринных тканей новорожденных поросят

Т. П. БОНДАРЕНКО, Н. Г. КАДНИКОВА, Н. М. АЛАБЕДАЛЬКАРИМ, Г. А. БОЖОК,
О. А. СУПРУН, О. В. КОФАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Comparative Study of New Born Piglets Endocrinic Tissues Cryopreserved Cultures Viability

T. P. BONDARENKO, N. G. KADNIKOVA, N. M. ALABEDALKARIM, G. A. BOZHOK,
O. A. SUPRUN, O. V. KOFANOVA

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

На основании данных о жизнеспособности криоконсервированных культур тканей надпочечников, щитовидной железы, семенников новорожденных поросят проведена сравнительная оценка их чувствительности к замораживанию-отогреву в присутствии криопротектора ДМСО с концентрациями 3,5 и 5%.

На підставі даних про життєздатність кріоконсервованих культур тканин надниркових залоз, щитовидної залози, сім'яників новонароджених поросят була проведена порівняльна оцінка їх чутливості до заморожування-відігрівання в присутності кріопротектора ДМСО з концентраціями 3,5 та 5%.

Basing on the data about the viability of cryopreserved cultures of adrenal, thyroid glands, testes of new born piglets, a comparative estimation of their susceptibility to freeze-thawing in DMSO cryoprotectant presence with the 3.5 and 5% concentrations was carried-out.

В клинической практике при лечении различного рода эндокринных патологий человека наблюдается тенденция к более широкому применению ксенотрансплантатов. Это связано как с увеличением контингента лиц, страдающих недостаточностью эндокринных функций, так и с использованием стероидной терапии, приводящей при длительном ее применении к развитию ряда побочных явлений и гормональной дисфункции. Для лечения некоторых эндокринных патологий используется ксенотрансплантация свежесывращенных культур тканей надпочечников, щитовидной и поджелудочной желез, семенников новорожденных поросят [3, 6–9]. С целью оптимизации применения метода ксенотрансплантации при лечении эндокринных заболеваний необходимо создать низкотемпературный банк культур тканей новорожденных поросят.

В практике криоконсервирования биологических тканей необходимым условием является подбор оптимальных условий криоконсервирования: состава криозащитной среды, программы замораживания, режима отогрева и т.д. Сохранность криоконсервированных эндокринных тканей обычно оценивается по их способности синтезировать и выделять гормоны в среду после отогрева. При апробировании состава криозащитных сред для различных эндокринных тканей стандартные методы определения концентрации гормонов часто являются достаточно трудоемкими и продолжительными. В связи с этим метод определения жизнеспособности клеток путем прижизненного окрашивания может быть использован на начальных этапах разработки режима криоконсервирования как способ быстрой оценки эффективности замораживания-отогрева.

In clinical practice the tendency to xenotransplants widest application when treating different human endocrinic pathologies is observed. This is connected both to the increase of patients, suffering from the insufficiency of endocrinic functions and with the usage in steroid therapy resulting in development of the series of side effects and hormonal disfunctions at long term its application.

Xenotransplantation of freshly isolated cultures of adrenal, thyroid and pancreas gland tissues, testes of new born piglets [3, 6–9] is used to treat some endocrinic pathologies. With the aim of optimization of xenotransplantation method usage when treating endocrine diseases it is necessary to create low temperature bank of the cultures of new born piglets tissues.

In the practice of biological tissues cryopreservation the selection of optimal cryopreservation conditions such as the composition of cryoprotective medium, freezing program, thawing regimen etc. is the essential condition. The integrity of cryopreserved endocrine tissues is usually estimated by their capability to synthesize and release hormones in a medium after thawing. When approving cryoprotective medium content for different endocrine tissues the standard methods for determination of hormone concentration are often quite hard-working and long-term. In this connection the method for determination of cell viability by their alive staining may be used at initial stages of the elaboration of cryopreservation regimen as the way of a rapid estimation of freeze-thawing efficiency.

A comparative study of low temperature preservation effect on the viability of adrenal, testes and thyroid gland tissues of new born piglets was the aim of the given work.

Cell cultures of adrenocortical tissue, testes and thyroid glands, obtained from one-day piglets by the

Цель данной работы — сравнительное изучение влияния низкотемпературного криоконсервирования на жизнеспособность культур тканей надпочечников, семенников и щитовидной железы новорожденных поросят.

Материалом исследования служили культуры адренокортикальной ткани, семенников и щитовидной железы, полученные из суточных поросят по методике [1]. Криоконсервирование исследуемых культур тканей проводили двухэтапным замораживанием: на 1-м этапе скорость составляла 1–3 °C/мин до –70 °C, на 2-м — 80 °C/мин до –196 °C. В качестве криопротектора использовали фармакопейный препарат диметилсульфоксид (ДМСО) — димексид, который готовили на физиологическом растворе. Конечная концентрация димексиды составляла 3,5 и 5%. Время эквilibрации образцов с криопротектором 30 мин. После хранения в течение месяца образцы культур тканей разморозили при 42 °C на водяной бане до появления жидкой фазы, обработали 0,1%-м раствором коллагеназы (200 ед/мг, Ferak Berlin) на среде 199 при 34 °C по методу [5]. Для контроля жизнеспособности культур использовали стандартную методику прижизненного окрашивания с трипановым синим (Lachema).

На рисунке представлены данные о процентном содержании живых клеток в образцах культур тканей надпочечников, щитовидной железы и семенников новорожденных поросят в зависимости от концентрации ДМСО в криозащитной среде после замораживания-отогрева. В [4] показано, что оптимальной концентрацией ДМСО с точки зрения влияния на уровень синтеза кортизола криоконсервированной культурой ткани надпочечников новорожденных поросят является его 5%-я концентрация. При изучении активности аденилатциклазы в адренокортикальной ткани при замораживании с димексидом было отмечено, что при возрастании концентрации ДМСО до 10% базальная и стимулируемая синактенном активность фермента уменьшается по сравнению с 1%- и 5%-й концентрациями [11].

Учитывая эти данные, мы исследовали криозащитную эффективность димексиды в концентрациях 3,5 и 5%.

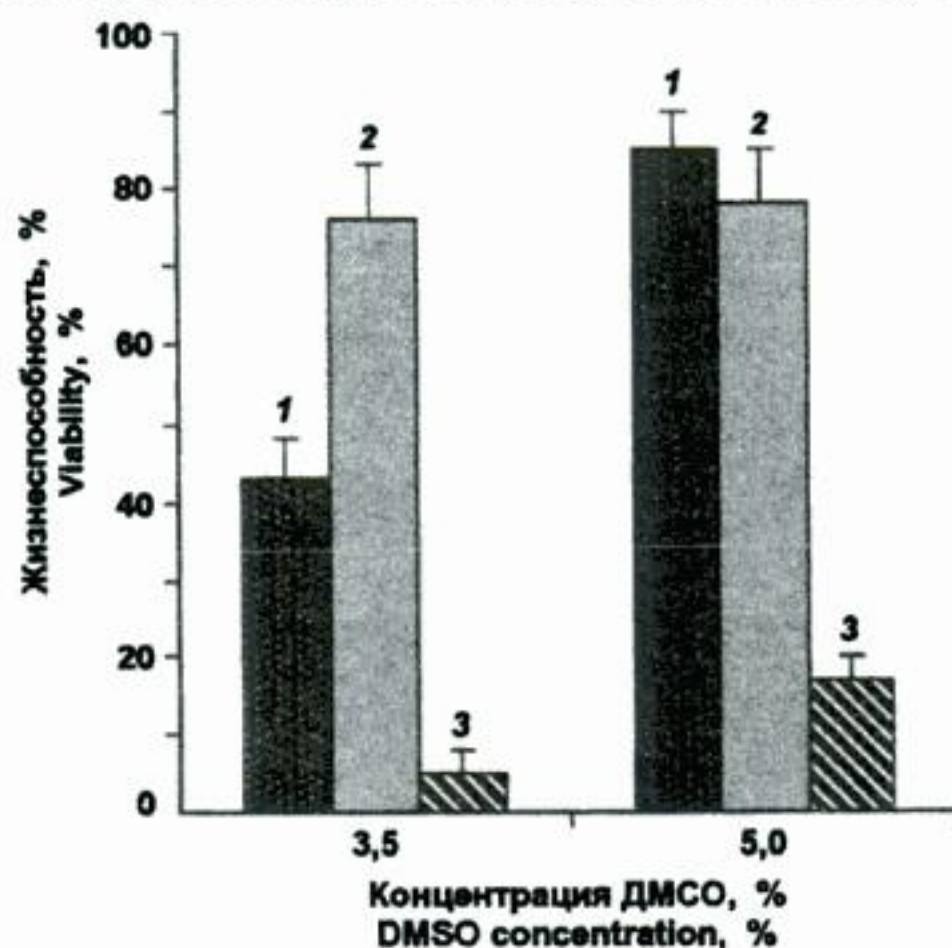
Очевидно, что снижение концентрации криопротектора приводит к значительному уменьшению количества жизнеспособных клеток в размороженной культуре ткани надпочечников поросят (рисунок, 1). Содержание живых клеток в культуре ткани щитовидной железы новорожденных поросят при криоконсервировании в присутствии исследованных нами концентраций криопротектора составляет 76–78% (рисунок, 2). В [10] было показано, что в криоконсервированном трансплантате щитовидной железы крысы после 20-суточного хранения при –196 °C отсутствуют грубые нарушения, разрывы, которые обязательно возникают в других тканях при аналогичных режимах замораживания-отогрева. Наши исследования жизнеспособности клеток также указывают на незначительное повреждающее действие криоконсервирования на культуру ткани щитовидной железы новорожденных поросят после хранения при –196 °C в течение 30 сут.

Известно, что цитологически органотипическая культура ткани семенников является более разно-

метод [1] were the material of investigation. Cryopreservation of the studied cultures of tissue cells was conducted by means of two-stage freezing: at the 1st one the rate made 1–3 °C/min down to –70 °C, at the 2nd one it was 80 °C/min down to –196 °C. Dimethyl sulphoxide (DMSO) pharmacopeial preparation — dimexide, prepared on physiological solution, was used as a cryoprotectant. Final DMSO concentration made 3.5 and 5%, the time of sample equilibration with cryoprotectant made 30 min. After the storage within a month the samples of tissue cultures were thawed at 42 °C on a water bath to the beginning of a liquid phase, treated by 0.1% collagenase solution (200 units/mg, Ferak Berlin) in the 199 medium under 34 °C by the method [5]. To control culture viability the standard method of alive cell staining with trypane blue (Lachema) was used.

The data on the percentage of alive cells in the samples of tissue cultures of adrenal, thyroid glands and testes of new born piglets depending on DMSO concentration in cryoprotective medium after freeze-thawing, are presented in the Figure. In [4] it has been shown, that optimal DMSO concentration from the point of view of the effect on hydrocortisone synthesis level of cryopreserved adrenal tissue culture of new born piglets is its 5% concentration. When studying adenylate cyclase activity in adrenocortical tissue when freezing with dimexide it has been noted, that during the increase of DMSO concentration up to 10% basal and stimulated by synacten enzyme activity decreases in comparison with 1% and 5% concentrations [11]. Taking into consideration these data, we investigated dimexide cryoprotective activity under 3.5 and 5% concentrations.

Obviously, the reduction of cryoprotectant concentration results in a significant decrease of viable cell number in thawed culture of piglets adrenal gland tissue (Figure, 1). The content of alive cells in the culture of thyroid gland tissue of new born piglets when cryopreserving in the presence of studied by us



Процентное содержание живых клеток в образцах криоконсервированных культур тканей: 1 — надпочечников, 2 — щитовидной железы, 3 — семенников новорожденных поросят в зависимости от концентрации ДМСО.

The percentage of alive cells in the samples cryopreserved cultures of the tissues: 1 — adrenal glands; 2 — thyroid gland; 3 — testes of new born piglets depending on DMSO concentration.

образной (половые клетки, эпителиальные, фибробласты, клетки Лейдига), а следовательно, более требовательной к режиму криоконсервирования. Для эмбриональных клеток тестиса человека рекомендовано криоконсервирование с 0,7 М ДМСО при дальнейшем 3-этапном замораживании до -196°C [2]. Для культуры ткани семенников новорожденных поросят замораживание при использованных концентрациях димексида оказалось неэффективным, так как содержание живых клеток составляло 17 и 5% соответственно (рисунок, 3).

Таким образом, полученные нами результаты о процентном содержании живых клеток в культуре ткани надпочечников новорожденных поросят подтверждают данные о том, что именно 5%-я концентрация ДМСО является оптимальной для криоконсервирования. Органотипическая культура щитовидной железы новорожденных поросят менее чувствительна к замораживанию, так как сохранность клеток после отогрева была высокой при обеих концентрациях димексида. В то же время использованные концентрации ДМСО для криоконсервирования культуры ткани семенников новорожденных поросят оказались неэффективными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко Т. П., Легач Е. И. Криоконсервирование адренокортикальной ткани и ее использование в клинике // *Клінічна фармація*.— 1999.— 3, № 2.— С. 112–115.
2. Керос В. А. Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии // *Пробл. криобиологии*.— 1999.— № 3.— С. 54–59.
3. Ксенотрансплантация криоконсервированных культур островковых клеток поджелудочной железы при инсулинзависимом сахарном диабете и его хронических осложнениях: Метод. рекомендации / Сост. А. С. Никоненко, Б. П. Сандомирский, А. А. Ковалев и др.— Запорожье, 1995.— 18 с.
4. Легач Е. И. Влияние криоконсервирования на адренокортикальную ткань: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1998.— 23 с.
5. Лечение хронического гипокортицизма методом трансплантации культуры клеток коры надпочечных желез: Метод. рекомендации / Сост. Н. Д. Тронько, С. И. Рыбаков, И. В. Комиссаренко и др.— Киев, 1990.— 24 с.
6. Потіха О. П., Челнакова І. С., Турчин І. С. Ауто- і ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам із експериментальним гіпогонадізмом // *Фізіол. журн.*— 1993.— 49, № 5–6.— С. 71–76.
7. Тронько Н. Д., Богданова Т. И., Турчин И. С. Ультраструктурная характеристика органних культур надпочечников новорожденных поросят // *Эндокринология*.— 1989.— 34, № 5.— С. 65–69.
8. Тронько М. Д., Турчин І. С., Ковальська І. О. та ін. Трансплантація культур β-клітин підшлункової залози новонароджених поросят хворим цукровим діабетом // *Матеріали 1-го съезда трансплантологов Украины*.— Киев, 1995.— С. 180–181.
9. Турчин І. С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // *Ендокринологія*.— 1996.— 1, № 2.— С. 6–13.
10. Чуйко В. А. Функциональная активность трансплантата криоконсервированной при -196°C щитовидной железы // *Пробл. криобиологии*.— 1992.— № 3.— С. 3–15.
11. Чуйко В. А., Карпенко Н. Г., Новиков А. Н., Олейник С. Т. и др. Активность аденилатциклазы в адренокортикальной ткани при различных режимах охлаждения с димексидом и пропандиолом // *Пробл. криобиологии*.— 1994.— № 2.— С. 41–44.

Поступила 03.02.2000

cryoprotectant concentration, makes 76–78% (Figure, 2). It has been demonstrated [10], that in cryopreserved transplant of rat thyroid gland after the storage under -196°C within 20 days sharp damages, ruptures, appeared in another tissues at analogous freeze-thawing regimens are absent. Our investigations of cell viability also testify to a slight damaging cryopreservation effect on the culture of thyroid gland tissue of new born piglets after the storage at -196°C within 30 days.

It is known, that cytologically organotypic culture of testes tissue is more various (sexual cells, epithelial cells, fibroblasts, Leidig's cells), and therefore, they have more requirements to cryopreservation regimen. For human testes embryonic cells the cryopreservation with 0.7 M DMSO with further 3-stage freezing down to -196°C is recommended [2]. For the culture of new born piglet testes tissue the freezing under used concentrations of dimexide occurred to be not efficient, because the number of viable cells made 17 and 5%, correspondingly (Figure, 3).

Thus, the results obtained by us on the percentage of alive cells in culture of new born piglets adrenal gland tissue confirm the data on the fact, that, namely 5% DMSO concentration is optimal for cryopreservation. Organotypic culture of new born piglets thyroid gland is less susceptible to freezing, because cell integrity after thawing was high under both dimexide concentrations. At the same time DMSO concentrations, used for cryopreservation of the culture of new born piglet's testes tissue occurred to be not efficient.

REFERENCES

1. Bondarenko T. P., Legach E. I. Cryopreservation of adrenocortical tissue and its usage in clinics // *Klinichna Farmaciya*.— 1999.— 3, № 2.— P. 112–115.
2. Keros V. A. Cryopreservation of human fetotesticular tissue and creation of low temperature bank for its further usage in clinical transplantology // *Problemy kriobiologii*.— 1999.— № 3.— P. 54–59.
3. Xenotransplantation of cryopreserved cultures of pancreas islet tissue at insulin-dependent Diabetes mellitus and its chronic complications: Method. recommendations / Composed by A. S. Nikonenko, B. P. Sandomirsky, A. A. Kovalev et al.— Zaporozhye, 1995.— 18 p.
4. Legach E. I. Cryopreservation effect on adrenocortical tissue: The abstract for PhD (medicine), Kharkov, 1998.— 23 p.
5. The treatment of chronic hypocorticism by means of culture transplantation of adrenal cortex cells: Method. recommendations / Composed by N. D. Tronko, S. I. Rybakov, I. V. Komissarenko et al.— Kiev, 1990.— 24 p.
6. Potikha O. P., Chelnakova I. S., Turchin I. S. Autoxenotransplantation of testes organ cultures to castrated rats and rats with experimental hypogonadism // *Physiol. Journ.*— 1993.— 49, № 5–6.— P. 71–76.
7. Tronko N. D., Bogdanova T. I., Turchin I. S. Ultrastructural characteristics of adrenal glands organ cultures of new born piglets // *Endokrinologiya*.— 1989.— 34, № 5.— P. 65–69.
8. Tronko M. D., Turchin I. S., Kovalska I. O. et al. Transplantation of pancreas β-cells culture of new born piglets with Diabetes mellitus // *Materials of the 1st Meeting of Ukrainian transplantologists*.— Kiev, 1995.— P. 180–181.
9. Turchin I. S. The problem of cell and tissue culture transplantation of internal secretion glands to the patients with various forms of endocrinopathy // *Endokrinologiya*.— 1996.— 1, № 2.— P. 6–13.
10. Chuiko V. A. Transplant functional activity of cryopreserved thyroid gland under -196°C // *Problemy kriobiologii*.— 1992.— № 3.— P. 3–15.
11. Chuiko V. A., Karpenko N. G., Novikov A. N., Olejnik S. T. et al. Adenylate Cyclase activity in adrenocortical tissue at different cooling regimens with dimexide and propane diol // *Problemy kriobiologii*.— 1994.— № 2.— P. 41–44.

