Национальная Академия наук Украины,
отделение молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии
Институт проблем криобиологии и криомедицины

1
1999

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

Матеріал, захищений авторським правом

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

Редакционная коллегия

С. И. Аксенов (Москва)
Г. А. Бабийчук (Харьков)
А. М. Белоус (зам. главного редактора, 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 (ответственный 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)

Редакционный совет

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

Editor-in-Chief V. I. GRISHCHENKO

Editorial Board

S. I. Aksenov (Moscow)
G. A. Babiychuk (Kharkov)
A. M. Belous (Associated Editor, 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. Mericka (Czechia)
H. T. Meryman (USA)
Yu. F. Pastukhov (Sankt–Petersburg)
E. N. Popov (Executive 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)

Editorial Council

A.D.Bugrov
P.A.Kaliman
V.V.Lemeshko
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

Адрес редакции: *310015, Харьков, ул. Переяславская, 23, тел. (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

State Registration Certificate: KB Series № 98 of 23.09.93

Address of the Editorial Office: *23, Pereyaslavskaya str., 310015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72–10–39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

1
1999

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Кучеренко Ю. В., Зинченко А. В., Зинченко В. Д. Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-пропандиолом и ПЭГ-1500 3

Кулешова Л. Г. Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия 9

Межидов С. Х., Розанова Е. Д. Влияние различных концентраций натрия хлорида на состояние гемоглобина внутри эритроцитов 14

Петренко А. Ю., Росляков А. Д., Оченашко О. В., Моисеева Н. Н. О значении перекисных процессов в гибели криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых и голодных крыс 19

Дюбко Т. С., Нардид О. А. Изменения центров сорбции ДСМ в тенях эритроцитов после действия низкой температуры 26

Кратенко Р. І. Модуляція L- та DL-триптофаном серотонінових рецепторів першого типу головного мозку щурів 32

Бабенко Н. Н. Особенности пролиферации и дифференцировки нативных криоконсервированных эмбриональных нервных клеток человека. Сообщение 2. Подбор оптимальных условий культивирования нативных клеток эмбрионального мозга человека 39

Калиниченко Т. А., Гольцев А. Н. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть III. Криоконсервирование 45

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Стрибуль Т. Ф., Олейник С. Т., Новиков А. Н., Григоращенко А. И. Оптимизация метода криоконсервирования меристемы картофеля 57

КРИОМЕДИЦИНА

Шаповал С. Д. Применение криоконсервированных клеток тимуса у больных сепсисом 61

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Суббота Н. П., Пашинский П. П., Питько В. А. Гормональный спектр криоэкстрактов тотального эмбрионального препарата и плаценты разных сроков гестации 63

Малахов В. А., Дорошенко Г. И., Кочуева Е. В. Сравнительная эффективность низкоинтенсивной СВЧ- и КВЧ-терапии больных начальной цереброваскулярной патологией 65

Грищенко В. И., Геродес Е. Г., Петрушко М. П. Влияние нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека на оплодотворяющую способность спермиев и развитие эмбрионов человека *in vitro* 66

ХРОНИКА

Международное рабочее совещание "Криолабильность и криоустойчивость биологических объектов" 68

БЕЛОУС Аполлон Максимович 71

This One
BWLT-DC9-QSO3

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1999

Матеріал, захищений авторським правом

1
1999

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Kucherenko Yu. V., Zinchenko A. V., Zinchenko V. D. Phase transitions in the red blood cells suspensions cryopreserved with glycerol, 1.2-propanediol and PEG-1500 3

Kuleshova L. G. Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-Alcohol series. Part 1. Morphological aspect of interaction 9

Mezhidov S. Kh., Rozanova E. D. The effect of sodium chloride of different concentrations on the state of haemoglobin inside erythrocytes 14

Petrenko A. Yu., Rosiyakov A. D., Ochenashko O. V., Moiseyeva N. N. On the role of lipid peroxidation in the death of cryopreserved hepatocytes isolated from fed and fasted rats 19