Accepted in 03.02.2000

Усовершенствование методов криоконсервирования меристемы винограда

Т. Ф. СТИБУЛЬ, А. Н. НОВИКОВ, С. Т. ОЛЕЙНИК, А. И. ГРИГОРАЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Modification of Cryopreservation Methods of Grape Meristem

T. F. STRIBYL, A. N. NOVIKOV, S. T. OLEYNIK, A. I. GRIGORASCHENKO

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

Оптимизированы условия криоконсервирования меристемы винограда на основе варьирования ряда факторов (вид и концентрация криопротектора, время и температура эквilibрации объекта с криопротектором, условия замораживания и размораживания и др.). Представлена математическая модель процесса. Оценка жизнеспособности криоконсервируемого материала позволяет сделать вывод о возможности применения как быстрых, так и медленных режимов замораживания.

Оптимізовано умови криоконсервування меристеми винограду на основі варіації ряду факторів (вид і концентрація криопротектора, час і температура еквілібрації об'єкту з криопротектором, умови заморожування і розморожування та інші). Запропонована математична модель процесу. Оцінка життєдіяльності криоконсервованого матеріалу дозволяє зробити висновок про можливість застосування як швидких, так і повільних режимів заморожування.

The conditions for cryopreservation of the grape meristem were optimized on the basis of varying a range of factors (type and concentration of the cryoprotectant, duration and temperature of equilibrating the system with the cryoprotectant, conditions of freezing and thawing, etc.). A mathematical model of the process was developed. Evaluation of the viability of the cryopreserved material makes it possible to conclude on possible application of both rapid and slow modes of freezing.

Генетическая нестабильность, присущая культурам клеток *in vitro*, может привести к потере специфических особенностей данных клеток, изменению морфологии клеток и агрегатов и их метаболических характеристик [2]. Поэтому целесообразно сохранять культуру клеток в условиях пониженного метаболизма. Наиболее перспективными методами хранения следует считать криогенные. При этом высокую выживаемость показали мелкие меристематические клетки, а крупные вакуолизированные клетки погибали, что объясняется известными механизмами криоповреждения.

Усовершенствование метода криоконсервирования меристемы картофеля рассматривается в [3]. В настоящей работе использован и этот опыт, и данные по консервированию меристемы винограда сорта "Ркацители", приведенные в литературе. На основании обобщения [1, 4–8] можно заключить, что наиболее перспективными консервирующими средами можно считать: 5–10%-й ДМСО, 10%-й ДМСО + 8%-я глюкоза + 10%-й ПЭГ, ДМСО + глицерин + сахароза. Методика подготовки к замораживанию состоит в культивировании меристем с криопротекторами при температурах от 0 до 20 °C в течение от 1 до 48 ч.

Режим (программа) замораживания: на первом этапе со скоростью 0,25–1 °C/мин до –30 ÷ –40 °C, втором — погружение в жидкий азот. Отогрев — в водяной бане при температуре от 25 до 40 °C. Отмывание от криопротектора производится с помощью питательной среды.

Genetic instability, which is characteristic of the culture cells *in vitro*, may result in the loss of specific features of the given cells, changes in morphology of the cells and aggregates and their metabolic characteristics [2]. That is why it seems expedient to preserve the cell culture under conditions of reduced metabolism. The most promising methods for this are cryogenic ones. Here small meristemoid cells demonstrate the highest survival, while large, vacuolized cells mostly died, which was due to the action of the well-known mechanisms of cryoinjury.

The modification of the method for cryopreservation of potato meristem is investigated in [3]. The given research is based on the results obtained above and the data on cryopreservation of the Rkazitely grape meristem reported elsewhere. Analyzing the data available [1, 4–8] it may be concluded that the most promising cryopreservation media are: 5–10%-DMSO, 10%-DMSO + 8%-glucose + 10%-PEG, DMSO + glycerol + sucrose. A technique of preparation for freezing consists in culturing the meristems with cryoprotectants at the temperatures from 0 to 20 °C for 1–48 hours.

The mode (program) of freezing was: at the first stage — with the rate of 0.25–1 °C/min down to –30 ÷ –40 °C, at the second stage — plunging into liquid nitrogen. Thawing was done on water bath at the temperature of 25–40 °C. The cryoprotectant was washed off with the help of the nutritive medium.

С учетом известных литературных данных был проведен эксперимент по подбору условий криоконсервирования меристемы винограда. Использовали среды на буфере трис-НСl (pH 7,0) с криопротекторами: 5- и 10%-й ДМСО; 5%-й ДМСО + 10%-я сахароза; 10%-й ДМСО + 5%-я сахароза; 5%-й ДМСО + 10%-я глюкоза; 10%-й ДМСО + 5%-я глюкоза.

Были изучены следующие программы замораживания:

1-я программа — от 0 до $-10^{\circ}C$ со скоростью $3^{\circ}C/мин$, от -10 до $-20^{\circ}C$ — $5^{\circ}C/мин$, от -20 до $-40^{\circ}C$ — $10^{\circ}C/мин$, от -40 до $-135^{\circ}C$ — $30^{\circ}C/мин$, затем погружение в азот.

2-я программа — от 0 до $-10^{\circ}C$ со скоростью $0,5^{\circ}C/мин$, до $-20^{\circ}C$ — $1^{\circ}C/мин$, до $-30^{\circ}C$ — $2^{\circ}C/мин$, до $-40^{\circ}C$ — $3^{\circ}C/мин$, до $-70^{\circ}C$ — $5^{\circ}C/мин$, до $-90^{\circ}C$ — $10^{\circ}C/мин$, до $-135^{\circ}C$ — $30^{\circ}C/мин$, затем погружение в азот.

Образцы отогревали в водяной бане при температуре $37^{\circ}C$.

Было установлено, что слабую жизнеспособность имели только образцы, культивированные с 5% ДМСО и замороженные по 1-й программе, и образцы, культивированные на среде с 5% ДМСО + 10% глюкозы и замороженные по 1-й программе. Жизнеспособность образцов определяли окрашиванием тетразолом и с использованием балльной оценки.

Исследовали влияние растворов ряда криопротекторов 5- и 10%-й концентрации на выживаемость клеток меристемальной ткани после замораживания их по первой и второй программам. В таблице приведены средние значения жизнеспособности в баллах, полученные в результате 3-х повторностей. На основании полученных данных можно сделать вывод, что наиболее перспективными криопротекторами являются: 5%-й формамид, 5%-й диметилформамид (ДМФА), 5%-й диметил-ацетамид (ДМАА) и 10%-й поливинилпирролидон с молекулярной массой 12 000 (ПВП-12000) при использовании 2-й программы замораживания, а также 10%-й ПЭО-400 и 5%-й ПЭО-3000 при замораживании клеток по 1-й программе.

Из исследованного ряда криопротекторов выделили проникающий криопротектор ДМФА, с которым получены наилучшие результаты, и поставили планируемый эксперимент с использованием метода "случайного баланса", в котором действующими факторами являлись: X_1 — процентная концентрация криопротектора; X_2 — уровень pH ; X_3 — содержание смачивателя СВ-133, улучшающего контакт поверхности клеток меристемы со средой; X_4 — содержание йодистого серебра; X_5 — температура подготовки (эквilibрации с раствором криопротектора); X_6 — время подготовки; X_7 — режим замораживания; X_8 — режим размораживания (температура бани). Уровни варьирования перечисленных факторов следующие: X_1 — 3–8%; X_2 —

Taking into account the literature data available, the experiment was staged for selecting the conditions for cryopreservation of the grape meristem. The media with tris-HCl buffers (pH 7.0) were applied with the following cryoprotectants: 5- and 10%-DMSO, 5%-DMSO + 10%-sucrose, 10%-DMSO + 5%-sucrose, 5%-DMSO + 10%-glucose, 10%-DMSO + 5%-glucose.

The following freezing programs were tested:

program 1 — from 0 to $-10^{\circ}C$ with the rate of $3^{\circ}C/min$, from -10 to $-20^{\circ}C$ with the rate of $5^{\circ}C/min$, from -20 to $-40^{\circ}C$ with the rate of $10^{\circ}C/min$, from -40 to $-135^{\circ}C$ with the rate of $30^{\circ}C/min$, followed by plunging into nitrogen;

program 2 — from 0 to $-10^{\circ}C$ with the rate of $0.5^{\circ}C/min$, down to $-20^{\circ}C$ with the rate of $1^{\circ}C/min$, down to $-30^{\circ}C$ with the rate of $2^{\circ}C/min$, down to $-40^{\circ}C$ with the rate of $3^{\circ}C/min$, down to $-70^{\circ}C$ with the rate of $5^{\circ}C/min$, down to $-90^{\circ}C$ with the rate of $10^{\circ}C/min$, down to $-135^{\circ}C$ with the rate of $30^{\circ}C/min$, followed by plunging into nitrogen.

The samples were thawed on water bath at the temperature of $37^{\circ}C$.

It was found that poor viability was characteristic only of the samples, cultured with 5%-DMSO, and frozen according to program 1, and the samples, cultured on the medium with 5%-DMSO + 10%-glucose, and frozen by program 1. Viability of the samples was determined by staining with tetrazole and using a scale evaluation.

The actions of solutions of the series of cryoprotectants of the 5%- and 10%-concentrations on survival of cells of the meristemic tissue after freezing them by programs 1 and 2 were studied. The Table shows the average values of viability in marks, obtained after 3 sequences. On the basis of the data obtained it may be concluded that the most promising cryoprotectants are 5%-formamide, 5%-dimethyl formamide (DMFA), 5%-dimethyl acetamide (DMAA) and 10%-polyvinyl pyrrolidone with molecular mass 12 000 (PVP-12000) when using freezing program 2, and PEO-400 (10%) and PEO-3000 (5%) when freezing cells by program 1.

Out of the studied series of cryoprotectants a penetrating cryoprotectant DMFA was separated, the application of which produced the best results, and a planned experiment was staged using a method of a "random balance", in which the acting factors were: X_1 — concentration of the cryoprotectant in per cent; X_2 — level of pH ; X_3 — content of a СВ-133 wetting agent, which improves the contact of the meristemic cells with the medium; X_4 — content of silver iodide; X_5 — temperature of preparation (equilibration with the cryoprotective solution); X_6 — duration of preparation; X_7 — mode of freezing; X_8 — mode of thawing (temperature of the bath). The levels of variations of the above factors were as follows: X_1 — 3–8%; X_2 — 6–8%; X_3 — 0–0.2%; X_4 — yes–no; X_5 — from 12 to $-28^{\circ}C$; X_6 — 2–3 hours; X_7 — 3 and 4; X_8 — from 10 to $36^{\circ}C$.

Жизнеспособность клеток меристемальной ткани винограда после криоконсервирования

Вещество	Концентрация, %	Жизнеспособность в баллах по программам	
		1-й	2-й
ДМСО	5	0	1,66
	10	0,67	1,33
Диэтилсульфоксид	5	2,0	0
	10	0	0
Формамид	5	0	6,67
	10	0	0
ДМФА	5	0	6,67
	10	0	3,0
Ацетамид	5	0	1,39
	10	0	0
ДМАА	5	0	5,67
	10	0	1,67
Этиленгликоль	5	0	0
	10	3,67	1,0
1,2-ПД	5	0	0
	10	2,67	1,33
Глицерин	5	0	0,66
	10	0	0
ПЭО-100	5	0	2,0
	10	0	0
ПЭО-400	5	0	0
	10	3,67	1,33
ПЭО-1000	5	0,67	0
	10	2,67	3,33
ПЭО-3000	5	2,67	1,0
	10	2,33	0
ПЭО-20000	5	0	3,67
	10	0	0
ПВП-12000	5	0	0
	10	0	7,67

Viability of cells of grape meristemic tissue after cryopreservation

Substance	Concentration, %	Viability in marks by programs	
		1	2
DMSO	5	0	1.66
	10	0.67	1.33
Diethylsulphoxide	5	2.0	0
	10	0	0
Formamide	5	0	6.67
	10	0	0
DMFA	5	0	6.67
	10	0	3.0
Acetamide	5	0	1.39
	10	0	0
DMAA	5	0	5.67
	10	0	1.67
Ethylene glycol	5	0	0
	10	3.67	1.0
1.2-PD	5	0	0
	10	2.67	1.33
Glycerol	5	0	0.66
	10	0	0
PEO-100	5	0	2.0
	10	0	0
PEO-400	5	0	0
	10	3.67	1.33
PEO-1000	5	0.67	0
	10	2.67	3.33
PEO-3000	5	2.67	1.0
	10	2.33	0
PEO-20000	5	0	3.67
	10	0	0
PVP-12000	5	0	0
	10	0	7.67

6–8; X_3 – 0–0,2%; X_4 – есть–нет; X_5 – от 12 до 28 °C; X_6 – 1–3 ч; X_7 – 3 и 4; X_8 – от 10 до 36 °C.

Программа 3: от 0 до –20 °C скорость охлаждения 1 °C/мин, до –50 °C – 3 °C/мин, до –85 °C – 6 °C/мин, до –135 °C – 10 °C/мин, затем до –196 °C при скорости охлаждения около 60 °C/мин.

Программа 4: от 0 до –15 °C скорость охлаждения 0,5 °C/мин, до –35 °C – 2 °C/мин, до –80 °C – 5 °C/мин, до –135 °C – 15 °C/мин, затем до –196 °C при скорости охлаждения около 60 °C/мин.

Режимы замораживания 3 и 4 описываются многоломанными кривыми, максимально вписывающимися в экспоненту. Программа 2 занимает промежуточное положение между программами 3 и 4 по скорости снижения температуры.

Функцией отклика в данном эксперименте являлась жизнеспособность меристематических клеток, определяемая методом окрашивания тетразолом и оцениваемая в 10-балльной системе. В эксперименте использовался криопротектор ДМФА в 5%-й концентрации. При обработке результатов эксперимента на ЭВМ были вычислены коэффициенты при линейных членах и парных взаимодействиях в уравнении, представляющем математическую модель процесса:

Freezing modes 3 and 4 are described by multi-broken curves, which are inscribed into the exponent (in a manner similar to the modes 1 and 2). Mode 2 occupies an intermediary position between modes 3 and 4 as to the rate of temperature lowering.

Mode 3: from 0 to –20 °C with the cooling rate of 1 °C/min, down to –50 °C with the cooling rate of 3 °C/min, down to –85 °C with the cooling rate of 6 °C/min, down to –135 °C with the cooling rate of 10 °C/min, and then down to –196 °C the cooling rate was about 60 °C/min.

Mode 4: from 0 to –15 °C the cooling rate was 0.5 °C/min, down to –35 °C the cooling rate was 2 °C/min, down to –80 °C the cooling rate was 5 °C/min, down to –135 °C the cooling rate was 15 °C/min, then down to –196 °C the cooling rate was about 60 °C/min.

The function of response in the given experiment was viability of meristemic cells, determined with a method of tetrazole staining and evaluated by a 10-mark scale. A DMFA cryoprotectant in a 5%-concentration was used in the experiment. A PC-aided processing of results obtained permitted to calculate the factors for the linear members and coupled interactions in equation, which represents a mathematical model of the process:

$$Y = 0,625X_1 - 0,688X_3 - 0,219X_6 - \\ - 0,125X_1X_2 + 1,125X_1X_3 + 0,125X_1X_4 + \\ + 1,625X_1X_5 + 1,375X_1X_6 - 3,0X_1X_7 - 0,375X_1X_8 - \\ - 0,75X_2X_4 + 2,5X_2X_5 - 2,5X_2X_6 - 0,875X_2X_7 - \\ - 0,75X_2X_8 - 1,0X_3X_4 + 0,25X_3X_5 - 0,75X_3X_6 - \\ - 0,375X_3X_7 - 1,25X_3X_8 - 0,75X_4X_5 - 1,25X_4X_6 - \\ - 0,875X_4X_7 - 1,75X_4X_8 - 0,5X_5X_6 + 0,625X_5X_7 + \\ + 0,5X_5X_8 + 0,875X_6X_7 + 1,5X_6X_8 - 0,125X_7X_8.$$

Ввиду сложности полученного уравнения используемый метод предполагает оценку значимости парных взаимодействий провести с помощью алгебраического суммирования коэффициентов, характеризующих действие каждого фактора и определение направленности этого действия.

Анализ полученных результатов позволил сделать следующие выводы:

1. Содержание ДМФА в среде необходимо повысить от 5,5 до 8%.
2. Исключить использование смачивателя СВ-133 и йодистого серебра, поскольку их присутствие в среде для замораживания меристем винограда привело к ухудшению результатов криоконсервирования.
3. Увеличить время эквilibрации клеток меристемы винограда с консервирующей средой от 1-го до 3-х часов.
4. Снизить pH среды с 7 до 6.
5. Температуру подготовки клеток (эквilibрации с консервирующей средой) повысить до 28 °C.
6. Режим замораживания приближать к 3-й программе.
7. Температуру бани размораживания поднять с 23 до 36 °C.

Таким образом, полученные результаты жизнеспособности деконсервированных меристем картофеля и винограда свидетельствуют о пригодности разработанной аппаратуры и применяемых технологий криоконсервирования по методу как медленных, так и быстрых программ охлаждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Манжулин А. В., Попов А. С., Бутенко Р. Г. Получение растений-регенератов из меристемы *Solanum tuberosum* после хранения их в жидком азоте // Физиол. раст. – 1982. – 29. – С. 787–789.
2. Попов А. С. Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С. 150–162.
3. Стрибуль Т. Ф., Олейник С. Т., Новиков А. Н., Григорашенко А. И. Оптимизация метода криоконсервирования меристемы картофеля // Пробл. криобиологии. – 1999. – № 1. – С. 57–60.
4. Anderson J. Cryopreservation of apical meristems and cells of carnation // Cryobiology. – 1979. – № 16. – P. 583.
5. Bajaj Y. Technology and prospects of cryopreservation of germplasms // Euphytica. – 1981. – № 30. – P. 141.
6. Kartha K., Leung N., Gamborg O. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration // Plant Sci. Lett. – 1979. – № 15. – P. 7.
7. Seibert M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to –196 °C // Science. – 1976. – 191. – P. 1178.
8. Towill L. *Solanum tuberosum*: a model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species // Plant Sci. Lett. – 1981. – 20. – P. 315.

Поступила 21.12.99

$$Y = 0,625X_1 - 0,688X_3 - 0,219X_6 - \\ - 0,125X_1X_2 + 1,125X_1X_3 + 0,125X_1X_4 + \\ + 1,625X_1X_5 + 1,375X_1X_6 - 3,0X_1X_7 - 0,375X_1X_8 - \\ - 0,75X_2X_4 + 2,5X_2X_5 - 2,5X_2X_6 - 0,875X_2X_7 - \\ - 0,75X_2X_8 - 1,0X_3X_4 + 0,25X_3X_5 - 0,75X_3X_6 - \\ - 0,375X_3X_7 - 1,25X_3X_8 - 0,75X_4X_5 - 1,25X_4X_6 - \\ - 0,875X_4X_7 - 1,75X_4X_8 - 0,5X_5X_6 + 0,625X_5X_7 + \\ + 0,5X_5X_8 + 0,875X_6X_7 + 1,5X_6X_8 - 0,125X_7X_8.$$

Because of the complexity of the drawn equation, the applied method presupposes evaluation of the importance of coupled interactions to involve algebraic summing-up of the factors, which characterize the action of every factor and determination of the directivity of this action.

Analysis of the results obtained permitted to conclude on the following:

1. The content of DMFA in the medium should be increased from 5.5 up to 8%.
2. Application of the CB-133 wetting agent and silver iodide should be avoided, since their availability in the medium for freezing grape meristems resulted in the aggravation of the yield of cryopreservation.
3. Duration of the grape meristemic cells equilibration with cryoprotective medium is to be prolonged from 1 to 3 hours.
4. The value of pH of the medium should be reduced from 7 to 6.
5. The temperature of the cell preparation (equilibration with protective medium) should be increased up to 28 °C.
6. The mode of freezing is to be approached to program 3.
7. The temperature of thawing on bath is to be increased from 23 to 36 °C.

Thus, the results on viabilities of thawed meristems of the grape and potato testify to the applicability of the developed equipment and technologies of cryopreservation with the method of both slow and rapid freezing programs.

REFERENCES

1. Manzhulin A. V., Popov A. S., Butenko R. G. Harvesting of plants-regenerates out of the meristem *Solanum tuberosum* following their storage in liquid nitrogen // Fiziol. rast. – 1982. – 29. – P. 787–789.
2. Popov A. S. Cryogenic storage of plant cell cultures // Plant cell culture. – M.: Nauka publ., 1981. – P. 150–162.
3. Stribyl T. F., Oleynik S. T., Novikov A. N., Grigorashenko A. I. Optimization of the method of cryopreservation of the potato meristem // Probl. kriobiologii. – 1999. – № 1. – P. 57–60.
4. Anderson J. Cryopreservation of apical meristems and cells of carnation // Cryobiology. – 1979. – № 16. – P. 583.
5. Bajaj Y. Technology and prospects of cryopreservation of germplasms // Euphytica. – 1981. – № 30. – P. 141.
6. Kartha K., Leung N., Gamborg O. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration // Plant Sci. Lett. – 1979. – № 15. – P. 7.
7. Seibert M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to –196 °C // Science. – 1976. – 191. – P. 1178.
8. Towill L. *Solanum tuberosum*: a model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species // Plant Sci. Lett. – 1981. – 20. – P. 315.

Accepted in 21.12.99

Воздействие трансфузий криоконсервированных клеток эмбриональной печени на состояние коагуляционного и фибринолитического звеньев системы гемостаза при экспериментальном травматическом гемофтальме

Ю. А. ДЕМИН, Т. М. ШАРЛАЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of cryopreserved embryonic liver cells transfusion on the state of coagulation and fibrinolytic links of hemostasis system at experimental traumatic hemophthalmos

Yu. A. DEMIN, T. M. SHARLAY

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

Изучали эффективность лечения травматического гемофтальма трансфузиями препарата криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП). Для оценки эффективности лечения использовали показатели состояния коагуляционного звена гемостаза, определявшиеся методом электрокоагулографии, и фибринолитической активности крови. Показана высокая эффективность введения криоконсервированных КЭП для рассасывания внутриглазных кровоизлияний, что подтверждалось нормализацией коагуляционного звена гемостаза и активацией фибринолитической активности крови.

Вивчали ефективність лікування травматичного гемофтальму трансфузіями препарату криоконсервованих клітин ембріональної печінки (КЕП). Для оцінки ефективності лікування використовували показники стану коагуляційного кільця гемостазу, які визначали методом електрокоагулографії, і фібринолітичної активності крові. Показана висока ефективність введення криоконсервованих КЕП для розсмоктування внутрішньоочних кровоизливиїв, що підтверджувалось нормалізацією коагуляційного кільця гемостазу і активацією фібринолітичної активності крові.

The efficiency of traumatic hemophthalmos treatment by the transfusions of the preparation of cryopreserved embryonic liver cells (CELC) was studied. For estimating the treatment efficiency the indices of the state of coagulation link of hemostasis, determined by the method of electrocoagulography, and fibrinolytic activity of blood were used. A high efficiency of the introduction of CELC for the resorption of intraocular hemorrhages, that was confirmed by the normalization of coagulation link of hemostasis and the activation of fibrinolytic activity of blood.

Первоочередной задачей при лечении травматического гемофтальма является повышение фибринолитической активности в глазных оболочках и стекловидном теле на ранних стадиях травматического процесса для скорейшего рассасывания кровяного сгустка. С этой целью в офтальмологии для интравитреального введения используются различные естественные тромболитические препараты (фибринолизин, активаторы плазминогена, протеолитические ферменты). Все они, наряду с высокой эффективностью, имеют существенные недостатки, ограничивающие их применение [3]. Препарат фибринолизин обладает высокой антикоагулянтной активностью только в достаточно высоких дозировках, вызывающих рецидивы кровоизлияний, аллергические реакции и даже некротические изменения в глазных оболочках [3]. Подобную активность имеют активаторы плазминогена (стрептокиназа, урокиназа и т.п.). Клинический опыт показывает, что при местном введении тромболитиков малые разовые дозы малоэффективны, боль-

Primary task when treating the traumatic hemophthalmos is an increase of fibrinolytic activity in eye coat and vitreous body at early stages of traumatic process for the most rapid resorption of blood clot. In ophthalmology with this aim for intravitreal introduction the natural thrombolytical preparations (fibrinolysin, plasminogen activators, proteolytic enzymes) are used. All of them along with a high efficiency have significant short-comings, limiting their application [3]. Fibrinolysin preparation possesses a high anticoagulation activity only in a quite high doses, causing relapses of bleedings, allergic reactions and even necrotic changes in eye membranes [3]. Activators of plasminogen (streptokinase, urokinase etc.) have the similar activity. Clinical experience shows that during local introduction of thrombolytics the small single doses are slightly effective, higher ones cause unfavorable side effects and multiple introductions lead to an organism sensibilization and local allergic reactions (eyelid edema, iridocyclites etc.). Administration of thrombolytics into a general circulatory channel per-

шие вызывают нежелательные побочные реакции, а многократное введение — сенсibilизацию организма и местные аллергические реакции (отек век, иридоциклиты и т.д.). Введение тромболитиков в общее циркуляторное русло позволяет использовать большие разовые дозы, однако в этом случае их действие еще более непродолжительно. Кроме того, они с трудом проникают через гематоофтальмический барьер [3]. Поэтому актуальной задачей при лечении внутриглазных кровоизлияний остается поиск новых препаратов тромболитического действия.

В настоящее время наиболее перспективным препаратом тромболитического действия в офтальмологии являются КЭП, которые содержат большое количество моноклеарных макрофагов, проявляющих высокую ферментативную активность, в том числе в продукции активаторов плазминогена. Это позволяет травмированному глазу и организму использовать избирательно необходимые ферментативные компоненты на каждой стадии травматического процесса. Кроме того, криоконсервированные КЭП, полученные на ранних стадиях гестации, не имеют антигенных свойств и не могут вызывать алергизации организма [1].

Цель настоящего исследования — выявить эффективность воздействия трансфузий КЭП на состояние коагуляционного и фибринолитического звеньев гемостаза у кроликов с экспериментальным травматическим гемофтальмом.

Эксперименты были проведены на 12 кроликах породы Шиншилла весом 2,5–2,8 кг. Гемофтальм моделировали путем инъекции 0,3 мл крови, взятой из ушной вены кролика в стекловидное тело правого глаза. Через 2 ч после инъекции крови животным опытной группы (6 кроликов) внутривенно вводили по 1 мл криоконсервированных КЭП с одномоментным парабульбарным введением в правый глаз 0,5 мл [2]. Остальные 6 кроликов служили контрольной группой. После трансфузии криоконсервированных КЭП за животными проводили наблюдения в течение 14 сут; кровь для определения показателей гемостаза забирали из краевой ушной вены на 3-й, 7-й и 14-й сутки.

Состояние свертывающей системы крови у экспериментальных животных изучали методом электрокоагулографии [6]. Для оценки коагуляционного звена использовали следующие показатели (табл. 1):

T_1 — время от начала исследования до первого колебания с уменьшенной амплитудой, что относится к I и II фазам свертывания крови, т.е. образованию активного тромбопластина и тромбина;

T_2 — время от начала исследования до первого колебания с минимальной амплитудой, характеризующее общую продолжительность свертывания крови I, II, III фаз;

$T_3 = T_2 - T_1$ — продолжительность образования сгустка, т.е. III фаза свертывания крови;

mits to use a high single dose, but in this case their effect is less prolonged. Besides they hardly penetrate through hematoophthalmic barrier [3]. Therefore when treating intraocular bleedings the search for new preparations of thrombolytic effect remains an actual task.

Nowadays cryopreserved embryonic liver cells (CELC) are the most perspective preparations of thrombolytic effect in ophthalmology, which contain a big number of mononuclear macrophages, manifesting a high enzymic activity, including in the production of activators of plasminogen. This allows an eye and organism with trauma to selectively use necessary enzymic components at every stage of traumatic process. Besides CELC obtained at early gestation stage have no antigenic properties and are not able to cause an organism allergization [1].

The aim of this investigation is the revealing of the efficiency of CELC transfusion effect on the state of coagulation and fibrinolytic links of hemostasis in rabbits with experimental traumatic hemophthalmos.

Experiments were carried-out in 12 Chinchilla rabbits of 2.5–2.8 kg weight. Hemophthalmos was modelled by the injection of 0.3 ml of blood taken from rabbit's otic vein into a vitreous body of a right eye. In 2 hrs after the injection of blood the animals of experimental group (6 rabbits) were intravenously injected by 1 ml of CELC with one-moment parabulbar introduction into a right eye of 0.5 ml [2]. The rest 6 rabbits served as the control group. After transfusion of CELC the animals were monitored within 14 days, the blood for the determination of the indices of hemostasis was obtained from a marginal otic vein to the 3rd, 7th and 14th days.

The state of coagulating blood system in experimental animals was studied by means of the method of electrocoagulography [6]. To estimate the coagulation link the following indices were used in experimental animals (Table 1):

T_1 — the time from the start of investigation up to the first oscillation with a reduced amplitude, that refers to the 1st and 2nd phases of blood coagulation, i.e. the formation of active thromboplastine and thrombin;

T_2 — the time from the start of investigation up to the first oscillation with a minimum amplitude, characterising a total duration of blood coagulation — I, II, III phases;

$T_3 = T_2 - T_1$ — the duration of clot formation, that is the 3rd phase of blood coagulation;

A_m — the value of maximum amplitude; A_0 — the value of minimum amplitude; IC — index of coagulation ($T_2 \cdot A_0$).

A decrease in IC points to the tendency for hypercoagulation, an increase — to hypocoagulation.

To determine fibrinolytic activity of blood the described method [4, 5] was used. The index of fibrinolysis activity was total fibrinolytic activity of blood (TFA), including enzymic and non-enzymic links. Enzymic link is substantiated by the activity of plasmin

A_m — величина максимальной амплитуды; A_0 — величина минимальной амплитуды; ИК — индекс коагуляции ($T_2 \cdot A_0$). Уменьшение ИК указывает на тенденцию к гиперкоагуляции, увеличение — к гипокоагуляции.

Для определения фибринолитической активности крови применяли метод, описанный в [4, 5]. Показателем активности фибринолиза являлась суммарная фибринолитическая активность крови (СФА), включающая ферментативное и неферментативное звено. Ферментативное звено обусловлено активностью плазмина (фибринолизина), неферментативная фибринолитическая активность (НФА) — комплексами гепарина с белками и аминами крови.

Результаты проведенных экспериментов по изучению свертывающей системы у животных с гемофтальмом после воздействия трансфузий КЭП приведены в табл. 1. Данные показывают, что у животных контрольной группы на 3-и сутки после

(fibrinolysin), non-enzymic fibrinolytic activity (NFA) — by the complexes of heparin with proteins and amines of blood.

Results of conducted experiments on studying the coagulating system in the animals with hemophthalmos after the effect of CELC transfusion are given in the Table 1. The data show that animals of the control group to the third day after trauma a sharp increase of coagulating activity of blood was found, that was resulted from the reduction of all three stages of the process. So, the duration of the 1st and 2nd phases was reduced more than twice (45% of an initial level), the third phase was much shorter, 37.9% of an initial level. In the result of this the IC was twice less in comparison with the norm (41.2% of an initial level), that, evidently, testified to manifested hypercoagulational shift.

To the 7th day after trauma in the animals of the control group the similar picture was almost completely kept. Total IC was statistically and signifi-

Таблица 1

Table 1

Воздействие трансфузий КЭП на коагуляционное звено гемостаза при экспериментальном травматическом гемофтальме по показателям электрокоагулограммы

Effect of CELC transfusions on coagulational link of hemostasis under experimental traumatic hemophthalmos on the indices of electrocoagulagrams

Время наблюдения Observation time	Показатели Indices					
	T_1	T_2	T_3	A_m	A_0	ИК / IC
	мин / min			усл. ед. / relative units		
Травматический экспериментальный гемофтальм Traumatic experimental hemophthalmos (n = 6)						
Исходный уровень Initial level (n = 12)	4,0 ± 0,21	9,8 ± 0,36	5,8 ± 0,23	40 ± 0,01	1,0 ± 0,02	5,1 ± 0,19
3-и сутки, the 3rd day %	1,8 ± 0,29 ^{*,**} 45,0	4,0 ± 0,11 ^{*,**} 41,0	2,2 ± 0,37 ^{*,**} 37,9	42 ± 0,02 105,0	1,0 ± 0,01 100,0	2,1 ± 0,07 ^{*,**} 41,2
7-е сутки, the 7th day %	2,0 ± 0,09 ^{*,**} 50,0	4,67 ± 0,44 ^{*,**} 47,7	2,67 ± 0,75 ^{*,**} 46,0	42 ± 0,01 105,0	1,0 ± 0,01 100,0	3,34 ± 0,13 ^{*,**} 65,5
14-е сутки, the 14th day %	3,8 ± 0,16 [*] 98,0	9,2 ± 0,39 93,9	5,4 ± 0,19 93,0	38 ± 0,02 95,0	1,0 ± 0,01 100,0	4,78 ± 0,21 93,7
Травматический экспериментальный гемофтальм + лечение КЭП Traumatic experimental hemophthalmos + treatment by CELC (n = 6)						
Исходный уровень Initial level (n = 12)	—	—	—	—	—	—
3-и сутки, the 3rd day %	4,17 ± 0,11 104,3	7,83 ± 0,09 79,9	3,67 ± 0,14 [*] 63,4	37 ± 0,02 92,5	1,0 ± 0,01 100,0	4,08 ± 0,34 [*] 80,0
7-е сутки, the 7th day %	4,0 ± 0,07 100,0	12,0 ± 0,34 [*] 122,4	8,0 ± 0,73 137,9	42 ± 0,01 105,0	1,0 ± 0,01 100,0	6,24 ± 0,18 [*] 122,0
14-е сутки, the 14th day %	4,5 ± 0,14 112,5	10,1 ± 0,63 103,0	5,6 ± 0,21 96,6	40 ± 0,01 100,0	1,0 ± 0,01 100,0	5,25 ± 0,46 102,9

Примечания. * — различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня ($P < 0,05$); ** — различия достоверны по отношению к показателям группы подопытных животных ($P < 0,05$).

Notes: * — differences are significantly true in respect of the indices of an initial level ($P < 0.05$); ** — differences are significantly true in respect of the indices of the experimental animals' group ($P < 0.05$).

нанесения травмы отмечено резкое повышение свертывающей активности крови, причем за счет сокращения всех трех фаз процесса. Так, продолжительность I и II фаз сокращалась более, чем в 2 раза (45% от исходного уровня), III фаза была еще короче — 37,9% от исходного уровня. В результате этого ИК был в 2 раза меньше нормы (41,2% от исходного уровня), что, безусловно, свидетельствует о выраженном гиперкоагуляционном сдвиге.

На 7-е сутки после травмы у животных контрольной группы подобная картина сохранялась практически полностью. Суммарный ИК был достоверно меньше такового в норме (65,6% от исходного уровня). Однако можно отметить некоторую тенденцию к его повышению по сравнению с аналогичными показателями на 3-и сутки. Следовательно, у кроликов контрольной группы гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза сохранялся на протяжении всей недели после травмы.

Еще через неделю (14-е сутки) все показатели электрокоагулограммы нормализовались, в результате чего суммарный ИК практически достигал нормального уровня (93,7% от исходного). Отмеченная на 7-е сутки тенденция к ослаблению гиперкоагуляционного сдвига полностью реализовывалась только к концу 2-й недели.

Лечение кроликов с гемофтальмом препаратом криоконсервированных КЭП уже на 3-и сутки после травмы оказывало выраженное положительное воздействие на свертывающую систему крови — I и II фазы свертывания протекали с нормальной скоростью и только продолжительность III фазы была заметно сокращена (63,4% от исходного уровня). Суммарный ИК был несколько ниже нормы — 80%.

На 7-е сутки показатели электрокоагулограммы у подопытных животных почти соответствовали исходным. Следует отметить, что и в этот период отмечалась нестабильность III фазы (фазы свертывания), однако наблюдался сдвиг в сторону гипокоагуляции — показатель T_3 превышал исходные значения на 37,9%, что вносило свой вклад в повышение суммарного ИК (122% от исходного уровня).

На 14-е сутки наблюдений все показатели электрокоагулограммы у подопытных животных полностью соответствовали норме.