Dyubko T. S., Nardid O. A. The changes of DSM sorption centers in erythrocyte ghosts after low temperature effect 26

Kratenko R. I. L- and DL-tryptophane modulation of rat brain first type serotonin receptors 32

Babenko N. N. Peculiarities of proliferation and differentiation of native and cryopreserved human embryonic nerve cells. Part 2. Selection of optimal conditions for native cell culturing of human embryonic brain 39

Kalinichenko T. A., Goltsev A. N. Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part III. Cryopreservation 45

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Stribul T. F., Olejnik S. T., Novikov A. N., Grigoraschenko A. I. Optimization of the method of potato meristem cryopreservation 57

CRYOMEDICINE

Shapoval S. D. Thymus cryopreserved cell application in septic patients 61

BRIEF COMMUNICATIONS

Subbota N. P., Pashinsky P. P., Pitko V. A. Cryoextraction hormonal spectrum of total embryonic preparation and placenta of different gestation terms 63

Malakhov V. A., Dorosherko G. I., Kochuyeva E. V. A comparative efficiency of low-intensive SHF- and EHF-therapy in patients with initial stages of cerebrovascular pathology 65

Grischenko V. I., Gerodes A. G., Petrushko M. P. The effect of native and cryopreserved human follicular fluid on fertilizing ability of spermatozoa and human embryo development *in vitro* 66

CHRONICLE

International workshop "Cryolability and Cryostability of biological objects" 68

BELOUS Apollon Maximovich 71

© Translated from Russian by *E. N. Pushkova*

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 1999

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
КРИОБИОЛОГИЯ

THEORETICAL
AND EXPERIMENTAL
CRYOBIOLOGY

УДК 612.117: 547.422: 616–073.66

UDC 612.117: 547.422: 616–073.66

Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-пропандиолом и ПЭГ-1500

Ю. В. КУЧЕРЕНКО, А. В. ЗИНЧЕНКО, В. Д. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Phase transitions in the red blood cells suspensions cryopreserved with glycerol, 1.2-propanediol and PEG-1500

Yu. V. KUCHERENKO. A. V. ZINCHENKO, V. D. ZINCHENKO

Institute For Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии изучали фазовые переходы в криоконсервантах на основе 1,2-пропандиола, глицерина и полиэтиленгликоля (ПЭГ-1500), суспензиях эритроцитов под защитой указанных сред, а также в надосадочной жидкости. Показано, что в криозащитных смесях наблюдаются такие процессы, как стеклование, кристаллизация из переохлажденного состояния при нагреве, плавление эвтектического состава (в системе вода–ПЭГ-1500) и плавление системы. В суспензиях эритроцитов, инкубированных с криоконсервантами, стеклование жидкости и кристаллизация из переохлажденного состояния либо не регистрируются, либо сильно уменьшаются по интенсивности. Процесс плавления льда в суспензиях эритроцитов в присутствии криопротекторов, в отличие от криозащитных сред, протекает быстрее.

Методом диференціальної скануючої калориметрії вивчали фазові переходи у кріоконсервантах на основі 1,2-пропандіолу, гліцерину і поліетиленгліколя (ПЕГ-1500), суспензіях еритроцитів під захистом цих середовищ, а також у надосадковій рідині. Показано, що у кріозахисних сумішах спостерігаються такі процеси, як склування, кристалізація з переохолодженого стану під час нагріву, плавлення евтектичного складу (у системі вода–ПЕГ-1500) і плавлення системи. У суспензіях еритроцитів, інкубованих з кріоконсервантами, склування рідини і кристалізація з переохолодженого стану або не реєструються, або значно зменшуються за інтенсивністю. Процес плавлення льоду у суспензіях еритроцитів, які вміщують кріопротектори, протікає швидше, ніж у кріозахисних середовищах.