Таким образом, системная гиперкоагуляционная реакция организма на травму у животных с гемофтальмом исчезала полностью к 14-м суткам. У животных с гемофтальмом, получавших трансфузии КЭП, подобная реакция исчезала уже к 7-м суткам.

Данные о состоянии фибринолитической активности крови при экспериментальном гемофтальме и его лечении трансфузиями КЭП представлены в табл. 2.

У животных с экспериментальным гемофтальмом на 3-и сутки после травмы показатели как суммарной, так и неферментативной фибринолитической активности снижены в среднем на 40% по

существенно меньше, чем в норме (65,6% от исходного уровня). Однако можно отметить некоторую тенденцию к его повышению по сравнению с аналогичными показателями на 3-и сутки. Следовательно, у кроликов контрольной группы гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза сохранялся на протяжении всей недели после травмы.

В течение недели (14-й день) все показатели электрокоагулограммы нормализовались, в результате чего суммарный ИК практически достигал нормального уровня (93,7% от исходного). Отмеченная на 7-е сутки тенденция к ослаблению гиперкоагуляционного сдвига полностью реализовывалась только к концу 2-й недели.

Лечение кроликов с гемофтальмом препаратом криоконсервированных КЭП уже на 3-и сутки после травмы оказывало выраженное положительное воздействие на свертывающую систему крови — I и II фазы свертывания протекали с нормальной скоростью и только продолжительность III фазы была заметно сокращена (63,4% от исходного уровня). Суммарный ИК был несколько ниже нормы — 80%.

На 7-е сутки показатели электрокоагулограммы у подопытных животных почти соответствовали исходным. Следует отметить, что и в этот период отмечалась нестабильность III фазы (фазы свертывания), однако наблюдался сдвиг в сторону гипокоагуляции — показатель T_3 превышал исходные значения на 37,9%, что вносило свой вклад в повышение суммарного ИК (122% от исходного уровня). На 14-й день наблюдений все показатели электрокоагулограммы у подопытных животных полностью соответствовали норме.

Таким образом, системная гиперкоагуляционная реакция организма на травму у животных с гемофтальмом исчезала полностью к 14-м суткам. У животных с гемофтальмом, получавших трансфузии КЭП, подобная реакция исчезала уже к 7-м суткам.

Данные о состоянии фибринолитической активности крови при экспериментальном гемофтальме и его лечении трансфузиями КЭП представлены в табл. 2.

У животных с экспериментальным гемофтальмом на 3-й день после травмы показатели как суммарной, так и неферментативной фибринолитической активности снижены в среднем на 40% по сравнению с нормой (65,6% от исходного уровня). Однако можно отметить некоторую тенденцию к его повышению по сравнению с аналогичными показателями на 3-й день. Следовательно, у кроликов контрольной группы гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза сохранялся на протяжении всей недели после травмы.

В течение недели (14-й день) все показатели электрокоагулограммы нормализовались, в результате чего суммарный ИК практически достигал нормального уровня (93,7% от исходного). Отмеченная на 7-й день тенденция к ослаблению гиперкоагуляционного сдвига полностью реализовывалась только к концу 2-й недели.

сравнению с исходными, что свидетельствует об угнетении противосвертывающей активности. Это препятствует активному рассасыванию локального кровоизлияния в травмированном глазу в ранний период его заживления. На 7-е сутки наблюдений показатели фибринолитической активности несколько повышались (77–72% от исходного уровня, $P < 0,05$), однако полной активности процесса еще не отмечалось. К 14-м суткам после травмы активность системного фибринолиза полностью восстанавливалась.

В группе животных с гемофтальмом, получавших трансфузию КЭП, на 3-и сутки после травмы фибринолитическая активность крови несколько угнетена, о чем свидетельствовали показатели как суммарной, так и неферментативной фибринолитической активности (79 и 74% от исходного уровня соответственно). Однако следует отметить, что уже в данный ранний период эти значения на 15–18% выше аналогичных в контрольной группе животных ($P < 0,05$).

На 7-е сутки после травмы и лечебных трансфузий у животных данной группы наблюдались восстановление активности неферментативного звена фибринолиза и активация (на 28% выше исходных значений) суммарной фибринолитической активности. Это свидетельствует об активации именно ферментативного звена фибринолиза через неделю после травмы.

На 14-е сутки у животных, которых лечили КЭП, наблюдалась полная нормализация всех изученных звеньев противосвертывающей системы.

Следует отметить, что зафиксированные на 7-е сутки небольшой гипокоагуляционный сдвиг и повышение активности фибринолиза, очевидно, адекватны клинической ситуации, не являются чрезмерными и не угрожают повторными кровоизлияниями, что подтверждают как клинические наблюдения, так и полная нормализация системы гемостаза у животных после лечения КЭП (к 14-м суткам).

Полученные в работе данные и лабораторные показатели состояния системы гемостаза свидетельствуют о несомненном фибринолитическом действии препарата из КЭП. При этом источником активации фибринолиза могут быть различные

Таблица 2

Воздействие трансфузий КЭП на показатели фибринолитической активности крови при экспериментальном травматическом гемофтальме

Effect of CELC transfusion on the indices of fibrinolytic activity of blood under experimental traumatic hemophthalmos

Время наблюдения Observation time	Травматический экспериментальный гемофтальм Traumatic experimental hemophthalmos (n = 6)		Травматический экспериментальный гемофтальм + лечение КЭП Traumatic experimental hemophthalmos + treatment by CELC (n = 6)	
	СФА TFA	НФА NEA	СФА TFA	НФА NEA
	усл. ед. / relative units			
Исходный уровень Initial level (n = 12)	38,2 ± 0,7	18,8 ± 1,13	—	—
3-и сутки; the 3rd day %	23,4 ± 1,36* ^{**} 61,3	11,2 ± 0,84* ^{**} 59,6	30,3 ± 0,48* 79,3	14,0 ± 0,33* 75,5
7-е сутки; the 7th day %	29,4 ± 1,17* ^{**} 77,0	13,6 ± 0,28* ^{**} 72,3	49,8 ± 1,46* 128,3	16,8 ± 1,26 89,4
14-е сутки; the 14th day %	36,1 ± 1,25* ^{**} 94,5	18,6 ± 2,11 100,0	41,7 ± 0,19 109,1	19,9 ± 1,18 105,0

Примечания. * — различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня ($P < 0,05$); ** — различия достоверны по отношению к показателям группы подопытных животных ($P < 0,05$).

Notes: * — differences are significantly true in respect of the indices of an initial level ($P < 0.05$); ** — differences are significantly true in respect of the indices of the experimental animals' group ($P < 0.05$); TFA — total fibrinolytic activity; NEA — non-enzymic activity.

it should be noted that even in this early period these values by 15–18% were higher analogous ones in the control group of animals ($P < 0.05$).

To the 7th day after trauma and treating transfusions in animals of this group a recovery of non-enzymic link of fibrinolysis and activation (by 28% higher of initial values) of total fibrinolytic activity were noted. This testifies to the activation namely of fibrinolysis enzymic link, in a week after trauma.

To the 14th day in the animals treated with CELC a complete normalization of all studied links of anti-coagulating system was observed.

It should be noted that recorded to the 7th day slight hypercoagulational shift and an increase in the activity of fibrinolysis evidently are adequate to clinical situation are not excessive and do not threaten with repeated observations and a complete normalization of hemostasis system in animals after treatment with CELC (to the 14th day).

Obtained in the work data and laboratory indices of the state of hemostasis system testify to an evident fibrinolytic effect of the CELC preparation. In this case as the source of fibrinolysis activation various CELC can serve. It is known that liver is main hemopoietic organ of embryogenesis period of mammals [1]. Certain stem cells serve as progenitors of liver Kupffer cells (mononuclear phagocytes), which appear in developing liver even before bone marrow formation [1]. Kupffer cells being tissue macrophages,

КЭП. Известно, что печень является главным гемопоэтическим органом периода эмбриогенеза у млекопитающих [1]. Определенные стволовые клетки служат предшественниками купферовских клеток печени (моноклеарных фагоцитов), которые появляются в развивающейся печени еще до формирования костного мозга [1]. Купферовские клетки, являясь тканевыми макрофагами, содержат богатый ферментативный аппарат, в том числе большое количество активаторов плазминогена [8]. Эти вещества, очевидно, активируют фибринолиз при введении КЭП и способствуют быстрому рассасыванию травматического гемофтальма.

При травматическом гемофтальме защитно-компенсаторные механизмы организма недостаточно сильны для самостоятельного лизиса интравитреальных геморрагий, так как стекловидное тело обладает очень низкой фибринолитической и значительной фибринстабилизирующей активностью [3, 7].

На этом фоне трансфузии КЭП являются в известном смысле "заместительной" терапией, так как содержат большое количество клеток со всем аппаратом антикоагулянтных факторов различной природы как ферментативных (активаторы плазминогена), так и неферментативных (гепарин). Применение препарата из КЭП не только ускоряло рассасывание глазного кровоизлияния у подопытных животных, но и способствовало полному исчезновению фибриновых волокон в пораженном участке.

Таким образом, трансфузии КЭП вызывают восстановление и необходимую степень активации системного фибринолиза у животных с экспериментальным гемофтальмом, что способствует активному и полному рассасыванию травматического кровоизлияния и может быть использовано для направленного лечения глазных кровоизлияний различной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцимович Н. Г., Настоящая Н. Н., Казанский Д. Б., Ломакин М. С. Печень как орган иммунобиологической системы гомеостаза // Успехи современной биологии. — 1992. — 112, № 1. — С. 88–99.
2. Грищенко В. І., Снурніков О. С., Дьомін Ю. А. та ін. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування ембріональних і фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці: Метод. рекомендації. — Харків, 2000. — 15 с.
3. Гундорова Р. А., Малаев А. А., Южаков А. М. Травмы глаза. — М.: Медицина, 1986. — 364 с.
4. Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. — М.: Медицина, 1975. — 488 с.
5. Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А. Способ определения суммарной и неферментативной фибринолитической активности в крови // Лаб. дело. — 1978. — № 10. — С. 587–588.
6. Лабораторные методы исследования в клинике (Справочник) / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 161–162.
7. Ромашенко А. Д., Гундорова Р. А., Скипетров В. К. Механизм действия фибринолизина и обоснование целесообразности его применения при травматическом гемофтальме // Офтальмолог. журн. — 1980. — № 1. — С. 46–48.
8. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. — М.: Медицина, 1984. — С. 38–46.

Поступила 26.09.2000

contain enzyme-rich apparatus, including a big number of plasminogen activators [8]. These substances apparently activate fibrinolysis during CELC introduction and contribute to a rapid resorption of traumatic hemophthalmos.

Under traumatic hemophthalmos protective and compensatory mechanisms of an organism are not quite strong for independent lysis of intravitreal hemorrhages, since vitreous body possesses a very low fibrinolytic and significant fibrin-stabilizing activity [3, 7].

On this background the transfusions of CELC act as a "substitutive therapy", since they contain a large number of the cells with the whole apparatus of anticoagulant factors of various origin of both enzymic (activators of plasmogen) and non-enzymic (heparin). Application of the preparation from CELC not only accelerated the resorption of ocular hemorrhage in experimental animals, but also contributed to a complete disappearance of fibrinous fibers in a damaged site.

Thus CELC transfusions cause a recovery and necessary degree of activation of systemic fibrinolysis in animals with experimental hemophthalmos, that contributes to an active and complete resorption of traumatic hemorrhage and can be used for directed treatment of ocular hemorrhages of different etiology.

REFERENCES

1. Artsimovich N. G., Nastoyaschaya N. N., Kazansky D. B., Lomakin M. S. Liver as an organ of immune biological system of homeostasis // *Uspekhi sovremennoy biologii.* — 1992. — 112, № 1. — P. 88–99.
2. Grisichenko V. I., Snurnikov A. S., Demin Yu. A. et al. procurement, cryopreservation and clinical application of human embryonic and fetal cells in ophthalmology: Method. recommendations. — Kharkov, 2000. — 15 p.
3. Gundorova R. A., Malayev A. A., Yuzhakov A. M. Eye traumas. — M: Meditsina, 1986. — 364 p.
4. Kudryashov B. A. Biological problems of the regulation of blood liquid state and its coagulation. — M: Meditsina, 1975. — 488 p.
5. Kudrashov B. A., Lyapina L. A. The way for determination of total and non-enzymic fibrinolytic activity of blood // *Lab. delo.* — 1978. — № 10. — P. 587–588.
6. Laboratory methods of investigation in clinic (Reference book) / Ed. by V. V. Menshikova. — M: Meditsina, 1987. — P. 161–162.
7. Romaschenko A. D., Gundorova R. A., Skipetrov V. K. Mechanism of fibrinolysin effect and substantiation of its application under traumatic hemophthalmos // *Ophthalmol. zhurnal.* — 1980. — № 1. — P. 46–48.
8. Serov V. V., Shekhter A. B. Connective tissue. — M: Meditsina, 1984. — P. 38–46.

Accepted in 26.09.2000

Механизмы иммунологического действия фетальных препаратов при экспериментальном воспалительном процессе

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

Mechanisms of Immunologic Action of Fetal Preparations During Experimental Inflammatory Process

V. A. PITKO

Kharkov State Medical university

Нормализация массы тимуса и селезенки при введении криоконсервированного экстракта хориона (КХ) и экстракта плаценты (ЭП) свидетельствует о их положительном влиянии на воспалительный процесс. Одним из возможных механизмов реализации протекторного действия препаратов при воспалительном процессе является восстановление в клетках уровня цАМФ.

Нормалізація маси тимуса і селезінки при уведенні криоконсервованого екстракту хоріона (КХ) і екстракту плаценти (ЕП) свідчить про їх позитивний вплив на запальний процес. Одним з можливих механізмів реалізації протекторної дії препаратів при запальному процесі є відновлення в клітинах рівня цАМФ.

Normalization of thymus and spleen mass when introducing cryopreserved chorion extract (CC) and placental extract preparation (PE) testifies to a positive effect on inflammatory process. Recovery of cAMP level in cells is one of the possible mechanisms of realizing the protective action of preparat during inflammation.

При поиске новых путей лечения заболеваний пациентов с воспалительными процессами исследователи обратили внимание на уникальные свойства фетальных клеток и тканей человека [3]. Содержание в них стадиоспецифических белков и пептидов, стимулирующих иммунокомпетентные клетки [5], а также антиоксидантов и перехватчиков активных форм кислорода, адаптогенов определило их место как перспективных естественных биопрепаратов для лечения трудноизлечимых заболеваний.

Цель работы — сравнительное изучение механизмов реализации иммунологического действия препаратов ЭП и КХ при экспериментальном воспалительном процессе.

Опыты проведены на 40 молодых крысах-самцах линии Вистар массой 110–120 г (возраст 50–60 дней). Всего было сформировано 4 группы животных: с экспериментальным воспалением (В); животные, которых лечили с использованием КХ и ЭП; контрольные (К). Моделью воспаления служил острый асептический перитонит, вызываемый внутрибрюшинным введением 5 мг λ -каррагинена (Sigma, США) в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия [1]. Животных забивали под наркозом декапитацией на 3-и сутки модельного эксперимента, когда изменения были наиболее выражены [3].

Для лечения экспериментального воспалительного процесса использовали известный фармаколо-

While searching for new methods of treatment of patients with inflammatory processes the researchers paid attention to unique properties of fetal cells and tissues of man [3]. The content of stage-specific proteins and peptides, stimulating immune-competent cells [5], and antioxidants and interceptors of active forms of oxygen, adaptogenes, etc. in them defined their role as promising natural biopreparations, applicable for treatment of some difficult to cure diseases.

The aim of the research was to conduct a comparative study of the mechanisms of realization of immunological action of the placental extract preparation (PE) and cryopreserved chorion extract (CC) during experimental inflammatory process.

The experiments were done with 40 young male Wistar rats with the body weights of 110–120 g, aged 50–60 days. The animals were distributed into 4 groups: with experimental inflammation (I); animals treated with CC and PE; control animals (C). The acute aseptic peritonitis served as the model of inflammation, induced by intraperitoneal injection of 5 mg of λ -caragenine (Sigma, USA) in 1 ml of isotonic solution of sodium chloride [1]. The animals were anaesthetized and decapitated by the 3rd day of the model experiment, when the changes became the most pronounced [3].

A well-known pharmacological preparation of PE and a new biopreparation of CC, synthesized at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences on the basis

гический препарат ЭП и новый биопрепарат КХ, полученный в ИПКиК НАНУ на основе фетального сырья [6]. Препараты вводили внутримышечно в дозе 1,0 мл. Введение препаратов осуществляли сразу после моделирования воспаления. Контрольным животным вместо тканевых биопрепаратов вводили 1,0 мл физиологического раствора.

Модель комплексных исследований на одной группе животных включала методы, позволяющие изучить параметры иммунитета: 1) весовые показатели лимфоидных органов; 2) содержание циклического АМФ (цАМФ) в перитонеальных макрофагах крыс во время фагоцитоза частиц зимозана как показателя синтеза протагландин ПГЕ₁. Количество цАМФ определяли при помощи изотопных наборов (H³-Cyclic с АМФ-kit) радиоиммунологическим методом.

Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований проводилась параметрическим методом с использованием критерия Стьюдента на ПЭВМ IBM AT 486.

В табл. 1 представлен вес тела и лимфоидных органов (тимуса и селезенки) крыс контрольной группы ($n = 5$), получивших инъекцию физиологического раствора, и крыс, инъецированных каррагиненом ($n = 15$). Из 15 крыс 5 — не получали лечение, 5 — лечили КХ и 5 — ЭП. У животных с воспалением уменьшался вес тела и лимфоидных органов. При лечении крыс с использованием КХ вес тимуса увеличивался на 64,5%, а при лечении ЭП — на 36,1%. Вес селезенки у крыс также увеличивался на 39,6 и 9,6% после лечения КХ и ЭП соответственно (рисунок).

Таблица 1

Влияние тканевых препаратов КХ и ЭП на весовые показатели и клеточный состав тимуса и селезенки крыс с каррагиненовым воспалением, $n = 5$

Номер группы	Группы животных	Масса тела, г	Весовые показатели, г	
			тимуса	селезенки
1	В	103,38 ± 10,46	0,310 ± 0,024	0,341 ± 0,038
2	В + КХ	113,33 ± 10,63	0,510 ± 0,059*	0,476 ± 0,067
3	В + ЭП	104,41 ± 11,22	0,422 ± 0,048	0,374 ± 0,054
4	К	117,9 ± 11,84	0,405 ± 0,047	0,420 ± 0,041

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с группой 1 (В).

Биопрепараты из фетальных тканей реализуют свое действие на клетки иммунной системы, используя привычный, легко включаемый механизм. Гонадотропины, образуемые фетоплацентарным комплексом, проявляют свое действие после специфического связывания с рецепторами клетки-мишени и активации аденилатциклазы внутренней поверхности клеточной мембраны, которая катализирует превращение АТФ в цАМФ. Далее цАМФ поступает в ядро и стимулирует ядерные протеинкиназы [8]. В механизме развития воспаления ак-

of the fetal materials, were applied for treatment of the experimental inflammatory process [6]. The preparations were injected intramuscularly at a dose of 1.0 ml after modelling of the inflammation. Control animals experienced injection of 1.0 ml of physiological saline instead of tissue biopreparations.

The model of complex research with a single group of animals involved methods, which permit to investigate the parameters of the immunity: 1) weights of lymphoid organs; 2) content of cyclic AMP (cAMP) in peritoneal macrophages of rats during phagocytosis of the zymosan particles as a feature of the prostaglandin synthesis (PGE₁) [8].

A number of cAMP was determined using isotop sets (H³-Cyclic with AMP-kit) of Amersham firm production by radioimmunological method.

The results of the experimental research were statistically processed with a parametric method using a Student's criterion with a PC IBM AT 486.

Table 1 shows the values of the body weight and weight of lymphoid organs (thymus and spleen) of rats of the control group ($n = 5$), which were injected with physiological saline, and of rats, injected with caragenine ($n = 15$). Out of 15 rats 5 animals were not treated, another 5 were treated with PE, and the last 5 animals were exposed to CC. In the inflamed animals the body and lymphoid organs weights were reduced.

Table 1

Action of tissue preparations of CC and PE on weights and cell composition of the thymus and spleen of rats with caragenine inflammation ($n = 5$)

Group No	Group of animals	Body weight, g	Weight indices, g	
			of thymus	of spleen
1	I	103.38 ± 10.46	0.310 ± 0.024	0.341 ± 0.038
2	I + CC	113.33 ± 10.63	0.510 ± 0.059*	0.476 ± 0.067
3	I + PE	104.41 ± 11.22	0.422 ± 0.048	0.374 ± 0.054
4	C	117.9 ± 11.84	0.405 ± 0.047	0.420 ± 0.041

Note: * — $p < 0.05$ as compared with group 1 (I).

Biopreparations out of the fetal tissues realize their action on the cells of the immune system via an ordinary, easily triggered mechanism. Gonadotropins, formed by a fetoplacental complex, manifest their action after specific binding with receptors of the cell-target and following activation of adenylate cyclase of the cell membrane inner surface, which catalyses transformation of ATP into cAMP. Then cAMP goes into the nucleus, where it stimulates nucleated protein kinases [8]. Prostaglandins (PGE₁ and PGE₂) play an active part in the mechanism of the inflammation development. In leukocytes and macrophages they actively stimulate adenylate cyclase. An increased and prolonged formation of cAMP and synthesis of PGE₁ are identified during phagocytosis in peritoneal macrophages, which is inhibited by indometacine — a powerful inhibitor of prostaglandin synthesis [8]. Caragenine was shown to be reagent, which injures macrophages. It results in a rapid reduction in the

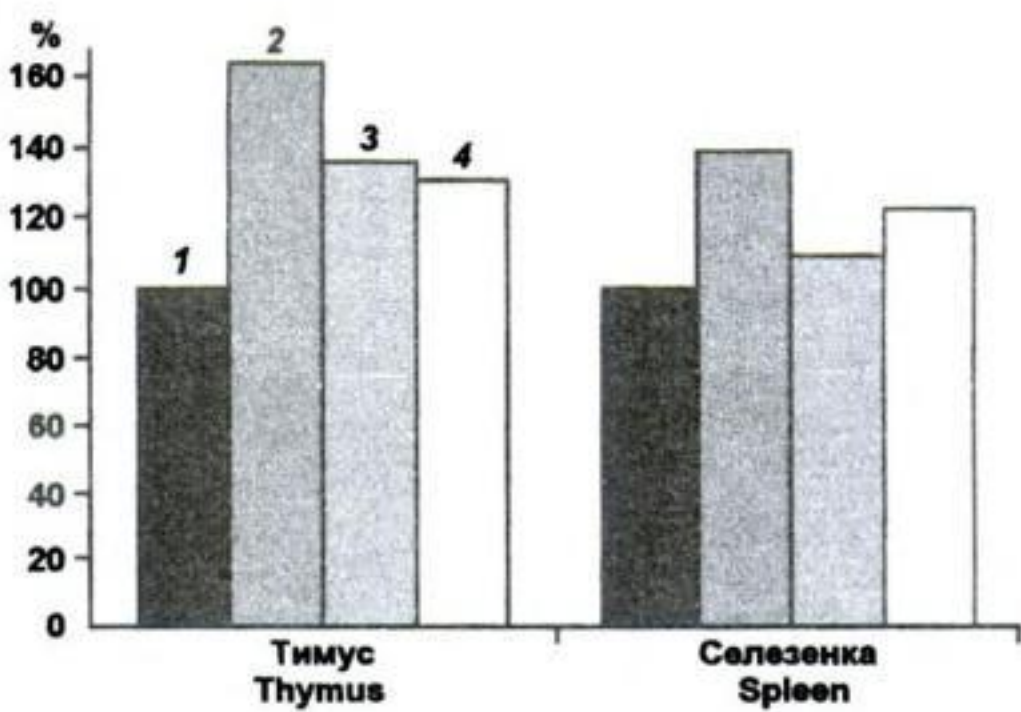
тивную роль играют простагландины PGE_1 и PGE_2 . В лейкоцитах и макрофагах они являются активными стимуляторами аденилатциклазы. Во время фагоцитоза в перитонеальных макрофагах индуцируется синтез PGE_1 , а также обнаруживается повышенное и пролонгированное образование цАМФ, подавляемое индометацином — мощным ингибитором синтетазы простагландинов [8]. Показано, что реагентом, повреждающим макрофаги, является каррагинен. Он вызывает резкое снижение образования цАМФ в макрофагах при действии высоких доз PGE_1 [8]. Это свидетельствует о том, что каррагинен нарушает мембраны клеток, делая их нечувствительными к таким экзогенным сигналам, как простагландины. Мы предположили, что тканевые препараты могут также действовать через цАМФ.

Было исследовано образование цАМФ перитонеальными макрофагами крыс разных групп на 3-и сутки каррагиненового воспаления (табл. 2). Наши данные показывают, что в перитонеальных макрофагах крыс с этим воспалением нарушено образование цАМФ. Такого нарушения не выявляли в макрофагах крыс, которых лечили КХ или ЭП. На основании данных [8] можно предполагать, что образование цАМФ во время фагоцитоза обусловлено синтезом PGE_1 . Это подтверждается как блокирующим эффектом индометацина, так и увеличением содержания PGE_1 в инкубационной среде во время фагоцитоза. Можно предполагать, что увеличение количества PGE_1 и повышенная чувствительность к нему являются главными компонентами механизма обратной связи, который функционирует при воспалительных реакциях. Потеря чувствительности клеток к PGE_1 в сочетании с массивным освобождением PGE_1 , которое отмечается, например, при обработке каррагиненом, может вызвать нерегулируемую и неблагоприятную воспалительную реакцию.

Таблица 2
Влияние КХ и ЭП на образование цАМФ в перитонеальных макрофагах, фагоцитирующих частицы зимозана, у крыс с каррагиненовым воспалением (n = 5)

Номер группы	Группы животных	пМ цАМФ на $10 \cdot 10^6$ макрофагов *
1	В	$18,71 \pm 1,53^1$
2	В + КХ	$146,44 \pm 12,92^{1,2,3}$
3	В + ЭП	$128,34 \pm 9,73^{1,2}$
4	К	$85,73 \pm 5,21^2$

Примечания: * Измерение проводили после 10 мин инкубации при соотношении частиц зимозана и клеток 20:1; ¹ — $p < 0,05$ при сравнении с группой 4 (К); ² — $p_1 < 0,05$ при сравнении с группой 1 (В); ³ — $p_2 < 0,05$ при сравнении групп 2 (КХ) и 3 (ЭП).



Восстановление веса лимфоидных органов (тимуса, селезенки) крыс с каррагиненовым воспалением после лечения тканевыми фетальными препаратами КХ и ЭП: 1 — В; 2 — В + КХ; 3 — В + ЭП; 4 — К. За 100% принят вес органов крыс с воспалением.

Recovery of weights of lymphoid organs (thymus, spleen) in the carrageenin-inflamed rats following treatment with fetal preparations CC and PE: 1 — I; 2 — I + CC; 3 — I + PE; 4 — C. Weight of the organs of the inflamed rats is accepted as 100%.

formation of cAMP in macrophages under the action of high doses of PGE_1 [8]. This is indicative of the fact that caragenine breaks the membranes of cells, making them insensitive to such exogenous signals as prostaglandins. The author supposed that tissue preparations may also exercise their influence via cAMP.

Formation of cAMP by peritoneal macrophages of rats from different groups by the 3rd day of the carrageenin inflammation was investigated (Table 2). The data obtained demonstrate that in the peritoneal macrophages of rats with this inflammation the formation of cAMP is impaired. Such an impairment was not revealed in the macrophages of the rats, which were treated with CC and PE. Elsewhere it was assumed [8] that formation of cAMP during phagocytosis is due to the synthesis of PGE_1 . This is supported both by a blocking effect of indometacin and a rise in the content of PGE_1 in the incubation medium, where it is released by macrophages during phagocytosis. It may be concluded that an increase in the amount of PGE_1 and heightened susceptibility to it are the basic

Table 2
Action of CC and PE on the formation of cAMP in peritoneal macrophages, phagocytosing zymosan particles, in the rats with carrageenin inflammation (n = 5)

Group No	Groups of animals	pM cAMP per $10 \cdot 10^6$ macrophages *
1	I	18.71 ± 1.53^1
2	I + CC	$146.44 \pm 12.92^{1,2,3}$
3	I + PE	$128.34 \pm 9.73^{1,2}$
4	C	85.73 ± 5.21^2

Notes: * the measurement was done after 10-min incubation with the ratio of zymosan particles to the cells of 20:1; ¹ — $p < 0.05$ as compared with group 4 (C); ² — $p_1 < 0.05$ as compared with group 1 (I); ³ — $p_2 < 0.05$ as compared with groups 2 (CC) and 3 (PE).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что восстановление в клетках образования цАМФ под влиянием тканевых препаратов — один из возможных механизмов реализации их протекторного действия при воспалительном процессе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров П. Н., Сперанская Т. В. Динамика каррагиненового воспаления в условиях введения оксibuтирата лития // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1988.— 106.— С. 233–235.
2. Дегтяренко Т. Е., Макулькин Р. Ф. Биогенные стимуляторы и иммунореактивность. Т. 2.— Одесса: Маяк, 1997.— 197 с.
3. Клименко М. О., Субота Н. П., Питько В. А., Татарко С. В. Вплив кріоекстракту хоріона на клітинні реакції вогнища запалення // Фізіол. журн.— 1999.— 45, № 6.— С. 75–80.
4. Лимфоциты. Методы / Под ред. Д. Клауса.— М.: Мир, 1990.— С. 393.
5. Репин В. С., Сухих Г. Т. Медицинская клеточная биология.— М., 1998.— 200 с.
6. Суббота Н. П., Грищенко В. И., Питько В. А. и др. Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.— Харьков, 1997.— 8 с.
7. Ширшев С. В. Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биол.— 1993.— 2.— С. 230–246.
8. Gemsa D., Seitz M., Kramer W. et al. The effects of phagocytosis, dextran sulfate and cell damage on PGE₁ sensitivity and PGE₁ production of macrophages // J. Immunol.— 1978.— 120, № 4.— P. 1187–1194.

Поступила 05.10.2000

components of the mechanism of reverse feedback, which functions during the inflammatory reactions. A loss of susceptibility of the cells to PGE₁, combined with massive release of PGE₁, which is observed during treatment with caragenine, may trigger unregulated and unfavorable response.

The data obtained testify to the fact that recovery of the cAMP formation in the cells under the action of tissue preparations is one of the possible mechanisms of realizing their protective action during inflammation.

REFERENCES

1. Alexandrov P. N., Speranskaya T. V. Dynamics of caragenine inflammation during injection of lithium oxybutyrate // Bull. eksperim. biol. i med.— 1988.— 106.— P. 233–235.
2. Degtyarenko T. E., Makulkin R. F. Biogenic stimulators and immune reactivity. Vol. 2.— Odessa: Mayak publ., 1977.— 197 p.
3. Klimenko M. O., Subota N. P., Pitko V. A., Tatarko S. V. Action of chorion cryoextract on cell responses in the focus of inflammation // Fiziol. zhurn.— 1999.— 45, № 6.— P. 75–80.
4. Lymphocytes. Methods / Ed. by D. Klaus.— M.: Mir publ., 1990.— P. 393.
5. Repin V. S., Sukhikh G. T. Medical cell biology.— M., 1998.— 200 p.
6. Subbota N. P., Grisichenko V. I., Pitko V. A. et al. Harvesting, storage and application of fragments, suspensions and chorion cryoextract: Method. recommend. — Kharkov, 1997.— 8 p.
7. Shirshov S. V. Proteins of fetoplacental complex in the regulation of immune responses // Uspekhi sovr. biol.— 1993.— 2.— P. 230–246.
8. Gemsa D., Seitz M., Kramer W. et al. The effects of phagocytosis, dextran sulfate and cell damage on PGE₁ sensitivity and PGE₁ production of macrophages // J. Immunol.— 1978.— 120, № 4.— P. 1187–1194.

Accepted in 05.10.2000

Влияние криоконсервированных фетальных препаратов и сроков их хранения на биохимические процессы при ОПН

П. П. ПАШИНСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreserved Fetal Preparations and Their Storage Terms on Biochemical Processes at Acute Liver Insufficiency

P. P. PASHINSKY

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

В сравнительном аспекте исследовано влияние криоконсервированных препаратов (гомогената, изолированных гепатоцитов, тотального криоэкстракта плода, криоэкстракта печени, общей цитозольной фракции или отдельных белоксодержащих фракций), полученных из плодов человека разных сроков внутриутробного развития (10 и 24 недель гестации), на метаболические свойства гепатоцитов по данным биохимических параметров плазмы крови и печени при острой печеночной недостаточности (ОПН), развившейся вследствие отравления животных CCl_4 . Показано, что препараты, полученные из фетальной печени человека 10 недель гестации, ускоряют восстановительные процессы в печени реципиента при экспериментальной ОПН, а эффективность их зависит от срока введения препарата, но не длительности низкотемпературного хранения.

У порівняльному аспекті досліджено вплив криоконсервованих препаратів (гомогенату, ізольованих гепатоцитів, тотального криоекстракту плоду, криоекстракту печінки, загальної цитозольної фракції або окремих фракцій, які містять білок), отриманих із плодів людини різних термінів внутрішньоутробного розвитку (10 і 24 тижнів гестації), на метаболічні властивості гепатоцитів за даними біохімічних параметрів плазми крові і печінки при гострій печінковій недостатності (ГПН), яка розвинулась внаслідок отруєння тварин CCl_4 . Показано, що препарати, отримані з фетальної печінки людини 10 тижнів гестації, прискорюють відновні процеси в печінці реципієнта при експериментальній ГПН, а ефективність їх залежить від терміну введення препарату, але не тривалості низькотемпературного зберігання.

The effect of cryopreserved preparations (homogenate, isolated hepatocytes, total fetal cryoextract, liver cryoextract, total cytosol fraction, several protein-containing fractions), obtained from human fetuses of different terms of intrauterine development (10 and 24 gestation weeks), on metabolic characteristics of hepatocytes according to the data of biochemical parameters of blood plasm and liver at an acute liver insufficiency (ALI, developed in the result of animals poisoning by CCl_4) was investigated in a comparative aspect. It was shown, that the preparations, obtained from a human fetal liver of 10 gestation weeks accelerated recovering processes in a recipient's liver under experimental ALI, their efficiency depended on the term of preparation injection, but not on the duration of low-temperature storage.

Положительный эффект, достигаемый при использовании фетальной печени и её препаратов в комплексном лечении ОПН различной этиологии, побуждает исследователей к изучению общего механизма действия и влияния факторов суммарного "активного начала".

Цель работы — сравнительное изучение влияния криоконсервированных препаратов, полученных из печени плодов человека разных сроков внутриутробного развития, на метаболические свойства гепатоцитов по данным биохимических параметров плазмы крови и печени при экспериментальной ОПН, развившейся вследствие отравления животных CCl_4 .

В работе использованы белые беспородные крысы весом 200–250 г. Фетальные криоконсервированные препараты получали, как описано в [2], и вводили животным внутрибрюшинно [10]. Биохимические параметры крови и печени контролировали общепринятыми методами [3, 5–9]. Гепатоциты вводили в концентрации $2 \cdot 10^6$ жизнеспособных

Positive effect, achieved when using fetal liver and its preparations in the ALI complex treatment of various etiology, encourages the researchers to investigate a general action mechanism and the effect of the factors of a complex "active onset".

The aim of the work is a comparative study of the effect of cryopreserved preparations, obtained from human fetal liver of different terms of intrauterine development, on hepatocytes metabolic characteristics according to the data of blood plasm and liver biochemical parameters under experimental ALI, developed in the result of the animals' poisoning by CCl_4 .

200–250 g white mongrel rats were used in the work. Fetal cryopreserved preparations were obtained as it was described in [2] and injected intraperitoneally to animals [10], blood and liver biochemical parameters were controlled according to traditional methods [3, 5–9]. Hepatocytes were injected in the $2 \cdot 10^6$ concentration of viable cells in 1.0 ml. Liver fractions of different molecular masses were obtained

собных клеток в 1,0 мл. Используя метод разделительной хроматографии на колонке с сефадексом G-100, получали фракции печени различных молекулярных масс. Содержание белка в объединенных низкомолекулярных фракциях (0–60 кДа) составляло 0,034 мг/мл, высокомолекулярных (60 – > 150 кДа) – 0,136 мг/мл. При моделировании ОПН препараты вводили через 24 ч после ее развития. Если в экспериментах использовали “фармакологическую подготовку” животных, препараты вводили сразу после их затравки CCl₄. Контрольным животным вводили 1,0 мл физраствора. Статистическую обработку результатов проводили по *t*-критерию Стьюдента.