Phase transitions in cryoprotective media containing 1,2- propanediol, glycerol and polyethylene glycol (PEG-1500), suspensions of erythrocytes under the protection of the media mentioned as well as in supernatant liquid were studied by means of differential scanning calorimetry (DSC). It has been shown that in cryoprotective mixtures there were such processes as vitrification, crystallization from supercooled state during heating, melting of eutectic content (in the system of water - PEG-1500) and melting of system. In the suspensions of erythrocytes incubated with cryoprotective media, liquid vitrification and crystallization from supercooled state were not found, or strongly decreased on the intensity. Melting process of ice in the suspensions of erythrocytes in the presence of cryoprotectants proceeds more rapidly into the contrast to cryoprotective media.

Известно, что сохранность клеток при криоконсервировании зависит от параметров, характеризующих условия криоконсервирования: скорости охлаждения и нагрева; глубины охлаждения; наличия льда; состава среды, в которой взвешивались замораживаемые клетки; продолжительности эквилибрации в среде до начала охлаждения; температуры; продолжительности хранения и т.д. [3, 5, 8]. Согласно существующим представлениям повреждения клеточных структур при замораживании прямо или косвенно связаны с образованием кристаллов льда. Использование криопротекторов и быстрое охлаждение позволяют получить среду замораживания в стеклообразном состоянии, однако в такой системе при отогреве замороженных образцов может развиваться кристаллизация из переохлажденного состояния.

It is known that cell integrity during cryopreservation depends on the parameters characterizing cryopreservation conditions: cooling and warming rates; cooling depth; ice presence; the composition of medium where the cells to be frozen were suspended; equilibration duration in the medium before cooling; temperature; storage duration etc. [3, 5, 8]. According to the common knowlege the damages of cellular structures during the freezing are directly or indirectly related to the formation of ice crystals. The application of cryoprotectants and rapid cooling allow to obtain the freezing medium in vitreous state, but in such a system during the warming of frozen samples the crystallization may develop from supercooled state. The processes of crystallization, vitrification, devitrification in cryobiological systems have been quite intensively studied in model samples, representing binary or multicomponent aqueous solutions

Матеріал, захищений авторським правом

Процессы кристаллизации, стеклования, девитрификации в криобиологических системах достаточно интенсивно исследовались на модельных образцах, представляющих собой бинарные или многокомпонентные водные растворы криозащитных веществ. Фазовые переходы в бинарных водных растворах глицерина, 1,2-пропандиола и ПЭГ-1500 изучены детально [4, 7]. Однако процессы протекания фазовых превращений и стеклования в клеточных суспензиях, содержащих криозащитные вещества, исследованы недостаточно.

Цель настоящей работы — исследование калориметрическим методом фазовых переходов в водных суспензиях эритроцитов человека в присутствии криоконсервантов на основе глицерина, 1,2-пропандиола и ПЭГ-1500.

Эксперименты проводили на донорской крови, консервированной на растворе "глюгицир" сроком хранения до 4-х суток при 4 °С. Эритроциты получали троекратным центрифугированием равных объемов крови с 0,9%-м раствором NaCl в течение 5 мин при 1 200*g* с последующим отделением плазмы от плотной суспензии клеток (гематокритное число суспензии 0,80 ± 0,05 л/л).

Для низкотемпературного консервирования эритроцитов использовали криозащитные среды, включающие проникающие криопротекторы (глицерин, 1,2-ПД) и криопротектор смешанного типа ПЭГ-1500. Применяли следующие прописи криоконсервирующих сред: "пропандиосахароль" (1,2-ПД — 350 г, сахароза — 30 г, NaCl — 6 г, дистиллят — до 1 л) [2], защитная среда (глицерин — 184,0 мл, NaCl — 7,9 г, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,59 г, Na_2HPO_4 — 0,59 г, глюкоза — 3,6 г, бидистиллят — до 1 л) [1], криоконсервант (ПЭГ-1500 — 300 г, NaCl — 9 г, дистиллят — до 1 л).