Анализ биохимических показателей, характеризующих печеночный метаболизм у крыс при экспериментальной ОПН, свидетельствует о накоплении токсичных продуктов обмена пигментов (увеличение содержания билирубина) и нарушении регуляторно-гомеостатической функции (снижение содержания белка). Исходя из показателей активности щелочной фосфатазы (ЩФ), глубина нарушений была пропорциональна продолжительности холестаза (табл. 1).

При развитии ОПН содержание билирубина в плазме крови увеличивалось в 1,7 раза, через 48 ч – в 2,1 раза, оставаясь на этом уровне и спустя 72 ч наблюдений. Концентрация белка в плазме крови в динамике снижалась и через 72 ч составляла 51% от контрольной.

Активность ЩФ через 24 ч после затравки животных CCl₄ увеличивалась в 11,7, к 48 ч – в 15,3, а к 72 ч – в 17,8 раза.

using the method for separative chromatography on the column with G-100 Sephadex, protein content in the combined low-molecular fractions (0–60 kDa) made 0.034 mg/ml, highly-molecular ones (60 – > 150 kDa) – 0.136 mg/ml. During ALI modeling preparations were injected in 24 hrs after its development. In the case of “pharmacological preparing” application of the animals in experiments the preparations were injected just after their poisoning by CCl₄. 1.0 ml of saline solution were injected to the control animals. Statistical processing of the results was conducted by Student's *t*-criterion.

Analysis of biochemical indices, characterizing liver metabolism in rats at experimental ALI testifies

Table 1

The effect of cryopreserved fetal preparations on biochemical indices in blood plasm of rats with ALI (72 hrs after animals' poisoning)

Cryopreserved preparation	Bilirubin, $\mu\text{Mol/l}$	Aph, units/l	Protein, mg/%
ALI without preparation injection	30.56 ± 2.8	623.00 ± 44.8	2.66 ± 0.22
Fetus liver preparations of 24 weeks' gestation term			
Homogenate	$20.00 \pm 1.50^*$	$302.40 \pm 15.12^{**}$	$3.84 \pm 0.19^{**}$
Hepatocytes	$19.30 \pm 0.97^{**}$	$280.60 \pm 14.03^{**}$	$3.80 \pm 0.19^{**}$
Cytosole fraction	$19.00 \pm 0.95^{**}$	$260.00 \pm 13.52^{**}$	$3.87 \pm 0.23^{**}$
Fetal and liver preparations of 10 weeks' gestation term			
Liver cryoextract (LC)	$17.50 \pm 0.88^{**}$	$220.20 \pm 11.45^{**}$	$4.00 \pm 0.21^{**}$
Highly molecular fractions from LC (60 – > 150 kDa)	$28.00 \pm 1.40^{\#}$	$580.00 \pm 29.00^{\#}$	$2.60 \pm 0.13^{\#}$
Low molecular fractions from LC (0–60 kDa)	$30.00 \pm 1.50^{\#}$	$560.00 \pm 28.00^{\#}$	$2.70 \pm 0.14^{\#}$
Total fetal cryoextract (TFC)	$18.30 \pm 1.01^{**,\#}$	$228.00 \pm 11.88^{**,\#}$	$3.95 \pm 0.19^{**,\#}$

Notes: * — $p < 0.01$ in comparison with the data at ALI without preparation injection; ** — $p < 0.001$ in comparison with the data at ALI without preparation injection; # — $p > 0.05$ in comparison with LC.

Таблица 1

Влияние криоконсервированных фетальных препаратов на биохимические показатели в плазме крови крыс с ОПН (72 ч после затравки животных, $n = 12$)

Вид криоконсервированного препарата	Билирубин, $\mu\text{моль/л}$	ЩФ, Ед/л	Белок, мг/%
ОПН без введения препаратов	$30,56 \pm 2,8$	$623,00 \pm 44,8$	$2,66 \pm 0,22$
Препараты печени плода 24 недель гестации			
Гомогенат	$20,00 \pm 1,50^*$	$302,40 \pm 15,12^{**}$	$3,84 \pm 0,19^{**}$
Гепатоциты	$19,30 \pm 0,97^{**}$	$280,60 \pm 14,03^{**}$	$3,80 \pm 0,19^{**}$
Цитозольная фракция	$19,00 \pm 0,95^{**}$	$260,00 \pm 13,52^{**}$	$3,87 \pm 0,23^{**}$
Препараты печени и плода 10 недель гестации			
Криоэкстракт печени (КП)	$17,50 \pm 0,88^{**}$	$220,20 \pm 11,45^{**}$	$4,00 \pm 0,21^{**}$
Высокомолекулярные фракции из КП (60 – > 150 кДа)	$28,00 \pm 1,40^{\#}$	$580,00 \pm 29,00^{\#}$	$2,60 \pm 0,13^{\#}$
Низкомолекулярные фракции из КП (0–60 кДа)	$30,00 \pm 1,50^{\#}$	$560,00 \pm 28,00^{\#}$	$2,70 \pm 0,14^{\#}$
Тотальный фетальный криоэкстракт плода (ТФП)	$18,30 \pm 1,01^{**,\#}$	$228,00 \pm 11,88^{**,\#}$	$3,95 \pm 0,19^{**,\#}$

Примечания: * — $p < 0,01$ по сравнению с данными при ОПН без введения препаратов; ** — $p < 0,001$ по сравнению с данными при ОПН без введения препаратов; # — $p > 0,05$ по сравнению с КП.

to the accumulation of toxic products of pigment exchange (increase of bilirubin content) and impairment of regulatory-homeostatic function (decrease of protein content). The depth of injuries was proportional to the cholestasis duration, taking into consideration the indices of alkaline phosphatase (Aph) (Table 1).

Under ALI development bilirubin content in blood plasm increased by 1.7 times, in 48 hrs — by 2.1 times, remaining also at this level in 72 hrs of observations. Protein concentration in a blood plasm in dynamics decreased in 72 hrs and made 51% of the control.

Aph activity in 24 hrs after animals' poisoning by CCl₄ increased by 11.7 times, to 48 hrs — by 15.3 times, and to 72 hrs — by 17.8 times. A sharp increase of Aph activity, which is an indicator of cholestatic syndrome development testifies to the impair-

Резкое увеличение активности ЩФ, являющейся индикатором развития холестатического синдрома, указывает на нарушение секреции и циркуляции желчи, а также возможные массивные некрозы печени.

Известно, что аминотрансферазы являются чувствительными индикаторами цитолиза, который возникает вследствие повреждения мембраны клеток. Об этом свидетельствуют данные повышения активности трансфераз: активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) увеличилась более, чем в 6 раз.

Установлено [1, 4], что накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) может привести к развитию патологических процессов, играющих существенную роль в патогенезе целого ряда заболеваний. Интенсивность процессов ПОЛ является важным показателем нарушения структурной и функциональной организации печени (табл. 2).

Таблица 2

Влияние криоконсервированных фетальных препаратов на активность СОД и содержание МДА в печени крыс с ОПН (72 ч после затравки животных, n = 12)

Вид криоконсервированного препарата	СОД, мкмоль/ч на мг белка	МДА, мкмоль/ч
ОПН без введения препаратов	0,180 ± 0,010	282,00 ± 8,60
Препараты печени плода 24 недель гестации		
Гомогенат	0,368 ± 0,029*	181,20 ± 9,06*
Гепатоциты	0,364 ± 0,029*	172,70 ± 10,16*
Цитозольная фракция	0,402 ± 0,032*.*	184,50 ± 14,76*.*
Препараты печени и плода 10 недель гестации		
КП	0,430 ± 0,034	141,25 ± 9,83
Высокомолекулярные фракции из КП (60 – > 150 кДа)	0,230 ± 0,018**	260,00 ± 13,94*
Низкомолекулярные фракции из КП (0–60 кДа)	0,204 ± 0,016	227,00 ± 11,27*
Тотальный фетальный криоэкстракт плода (ТФП)	0,360 ± 0,029*.*	152,20 ± 12,33*.*

Примечания: * — $p < 0,001$ по сравнению с данными при ОПН без введения препаратов; ** — $p < 0,01$ по сравнению с данными при ОПН без введения препаратов; # — $p < 0,05$ по сравнению с КП; ## — $p < 0,05$ по сравнению с КП.

Спустя сутки после отравления животных CCl_4 накопление малонового диальдегида (МДА) в печени крыс было увеличено в 1,7 раза. Через 24 и 72 ч показатели составляли 214 и 291% соответственно от контрольных.

Реакции процессов ПОЛ контролируются физиологической антиоксидантной системой. Резкое снижение показателей активности супероксиддисмутазы (СОД) свидетельствует о нарушении естественных систем защиты организма животных от чрезмерного ПОЛ при ОПН (табл. 2). Спустя сутки активность СОД у животных с ОПН снижается почти в 2 раза, через 48 ч наблюдений в

ment of bile secretion and circulation, as well as to possible massive liver necroses.

It is known, that aminotransferases are sensitive indicators of cytolysis, appeared due to the damage of a cellular membrane. The data on increase of transferases activity testify to this: activity of aminotransferase (AlAT) and aspartataminotransferase (AsAT) increased more, than by 6 times.

It was established [1, 4], that accumulation of lipid peroxidation processes (LPO) might results to the development of pathological processes, playing a significant role in the pathogenesis of the series of diseases. Intensity of LPO processes is an important index of the damage in structural and functional liver organization (Table 2).

Table 2

The effect of cryopreserved fetal preparations on SOD activity and MDA content in rats liver with an ALI (72 hrs after animals' poisoning)

Cryopreserved preparation	SOD, $\mu\text{Mol/hr}$ per mg of protein	MDA, $\mu\text{Mol/hr}$
ALI without preparation injection	0.180 ± 0.010	282.00 ± 8.60
Fetus liver preparations of 24 weeks' gestation term		
Homogenate	0.368 ± 0.029*	181.20 ± 9.06*
Hepatocytes	0.364 ± 0.029*	172.70 ± 10.16*
Cytosole fraction	0.402 ± 0.032*.*	184.50 ± 14.76*.*
Fetal and liver preparations of 10 weeks' gestation term		
LC	0.430 ± 0.034	141.25 ± 9.83
Highly molecular fractions from LC (60 – > 150 kDa)	0.230 ± 0.018**	260.00 ± 13.94*
Low molecular fractions from LC (0–60 kDa)	0.204 ± 0.016	227.00 ± 11.27*
Total fetal cryoextract (TFC)	0.360 ± 0.029*.*	152.20 ± 12.33*.*

Notes: * — $p < 0.001$ in comparison with the data at ALI without preparation injection; ** — $p < 0.01$ in comparison with the data at ALI without preparation injection; # — $p > 0.05$ in comparison with LC; ## — $p < 0.05$ in comparison with LC.

In a day after animals poisoning by CCl_4 the accumulation of malone dialdehyde (MDA) in rat liver was increased by 1.7 times. In 24 and 72 hrs the indices made 214 and 291%, correspondingly from the control ones.

Reactions of LPO processes are controlled by a physiological antioxidative system. A sharp decrease of the indices of superoxidesmutase (SOD) activity testifies to the impairment of natural protective systems of animal's organism due to an increased LPO at ALI (Table 2). In a day SOD activity in animals with ALI decreased almost twice, in 48 hrs of observations — by 3.2 times in comparison with the control value, and by 1.9 times — in comparison with the indices in the term of 24 hrs. An increase of the observation terms up to 72 hrs was not accompanied by the change of enzyme activity.

A decrease in the activity of catalase enzyme, controlling in a norm antioxidative reactions of an organism, also occurs. During ALI development enzyme

3,2 раза по сравнению с контрольной величиной и в 1,9 раза — по сравнению с показателями в срок 24 ч. Увеличение сроков наблюдений до 72 ч не сопровождалось изменением активности фермента.

Происходит также снижение активности фермента каталазы, контролирующего в норме антиокислительные реакции организма. При развитии ОПН активность фермента уменьшалась на 55,5%, продолжая в динамике снижаться в среднем за каждые сутки наблюдений в 1,35 раза. Спустя 72 ч наблюдений активность каталазы была в 4 раза ниже по сравнению с контрольными величинами.

Таким образом, при ОПН, развившейся в результате отравления животных CCl_4 , увеличиваются активность ферментов АлАТ и АсАТ (показатели цитолиза), концентрация билирубина (накопление продуктов обмена пигментов), активность ЩФ (глубина холестаза), а также нарушаются регуляторно-гомеостатическая (снижение содержания белка) и антиокислительная (снижение активности СОД и каталазы) функции печени.

Анализ биохимических показателей свидетельствует о глубоких изменениях структуры и функции гепатоцитов. Для коррекции показателей исследовали восстанавливающее действие на них криоконсервированных фетальных препаратов, полученных из печени плодов человека 10 и 24 недель гестации (табл. 1, 2).

Содержание билирубина в плазме крови животных с ОПН снижалось в среднем на 35% и не зависело от вида вводимого препарата (гомогенат, гепатоциты, цитозольные фракции). Активность ЩФ (табл. 1) также уменьшалась, в большей мере — при введении криоконсервированной цитозольной фракции печени. Накопление МДА снижалось в 1,55 раз и этот эффект также не зависел от вида препарата. Снижение уровня МДА после инъекции крысам криоконсервированных препаратов происходило в ряду: гомогенат–гепатоциты–цитозольная фракция (табл. 2).

Использование при ОПН криоконсервированных препаратов из тканей плода более раннего срока развития (10 недель) было эффективнее. Введение криоконсервированного экстракта ТФП позволяло снизить содержание билирубина в крови животных с ОПН в 1,6 раза. При этом активность ЩФ была на 12% ниже, чем в лучшем варианте, включающем введение цитозольной фракции печени плода более позднего срока гестации (24 недели). Показатели содержания белка не отличались от полученных с препаратами печени плода 24-х недель гестации.

Восстанавливающее действие КП плода 10 недель гестации по показателям билирубина, ЩФ и белка было на уровне ТФП. Высоко- и/или низкомолекулярные фракции, полученные из этого препарата, были не эффективны: показатели уровня билирубина и белка, накопления МДА, а также

activity decreased by 55.5%, continuing to a decrease in dynamics in average by 1.35 times per observation day. In 72 hrs of observations catalase activity was by 4 times lower, than the control values.

Thus, under ALI, developed in the result of animals' poisoning by CCl_4 , AlAT and AsAT (cytolysis indices) enzymes activity, bilirubin concentration (accumulation of the products of pigment exchange), Aph activity (cholestasis depth), as well as regulatory and homeostatic (reduction of protein content) liver function and antioxidative one (reduction of SOD and catalase activity) increased.

Analysis of biochemical indices testifies to deep changes of the hepatocyte's structure and function. To correct indices, a recovering effect of cryopreserved fetal preparations on them, obtained from human fetal liver of 10 and 24 gestation weeks, was investigated (Tables 1, 2).

Bilirubin content in a blood plasm of the animals with ALI decreased in average by 35% and did not depend on the type of injected preparation (homogenate, hepatocytes, cytosol fractions). Aph activity (Table 1) also decreased, and especially — under injection of the cryopreserved liver cytosol fraction. MDA accumulation decreased by 1.55 times and this effect also did not depend on the type of preparation. A decrease of MDA level after cryopreserved preparations injection to rats was in a such row: homogenate–hepatocytescytosol fraction (Table 2).

Usage of cryopreserved preparations from fetal tissues of earlier development term (10 weeks) during ALI is more efficient. Injection of TFP cryopreserved extract allowed to reduce bilirubin content in animals with ALI by 1.6 times. Thereat Aph activity was by 12% lower, than in the best variant, including injection of fetal liver cytosol fraction of later gestation term (24 weeks). Protein content indices did not differ on the obtained with fetal liver preparations ones from the fetus of 24 gestation weeks.

Recovering effect of CL of 10 gestation weeks' fetus by its indices of bilirubin, Aph and protein was at the level of TFP. Highly- and/or low-molecular fractions, obtained from this preparation, were not efficient: indices of bilirubin and protein level, as well as Aph activity were the same as in the animals group with ALI without the preparation injection (Table 1).

Cryoperserved liver preparations and TFP from 10-weeks' fetuses stimulated the SOD activity by the same way as liver preparations of later terms (24 weeks), but significantly suppressed MDA production. When using TFP and CL, MDA content in rats' liver was by 24 and 18% correspondingly, lower, than during the injection of liver preparations from fetus of later gestation term.

Basing on the data demonstrated the most efficient recovering effect on liver during animal poisoning by CCl_4 was showed by cryopreserved preparations from fetal liver of earlier terms of development.

активности ЩФ были такие же, как и в группе животных с ОПН без введения препаратов (табл. 1).

Криоконсервированные препараты печени и ТФП плода 10 недель гестации стимулировали активность СОД так же, как и препараты из печени более поздних сроков (24 недели), однако в большей мере угнетали продукцию МДА. При использовании ТФП и КП содержание МДА в печени крыс было на 24 и 18% соответственно ниже, чем при введении препаратов печени более позднего срока гестации плода.

Как свидетельствуют полученные экспериментальные данные, наиболее эффективное восстанавливающее действие на печень при отравлении животных CCl_4 оказывали криоконсервированные препараты из печени плода более ранних сроков развития.

Следующим этапом работы было изучение возможности ускорить восстановительные процессы в пораженной печени, используя "фармакологическую" подготовку крыс. В данной серии экспериментов криоконсервированные препараты вводили животным одновременно с затравкой. Использовали только криоконсервированные экстракты, выделенные из плода 10 недель гестации: ТФП и КП, т.е. препараты, которые были более эффективны как ускоряющие восстановительные процессы на этапе уже развившейся ОПН. Наблюдалось достоверное снижение активности ферментов цитолиза, накопления МДА и увеличение активности СОД (табл. 3).

Таблица 3

Влияние "фармакологической подготовки" криоконсервированными фетальными препаратами на биохимические показатели в плазме крови и печени животных с ОПН, вызванной отравлением CCl_4 (72 ч после затравки животных, $n = 7$)

Плазма крови		Печень	
АлАТ	АсАТ	СОД, мкмоль/ч на 1 мг белка	МДА, мкмоль/ч
мкмоль/ч на 1 мл			
ТФП			
2,10 ± 0,15	1,40 ± 0,08	0,43 ± 0,027	145,2 ± 7,5
КП			
1,75 ± 0,08	1,26 ± 0,10	0,48 ± 0,03	134,4 ± 7,3

Введение животным криоконсервированных препаратов одновременно с их затравкой позволяло снизить показатели цитолиза по сравнению с введением ТФП и КП после развития ОПН: активность АлАТ — на 16 и АсАТ — на 18%. Если КП использовали как лечебный фактор, содержание АлАТ снижалось на 53%, если как препарат "фармакологической подготовки", уровень АлАТ удавалось снизить дополнительно еще на 10,2%.

Активность АсАТ при введении криоконсервированных препаратов ТФП и КП не поднималась выше $1,40 \pm 0,05$ и $1,26 \pm 0,10$ мкмоль/ч на 1 мл со-

The investigation of the possibility to accelerate recovering processes in damaged liver, using "pharmacological preparation" of rats was the following stage of the work. In these series of experiments cryopreserved preparations were simultaneously injected with poisoning. Just cryopreserved extracts, isolated from 10 weeks' fetuses, TFP and CL, i.e. preparations, which are more efficient as accelerating recovering processes at the stage of developing ALI, were used. Statistically significant decrease of cytolysis enzyme activity, MDA accumulation and increase of SOD activity was observed (Table 3).

Table 3

Effect of "pharmacological preparation" by cryopreserved fetal preparations on the biochemical indices in the blood plasma and animals' liver with an ALI, caused by CCl_4 poisoning (72 hrs after poisoning), $n = 7$

Blood plasma		Liver	
AlAT	AcAT	SOD, μMol/hrs per mg of protein	MDA, μMol/hrs
μMol/hrs per 1 ml			
TFP			
2.10 ± 0.15	1.40 ± 0.08	0.43 ± 0.027	145.2 ± 7.5
LC			
1.75 ± 0.08	1.26 ± 0.10	0.48 ± 0.03	134.4 ± 7.3

Injection of cryopreserved preparations to animals simultaneously with poisoning allowed to reduce cytolysis indices in comparison with TFP and CL injection after ALI development: AlAT — by 16% and AsAT — by 18%. AlAT content decreased by 53% if CL was used as a therapeutic factor, we managed to reduce AlAT level additionally by 10.2% in the case, if it was used as the preparation of "pharmacological preparing".

AsAT activity during the injection of TFP and CL cryopreserved preparations did not rise higher than 1.40 ± 0.05 and 1.26 ± 0.10 μMol/hrs per 1 ml, correspondingly. These values were by 16% and 20% correspondingly lower, than when using the preparation in a day after animals poisoning. "Pharmacological preparation" of the animals allowed to significantly activate antioxidative system of an organism, SOD indices testified to this fact. SOD activity in a liver was more significant under the preparation injection as CL.

MDA accumulation in the liver of animals with ALI was lower than when injecting CL, in comparison with TFP, but by 37% higher, than in the liver of healthy animals. MDA production when using the preparation as TFP was slightly higher (by 9%).

Thus, the usage of cryopreserved fetal preparations when treating ALI, developed in the result of poisoning by CCl_4 , showed a recovering effect of a various degree. Biochemical indices, being the indicators of hepatocytes structural and functional state and defining a metabolic activity of organ in a whole.

ответственно. Эти величины были на 16 и 20% соответственно ниже, чем при использовании препаратов спустя сутки после затравки животных. "Фармакологическая подготовка" животных позволяла значительно повысить антиокислительную систему организма, о чем свидетельствовали показатели СОД. Активность СОД в печени была более высокой при введении препарата в виде КП.

Накопление МДА в печени животных с ОПН было ниже при введении КП, чем ТФП, но на 37% выше, чем в печени здоровых животных. Продукция МДА при использовании препарата в виде ТФП была незначительно выше (на 9%).

Таким образом, использование криоконсервированных фетальных препаратов при лечении ОПН, развившейся вследствие отравления CCl_4 , оказывает восстанавливающий эффект различной степени. Об этом свидетельствуют биохимические показатели, являющиеся индикаторами структурного и функционального состояния гепатоцитов, определяющих метаболическую активность органа в целом.

Восстанавливающий эффект препаратов зависит от особенностей строения и уровня метаболических процессов в печени плода, из которой получают препарат (ранние или поздние сроки внутриутробного развития), а также вида биопрепарата (гомогенат, изолированные гепатоциты, тотальный криоэкстракт плода, криоэкстракт печени, общая цитозольная фракция или отдельные белок-содержащие фракции).

Влияние криоконсервированных препаратов фетальной печени на образование МДА, активность СОД и каталазы свидетельствует о том, что они обладают также антиокислительными свойствами. Возможно, использование препаратов криоконсервированной фетальной печени не только стимулирует антиоксидантную защиту организма. Являясь по своей природе биопрепаратами, содержащими естественные антиоксиданты, они, по-видимому, тормозят аутоокисление на инициальной стадии свободных радикалов липидов (токоферола, убикинона) или активных форм кислорода (фермент — СОД) в клеточных мембранах.

Криоконсервированные препараты, полученные из печени плода 10 недель гестации, характеризуются более выраженным восстанавливающим действием, чем препараты печени более поздних сроков внутриутробного развития (24 недели гестации).

При этом, как нами показано, криоконсервированные препараты, хранящиеся до 2,5 лет при низких температурах (-196°C) в стационарных низкотемпературных банках, сохраняют свои свойства восстанавливать метаболизм поврежденных клеток печени (табл. 4).

Таким образом, метод получения фетальных препаратов с использованием низких (-196°C) температур позволяет экстрагировать и сохранять

Recovering effect of the preparations depends on the peculiarities of the structure and the level of metabolic processes in fetal liver, from which the preparation was obtained (early or later terms of intrauterine development), as well as the type of biopreparation (homogenate, isolated hepatocytes, fetal total cryoextract, CL, total cytosol fraction or separate protein-containing fractions).

The effect of fetal liver cryopreserved preparations on the MDA formation and SOD and catalase activity testifies to the fact, that they possess antioxidative properties as well. Perhaps, the application of preparations of cryopreserved fetal liver not only activates antioxidative protection of an organism. Being on their origin the biopreparations, containing natural antioxidants, they, probably, inhibit autooxidation at an initial stage of free radicals of lipids (tocopherol, ubiquinone) or active forms of oxygen (enzyme-SOD) in cellular membranes.

Cryopreserved preparations, obtained from fetus liver of 10 weeks of gestation, are characterized by more manifested recovery effect, than liver preparations of later terms of intrauterine development (24 weeks of gestation).

Thereat, as it was shown, cryopreserved preparations, stored up to 2.5 years at low temperatures (-196°C) in stationary low temperature banks, preserve their properties to recover metabolism of damaged liver cells (Table 4).

Table 4

Effect of terms of low temperature storage of fetal LC of 10 gestation terms on the biochemical parameters of rats' blood and liver with an ALI, $n = 7$

Terms of storage, hrs/year	AlAT activity in blood plasm, $\mu\text{Mol/hr}$ per 1 ml	SOD activity in liver, $\mu\text{Mol/hr}$ per 1 mg of protein
0.5 hrs	2.00 ± 0.10	0.430 ± 0.034
1.0 year	1.90 ± 0.08	0.390 ± 0.040
2.5 year	1.92 ± 0.09	0.400 ± 0.038

Thus, the method for fetal preparations obtaining, using low temperatures (-196°C) allowed to extract and preserve biologically active compounds, manifesting recovering effect on a liver under ALI.

Considering the results obtained, when treating experimental ALI the cryopreserved extract of fetal liver is the most efficient among all the preparations, used in the work.

Independently on of the storage terms of cryopreserved preparations the properties, accelerated liver recovering effect after poisoning by CCl_4 and after developed ALI were kept. This conclusion allows to consider as substantiated the necessity to create low-temperature bank of cryopreserved fetal liver preparations for their clinical application.

биологически активные соединения, которые оказывают восстанавливающее действие на печень при ОПН.

Таблица 4

Влияние сроков низкотемпературного хранения КП плода 10 недель гестации на биохимические параметры крови и печени крыс с ОПН (n = 7)

Сроки хранения, ч/год	Активность АЛАТ в плазме крови, мкмоль/ч на 1 мл	Активность СОД в печени, мкмоль/ч на 1 мг белка
0,5 ч	2,00 ± 0,10	0,430 ± 0,034
1,0 год	1,90 ± 0,08	0,390 ± 0,040
2,5 года	1,92 ± 0,09	0,400 ± 0,038

Исходя из полученных результатов, наиболее эффективным из всех апробированных в работе препаратов при лечении экспериментальной ОПН является криоконсервированный экстракт фетальной печени

Независимо от сроков хранения криоконсервированных препаратов в них сохраняются свойства, ускоряющие восстанавливающий эффект печени после отравления CCl_4 и развившейся ОПН. Этот вывод позволяет считать обоснованной необходимость создания низкотемпературного банка криоконсервированных фетальных препаратов печени для их клинического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
2. Грищенко В. И., Суббота Н. П., Галоян А. Р. Получение, хранение и применение криоэкстрактов фетальных тканей человека: Метод. рекомендации. — Харьков, 1996. — 7 с.
3. Дисордисеску П., Пэупеску Е. Биохимические методы диагноза и исследования. — Бухарест: Мед. изд-во, 1963. — С. 248.
4. Козлов Ю. П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. — М.: Изд-во МГУ, 1973. — 174 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 207.
6. Макаренко Е. В. Комплексное определение активности СОД и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени // Лаб. дело. — 1988. — 11. — С. 48–50.
7. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1973. — 120 с.
8. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66–67.
9. Суббота Н. П., Пашинский П. П., Розанова Е. Д. Биологические свойства криоэкстрактов эмбриональных тканей // Пробл. криобиологии. — 1998. — № 3. — С. 35–42.

Поступила 21.11.2000

REFERENCES

1. Vladimirov Yu. A., Archakov A. I. Lipid peroxidation in biological membranes. — M.: Nauka, 1972. — 252 p.
2. Grischenko V. I., Subbota N. P., Galoyan A. R. Obtaining, storage and application of the human fetal tissues cryoextracts: Method. recommendations. — Kharkov, 1996. — 7 p.
3. Disordisesku P., Peupesku E. Biochemical methods for diagnosis and investigations. — Bukharst: Med. Publ. House, 1963. — P. 248.
4. Kozlov Yu. P. Free radicals and their role in normal and pathological processes. — M.: Moscow State University Press, 1973. — 174 p.
5. Laboratory methods for investigation in clinics / Ed. by V. V. Menshikov. — M.: Meditsina, 1987. — P. 207–227.
6. Makarenko E. V. Complex determination of SOD and glutathione reductase activity in the erythrocytes of patients with chronic liver diseases // Lab. delo. — 1988. — 11. — P. 48–50.
7. Methodical recommendations to the applications of the unified clinical laboratory methods for investigation / Ed. by V. V. Menshikov. — M.: Meditsina, 1973. — 120 p.
8. Stalnaya I. D., Garishvili T. G. The method for malone dialdehyde revealing by means of thiobarbiture acid // Current methods in biochemistry. — M.: Meditsina, 1977. — P. 66–67.
9. Subbota N. P., Pashinsky P. P., Rozanova E. D. Biological properties of embryonic tissue cryoextracts // Problemy krio-biologii. — 1988. — № 3. — P. 35–42.

Accepted in 21.11.2000

К вопросу о криоконсервировании плазмы кордовой крови

О. В. ЛИПИНА, О. С. ПРОКОПЮК, Ю. А. САВЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

To the Question on Cord Blood Plasm Cryopreservation

O. V. LIPINA, O. S. PROKOPYUK, Yu. A. SAVCHENKO

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

Благодаря уникальным свойствам кордовая кровь и ее компоненты активно используются в биотехнических программах. Плазма и сыворотка кордовой крови содержат комплекс иммуномодуляторов, весь спектр гормонов, свойственный организму новорожденного, факторы роста и антипролиферативные факторы, гемопоэтины и адаптогены, опиоидные пептиды — эндорфины и энкефалины, микроэлементы, витамины [5]. В связи с этим необходимо сохранить биоактивные соединения плазмы и сыворотки кордовой крови в нативном состоянии без нарушения их исходного физиологического соотношения.

Цель данной работы — изучение влияния низкотемпературного консервирования на сохранность плазмы кордовой крови. Криоустойчивость плазмы оценивали по соотношению фракционного состава плазменных белков (альбумина, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулина, фибриногена) до и после замораживания, а также по величине протромбинового индекса. Плазму замораживали в полиэтиленовых ампулах объемом 1 мл в морозильной камере (-20°C) или погружением в жидкий азот. Оттаивание проводили на водяной бане с температурой $40-43^\circ\text{C}$.

Было выявлено (таблица), что глубокое замораживание в жидком азоте и до -20°C существенных сдвигов в фракционном составе плазменных белков кордовой крови не вызывает. Однако вопрос о молекулярных механизмах влияния низких температур на уровень структурно-функциональной сохранности плазменных белков остается по-прежнему открытым.

При исследовании влияния охлаждения на вязкостные показатели плазмы и сыворотки кордовой крови было установлено, что в интервале температур $40-0^\circ\text{C}$ температурная зависимость вязкости плазмы и сыворотки, измеренная с помощью капиллярно-рамочного вискозиметра при малых напряжениях сдвига, имеет сложный характер (рисунок). Поскольку для водных растворов неорганических компонентов, по своему составу приближающихся к плазме, подобных аномалий обнаружено не было, полученные данные указывают на важность вклада изменения межмолекулярных взаимодействий белков в термотропные аномалии вязкости. Из рисунка также видно, что кривая температурной зависимости вязкости сыворотки имеет более простой вид, чем плазмы. Можно предположить, что более сложный характер температурной зависимости вязкости плаз-

Cord blood and its components due to their unique properties are widely used in biotechnical programs. Cord blood plasma and serum contain a complex of immune modulators, all spectrum of hormones, which is characteristic to a newborn organism, growth factors and antiproliferative factors, hemopoietins and adaptogens, opioid peptides — endorphins and enkephalins, microelements, vitamins [5]. In this connection it is necessary to preserve bioactive compounds of plasma and serum of cord blood without impairment of their initial physiological ratio.

The aim of this work was to study the effect of low temperature preservation on cord blood plasma integrity. Plasma cryoresistance was evaluated according to the ratio of plasma protein fractional composition (albumin, α_1 -, α_2 -, β -, γ -globulin, fibrinogen) before and after freezing, as well as by prothrombin index value. Plasma was frozen in 1 ml polyethylene ampoules in freezing chamber (-20°C) or by immersion into a liquid nitrogen. Freeze-thawing was accomplished at a water bath under the temperature of $40-43^\circ\text{C}$.

It was revealed (Table), that a deep freezing in a liquid nitrogen down to -20°C did not cause considerable shifts in fractional state of cord blood plasma proteins. However the question on molecular mechanisms of low temperature effect on a level of structural and functional integrity of plasma proteins has still remained open.

When investigating a cooling effect on viscosity indices of cord blood plasma and serum it has been established, that within the temperature range of $40-0^\circ\text{C}$ the temperature dependence of plasma and serum viscosity, using a capillary and frame viscometer under slight shift tensions has a complicated character (Figure). Since for aqueous solutions of non-organic components, approaching by their composition to plasma, the similar abnormalities were not revealed, the data obtained pointed to the importance of contribution of the change in protein intermolecular interactions in thermotropic abnormalities of viscosity. The figure also shows, that the curve of temperature dependence of serum viscosity has more simple view, than plasma. We can suppose, that more complicated character of temperature dependence of plasma viscosity in comparison with serum is related to fibrinogen, temperature-dependent compounds of its interaction with other plasma proteins. The strengthening of serum viscosity dependence on a shift tension within temperature range of $20-4^\circ\text{C}$, meanwhile under temperatures of $37-20^\circ\text{C}$ such

Сохранность плазмы кордовой крови при криоконсервировании

Cord blood plasma integrity under cryopreservation

Условия криоконсервирования Cryopreservation conditions	Общий белок, г/л Total protein, g/l	Содержание глобулинов, % Globulin content, %				Концентрация фибриногена, г/л Fibrinogen concentration, g/l	Протромбиновый индекс, % Prothrombin index, %
		α_1 -	α_2 -	β -	γ -		
Контроль Control	$68,1 \pm 5,0$	$4,4 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,9$	$15,6 \pm 0,6$	$16,8 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,3$	$62,7 \pm 4,4$
-196°C	$61,0 \pm 7,1$	$4,1 \pm 0,6$	$8,4 \pm 1,2$	$15,9 \pm 0,8$	$16,3 \pm 0,7$	$2,0 \pm 0,4$	$63,6 \pm 5,0$
-20°C	$60,4 \pm 6,8$	$3,9 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,8$	$15,2 \pm 0,7$	$16,0 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,3$	$68,9 \pm 6,2$

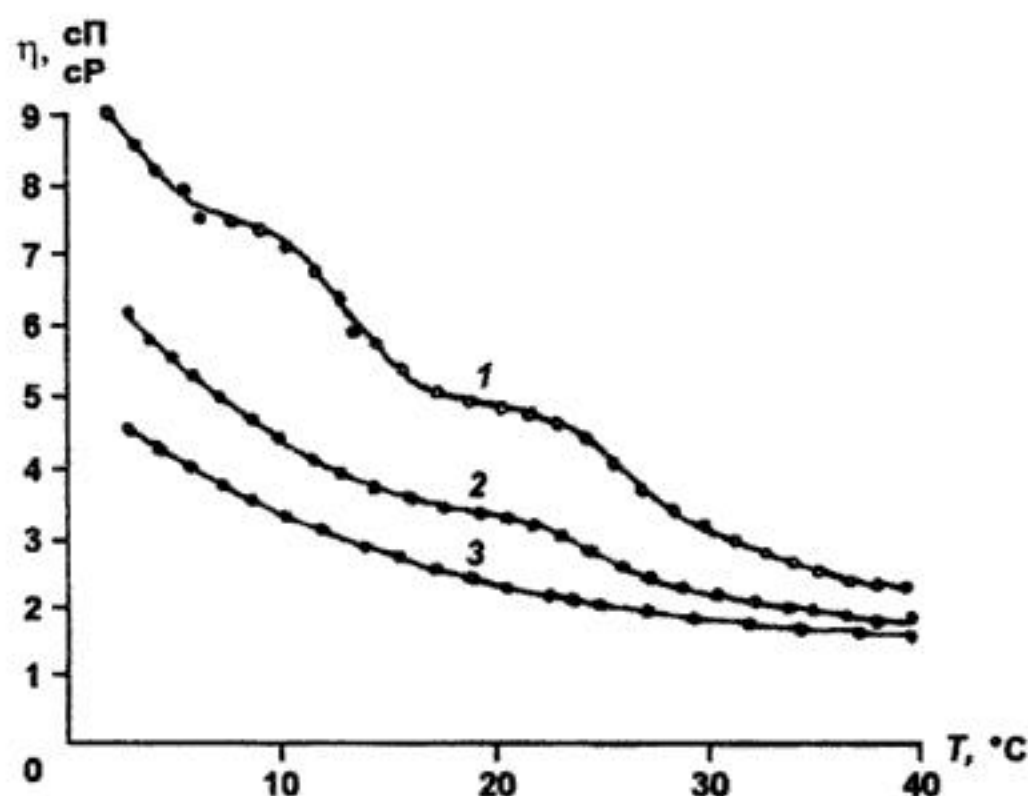
мы по сравнению с сывороткой связан с фибриногеном, с температурозависимыми соединениями его взаимодействия с другими плазматическими белками. Усиление зависимости вязкости сыворотки от напряжения сдвига в температурном интервале 20–4 °С (при температурах 37–20 °С такая зависимость отсутствует) может быть следствием термоиндуцированных изменений как молекулярных взаимодействий, так и конформационного состояния сывороточных белков, косвенным подтверждением чему могут быть спектрофотометрические исследования [2,3]. Термотропные перестройки присущи также растворам индивидуальных плазменных белков (бычий сывороточный альбумин, сывороточный альбумин человека, иммуноглобулин) [4]. Что касается глубокого замораживания, то имеются сведения, что низкотемпературное консервирование (–196 °С) приводит к частичной дегидратации и криоагрегации белковых макромолекул альбуминов и иммуноглобулина, к потере структурно-функциональных свойств гаптоглобина, к изменению макроструктуры фибриногена [1, 4, 6].

Изменения на уровне межмолекулярных взаимодействий белковых макромолекул во время замораживания в дальнейшем при длительном хранении и повторных циклах замораживания–оттаивания могут привести к снижению функциональной активности белков плазмы крови. Неизменность соотношения фракционного состава плазменных белков кордовой крови в процессе криоконсервирования является, безусловно, положительным фактором для применения препаратов кордовой плазмы и сыворотки в практическом здравоохранении. Однако выяснение характера влияния низкотемпературного воздействия на структурно-функциональную активность биоактивных компонентов кордовой плазмы на молекулярном уровне, обеспечение сохранности их исходных физиологических соотношений при длительном хранении в замороженном состоянии является предметом дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Е. К., Ромоданова Э. А., Дюбко Т. С. и др. Влияние режимов замораживания на спектральные свойства растворов фибриногена // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 3. – С. 18–21.
2. Демченко А. Г. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
3. Липина О. В. Реологические свойства крови при охлаждении и действии веществ из ряда полиэтиленоксида: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1992. – 15 с.
4. Марковский А. Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 18 с.
5. Милованов А. П., Ляшко Е. С. Структурные основы белоксинтезирующей функции плаценты и децидуальной оболочки матки // Вестник Рос. ассоциации акушеров-гинекологов. – 1999. – № 4. – С. 32–37.
6. Никольченко А. Ю., Гулевский А. К. Структурно-функциональные свойства гаптоглобина в условиях криоконсервирования // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 3. – С. 28–35.

Поступило 13.06.2000



Температурная зависимость вязкости: 1 – плазмы кордовой крови (напряжение сдвига 1,90 дин/см²); 2, 3 – сыворотки кордовой крови (напряжение сдвига 1,90 и 9,50 дин/см² соответственно).

Temperature dependence of viscosity: 1 – cord blood plasma (shift tension is 1.90 dynes/cm²); 2, 3 – cord blood serum (shift tension is 1.90 and 9.50 dynes/cm², correspondingly)

a dependence is absent, can result in thermoinduced changes in both molecular interactions and conformational state of serum proteins, that could be indirectly confirmed by spectrophotometrical investigations [2, 3]. Thermotropic rearrangements are also characteristic for solutions of individual plasma proteins (bovine serum albumin, human serum albumin and immunoglobulin) [4]. As for a deep freezing, there is the information, that low temperature preservation (–196 °C) results in a partial dehydration and cryoaggregation of protein macromolecules of albumins and immunoglobulin, in the loss of structural and functional properties of haptoglobin, in the change of fibrinogen macrostructure [1, 4, 6].

Changes in the level of intermolecular interactions of protein macromolecules during freezing under a long-term storage and repeated cycles of freeze-thawing can further result in a decrease in functional activity of blood plasma proteins. The ratio constancy of fractional composition of cord blood plasma proteins during cryopreservation process is absolutely positive factor for applying a cord plasma and serum preparations in practical health care. However the revealing of the character of low temperature effect on structural and functional activity of bioactive components of cord plasma on molecular level, providing the integrity of their initial physiological ratios during a long-term storage in frozen state, are the objects for further investigations.

REFERENCES

1. Andreeva E. K., Romodanova E. A., Dyubko T. S. et al. Effect of freezing regimens on spectral properties of fibrinogen solutions // Problemy kriobiologii. – 1998. – № 3. – P. 18–21.
2. Demchenko A. G. Ultraviolet spectrophotometry and protein structure. – Kiev: Nauk. dumka, 1981. – 208 p.
3. Lipina O. V. Blood rheological properties under cooling and effect of substances from polyethylene oxide series substances: Abstr. Thesis... Cand. Biol. Sci. – Kharkov, 1992. – 15 p.
4. Markovsky A. L. Cryopreservation factor effect on globular protein hydration: Abstr. Thesis... Cand. Biol. Sci. – Kharkov, 1984. – 18 p.
5. Milovanov A. P., Lyashko E. S. Structural grounds of protein-synthesizing function of placenta and uterine decidual cover // Vestnik Rossijskoj assotsiatsii akusherov-ginekologov. – 1999. – № 4. – P. 32–37.
6. Nikolchenko A. Yu., Gulevsky A. K. Structural and functional properties of haptoglobin under cryopreservation conditions // Problemy kriobiologii. – 1998. – № 3. – P. 28–35.

Accepted in 13.06.2000

Эффект предварительного общего умеренного охлаждения на формирование функциональной системы оборонительного поведения у крыс разного возраста

И. Н. НИКИШКОВА

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Effect of a Preliminary General Moderate Cooling on Functional System Formation of Defensive Behavior in Rats of Different Age

I. N. NIKISHKOVA

V. N. Karazin Kharkov National University

Характер и направление поведенческого акта могут быть в значительной степени определены не только специфическими восходящими к коре головного мозга возбуждениями, которые отражают внутреннее состояние организма, но и процессами, протекающими в самом неокортексе и подкорковых структурах [1]. Поэтому особенно важно изучить, как условия внешней среды, оказывая модулирующее воздействие на физиологическое состояние головного мозга, могут опосредованно влиять на способность животного формировать адаптивные формы поведения, т.е. определять степень обучаемости животного.

Одним из наиболее распространенных и значимых для организма факторов внешней среды является общее охлаждение, которое, согласно данным [2], оказывает выраженное модулирующее воздействие на состояние структур головного мозга. Цель данной работы — исследование влияния именно этого фактора на процесс обучения животного на примере выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ).

Работа проводилась на белых крысах-самцах линии Вистар 3- и 6-месячного возрастов. Животные каждого возраста были разделены на две группы. Процессу обучения животных группы II предшествовало трехкратное общее умеренное охлаждение, которое проводили по оригинальной методике [5]. Группа I служила контролем для животных группы II, и формирование у них УРАИ проходило без предварительных воздействий.

Обучение проводили по классической методике выработки двухстороннего активного избегания в камере Скиннера. Пусковым стимулом служил звуковой сигнал метронома (300 ударов/мин), авersiveм — электрический ток (25–45 В). Ежедневно животному предъявляли по 6 сочетаний условного и безусловного стимулов с интервалом в 2–4 мин. В процессе обучения регистрировали условные реакции (УР), безусловные реакции (БР) и выпадения безусловных реакций (ВБР), а также межсигнальные реакции и число дефекаций.

Для оценки степени обучаемости каждого животного определяли присущий ему тип оборонительного поведения, для чего анализировали совокупность всех поведенческих актов [4]. В зависимости от того, как каждое животное решало поставленную перед ним задачу, его относили к соответствующей подгруппе: 1-я подгруппа — животные, обучившиеся новому навыку, реализуют оборонительное поведение путем активного избегания; 2-я подгруппа — животные, находящиеся на этапе незаконченного формирования УР [3], предпочитают поведение избегания БР; 3-я подгруппа — животные необучившиеся, использующие "старые" видоспецифичные формы поведения, демонстрируют пассивное оборонительное поведение (отсутствие переходов в безопасный отсек, замирание, тигмотаксис).

В ходе выработки УРАИ 3-месячные животные группы I новый навык приобрели 62,5% (1-я подгруппа), 12,5% крыс к концу эксперимента находились лишь на начальном этапе обучения (2-я подгруппа), 25% животных вместо формирования новой адекватной функциональной системы использовали сложившиеся ранее (3-я подгруппа). Крысы группы II при обуче-

The character and direction of a behavioral act may be determined in a considerably extent by not only specific excitations, rising to a cerebral cortex, which reflect an internal state of an organism, but by the processes, occurring in neocortex itself and subcortical structures [1]. Therefore it is particularly important to study how the external environment conditions, causing a modulating effect on brain physiological state, can affect as intermediators an animal ability to form adaptive forms of behavior, i.e. to determine the degree of an animal teachability.

One of the most spread and significant for an organism external environment factors is a general cooling, that according to the literature data [2] causes a manifested modulating effect on brain structure state. The aim of this work is to investigate the effect of namely this factor on teaching process of an animal, as an example of the establishment of a conditioned reflex of active avoiding (CRAA).

The work was accomplished in Wistar white male rats of 3 and 6 months aged. Animals of each age were divided in two groups. A threefold general moderate cooling, carried-out by an original technique [5] preceded the teaching process of the IInd group animals. The group I of animals served as the control for the IInd group of those and CRAA formation in them proceeded without preliminary effects.

Teaching was performed according to a classic technique for establishment of bilateral active avoiding in Skinner chamber. Launching stimulus was a sound signal of metronome (300 beats/min), an aversive one — electric current (24–45 V). Every day one showed to an animal by 6 combinations of conditioned and unconditioned stimuli with an interval of 2–4 min. In teaching process we recorded conditioned reactions (CR), unconditioned reactions (UR) and fall of unconditioned reactions (FUR), as well as intersignal reactions and defecation number.

In order to evaluate a degree of teachability of each animal we determined its characteristic type of defensive behavior, for this reason we analyzed the totality of all behavioral acts [4]. Depending on the way how each animal solved the task set, it was referred to the corresponding group: the 1st subgroup — animals, being taught a new skill, realize a defensive behavior by means of active avoiding; the 2nd one — the animals, being at the stage of incomplete CR formation [3], prefer the behavior of deliverance (UR); the 3rd one — the animals, not being taught, using "old" species-specific behavior forms, demonstrate a passive defensive behavior (the absence of transitions in safe compartment, dying down, thigmotaxis).

When establishing CRAA in 3 months animals of the 1st group 62.5% (the 1st subgroup) were taught a new skill, 12.5% of rats were at an initial stage to the end of the experiment (the 2nd subgroup), 25% of animals instead of the formation of a new adequate functional system used the established before ones (the 3rd one). The IInd group rats during teaching demonstrated only two types of defensive behavior: active avoiding and deliverance, thereat 87% of animals were referred to the 1st subgroup, 14.3% — to the 2nd one.

нии продемонстрировали только два типа оборонительного поведения: активного избегания и избавления, при этом к 1-й подгруппе было отнесено 85,7% животных, ко 2-й — 14,3%.

Итогом процесса формирования функциональной системы активного избегания у 6-месячных животных группы I было такое распределение животных по степени обучаемости: 1-я подгруппа — 69,2, 2-я подгруппа — 15,4, 3-я подгруппа — 15,4%. Животные 6-месячного возраста группы II при обучении разделились следующим образом: 1-я подгруппа — 69,2, 2-я подгруппа — 23,2, 3-я подгруппа — 7,6%.

Таким образом, проведенные исследования выявили, что число 3-месячных животных, успешно завершивших обучение, выше в группе II и в этой группе полностью отсутствуют животные, которые не смогли приобрести адаптивного навыка. Все это позволяет говорить о положительном эффекте предварительного общего охлаждения на обучение 3-месячных крыс. Для 6-месячных животных эффект предварительного общего охлаждения оказался неоднозначным, поскольку, хотя у животных группы II по сравнению с животными группы I число реализованных УР за весь эксперимент было на 10–15% ниже, но при этом количество ВБР в этой группе было меньше в 2,2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохин П. К. Очерки по физиологии функциональных систем.— М.: Медицина, 1975.— 448 с.
2. Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Ломакин И. И., Белостоцкий А. В. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга.— Киев: Наук. думка, 1992.— 207 с.
3. Бобровников Л. В. Формирование поведенческого акта: проблема внутрисистемной гетерохронии // Журн. высш. нерв. деят.— 1988.— 38, № 1.— С. 30–36.
4. Зарайская И. Ю. Системный анализ оборонительного поведения крыс линии Вистар при обучении двухстороннему активному избеганию // Журн. высш. нерв. деят.— 1995.— 45, Вып. 3.— С. 472–478.
5. Никишкова И. Н., Кутиков А. Е. Особенности моделирования общего умеренного периодического охлаждения у крыс линии Вистар // Пробл. криобиологии.— 2000.— № 2.— С. 113–114.

Поступило 25.12.2000

The process of formation of active avoiding functional system in 6 months animals of the 1st group resulted in the following animal distribution on teachability degree: the 1st subgroup — 69,2, the 2nd one — 15,4, the 3rd one — 15,4%. 6 months animals of the IIInd group during teaching were divided in following way: the 1st subgroup — 69,2, the 2nd one — 23,2, the 3rd one — 7,6%.

Thus the investigations conducted revealed, that a number of 3 months animals successfully completed the teaching was higher in the IIInd group and the animals, which could not gain an adaptive skill, were absent in this group. All this allows to tell about positive effect of a preliminary general cooling on 3 months rats teaching. For 6 months animals the effect of a preliminary general cooling occurred to be not uniform, because even in the animals of the IIInd group in comparison with the 1st one a number of realized CR during all experiment was by 10–15% lower, but thereat a number of FUR in this group was lesser in 2.2 times.

REFERENCES

1. Anokhin P. K. Essays on functional system physiology.— M.: Meditsina, 1975.— 448 p.
2. Babijchuk G. A., Marchenko V. S., Lomakin I. I., Belostotskij A. V. Neurophysiological processes of cooled brain.— Kiev: Naukova dumka, 1992.— 207 p.
3. Bobrovnikov L. V. Formation of behavioral act: problem of intrasystemic heterochrony // Zhurnal Vysshej Nervnoj Deyatel'nosti.— 1988.— 38, № 1.— P. 30–36.
4. Zarajskaya I. Yu. Systemic analysis of a defensive behavior of Wistar line rats during teaching a bilateral active avoiding // Zhurnal Vysshej Nervnoj Deyatel'nosti.— 1995.— 45, Issue 3.— P. 472–478.
5. Nikishkova I. N., Kutikov A. E. Peculiarities of the modeling of general moderate periodic cooling in Wistar line rats // Problemy kriobiologii.— 2000.— № 2.— P. 113–114.

Accepted in 25.12.2000

Науково-практична конференція “Клітинна та тканинна трансплантація”

12–13 грудня 2000 р. у м. Житомирі відбулася науково-практична конференція “Клітинна та тканинна трансплантація”, організована Координаційним центром трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України, Інститутом проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Управлінням охорони здоров'я Житомирської облдержадміністрації, Житомирським обласним медичним консультативно-діагностичним центром.

Відкрили пленарне засідання начальник УОЗ Житомирської облдержадміністрації **Парамонов З. М.**, директор Координаційного центру трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України д-р мед. наук проф. **Бугайов В. М.** (м. Київ), вчений секретар відділення молекулярної біології, біохімії, експериментальної і клінічної фізіології НАН України канд. біол. наук **Бойко В. І.**

З науковими доповідями виступили:

акад. НАН України **Грищенко В. І.** (м. Харків) “Трансплантація фетоплацентарних тканин – стан проблеми та перспективи розвитку”;

член-кор. НАН України **Чехун В. Ф.** (м. Київ) “Сьогодення та майбутнє протипухлинних вакцин”;

проф. **Юрченко Т. М.**, проф. **Снурніков О. С.** (м. Харків) “Організація роботи Українського Банку біологічних об'єктів, медико-біологічні та соціальні аспекти використання”;

ст. наук. співроб. **Прокопюк О. С.** (м. Харків) “Тканини фетоплацентарного комплексу та клінічні аспекти їх використання”;

ст. наук. співроб. **Дьомін Ю. А.** (м. Харків) “Використання тканин фетоплацентарного комплексу в лікуванні судинних захворювань органу зору”;

проф. **Петренко О. Ю.** (м. Харків) “Кріоконсервовані клітини ембріональної печінки”;

проф. **Нагорна В. Ф.** (м. Одеса) “Застосування лімфосуспензії в акушерській практиці”;

лікар **Лучків В. І.** (м. Житомир) “Застосування тканини фетоплацентарного комплексу у онкологічних хворих”;

д-р біол. наук **Бондаренко Т. П.**, асп. **Луговий С. В.** (м. Харків) “Трансплантація щитовидної залози як метод лікування гіпотиреозу”;

ст. наук. співроб. **Кудокоцева О. В.** (м. Харків) “Пуповинна кров як джерело гемопоетичних клітин”;

доц. **Шепітько В. І.** (м. Полтава) “Полтавський регіональний Центр клітинної трансплантації: досвід роботи”;

ст. наук. співроб. **Гончарук О. І.** (м. Харків) “Сучасні принципи дослідження трансплантаційного матеріалу”.

Відбулося обговорення доповідей.

Учасники конференції прийняли резолюцію:

1. Продовжити і розширити в Україні науковий напрямок і практичне застосування клітинної і тканинної трансплантації.

2. Доповіді учасників конференції опублікувати в журналі “Проблеми кріобіології”.

3. Конференції з проблем клітинної і тканинної терапії проводити регулярно, щорічно.

Научные редакторы *В. И. Луговой, Т.Н. Юрченко*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
И. Г. Пятигорская

Scientific Editors *V. I. Lougovoy, T. N. Yurchenko*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

**ПРОБЛЕМЫ
КРИОБИОЛОГИИ**

4

**PROBLEMS
OF CRYOBIOLOGY**

Индекс 70474

2000

Index 70474

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Периодичность — четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

Журнал рассчитан на научных работников в области биологии и медицины, преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля, практиков, использующих методы воздействия холода на биологические объекты.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are utmost importance with regard to preservation of plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko

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

23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine

Tel. (0572) 72-41-43

Fax (0572) 72-00-84

E-mail: cryo@online.kharkov.ua