Криозащитные среды добавляли к отмытой суспензии клеток в соотношении 1:1 (по объему) при комнатной температуре (для "пропандиосахароля" и консерванта на основе глицерина) или при 0 °С на ледяной бане (для ПЭГ-1500). После 30 мин инкубации смесь центрифугировали 10 мин при 1 200*g*, затем отделяли надосадочную жидкость от плотной суспензии клеток.

Для исследований использовали дифференциальный сканирующий калориметр, разработанный в ИПКиК НАНУ [4]. Образцы весом 0,6–1,0 г помещали в тонкостенный стальной калориметрический стаканчик и охлаждали в парах азота (эритроциты с "пропандиосахаролем") либо быстро погружали в жидкий азот (криоконсерванты на основе глицерина и ПЭГ-1500). Замороженные образцы помещали в охлажденный до −150 °С калориметрический блок и регистрировали тепловые потоки в процессе нагрева. Скорость нагрева образцов составляла 0,2 °С/мин в диапазоне температур −70 ÷ −10 °С и 0,075 °С/мин — в диапазоне −10 ÷ 0 °С. Удельное теплопоглощение в процессе плавления определяли, вычисляя площади под пиками плавления образцов.

of cryoprotective substances. Phase transitions in binary aqueous solutions of glycerol, 1,2-propanediol and PEG-1500 were in details studied in [4,7]. However the processes of phase transformations and vitrification in cellular suspensions, containing cryoprotective susbstances have been insufficiently investigated. The present work aimed to investigating the phase transitions in aqueous suspensions of human erythrocytes in the presence of media containing glycerol, 1,2-propanediol and PEG-1500 by means of calorimetrical method.

The experiments were carried out on donor blood preserved in the "glugicir" solution within storage term of 4 days at 4 °C. Erythrocytes were obtained by three-times centrifugation of blood aliquots with 0.9% NaCl solution during 5 min at 1 200*g* with subsequent removal of plasm from dense cell suspension (hematocrit number of suspension 0.80 ± 0.05 l/l).

For low temperature preservation of erythrocytes cryoprotective media comprising penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-PD) and cryoprotectant of combined type PEG-1500 were used. Following protocols of cryopreserving media were applied: "propanediosacharol" (1,2-PD — 350 g, succrose — 30 g, NaCl — 6 g, distilled water — up to 1 l) [2], protective medium contained glycerol (glycerol — 184.0 ml, NaCl — 7.9 g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2$) — 0.59 g, Na_2HPO_4 — 0.59 g, glucose — 3.6 g, bidistilled water — up to 1 l) [1], protective media containing PTG-1500 (PEG-1500 — 300 g, NaCl — 9 g, distilled water — up to 1 l).

Cryoprotective media were added to washed-out cell suspension in the 1:1 ratio (volume/volume) at room temperature (for "propanediosacharol" and protective media containing glycerol) or at 0 °C on a water bath (for PEG-1500). After 30 min incubation the mixture was cetrifuged for 10 min at 1 200*g* then the supernatant was removed from a dense cell suspension.

Calorimetry was performed with differential scanning calorimeter designed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine [4]. The samples of 0.6–1.0 g weight were placed into thin-wall steel calorimetric cell and cooled in the nitrogen vapours (erythrocytes with "propanediosacharol") or protective media containing glycerol and PEG-1500 were rapidly immersed into a liquid nitrogen. Frozen samples were put into a cooled down to −150 °C calorimetrical block and heat flows during heating were registered. The heating rate of samples was 0.2 °C/min in the temperature range of −70 ÷ −10 °C and 0.075 °C/min in the range of −10 ÷ 0 °C. Calculation of specific heat absorption duting melting was carried out by determination of the areas under the sample melting peaks.

Phase transitions in erythrocyte suspensions were studied on the basis of thermograms analysis (Figs. 1–3).

Fig. 1 shows that there is a sudden change of heat absorption *1*, corresponding to the transition from metastable vitreous state into a supercooled liquid of the part of sample, vitrified during a rapid cooling in 30% PEG-1500 solution at the temperature of −70 ÷ −60 °C. The maximum of exothermal peak *2*,

Матеріал, захищений авторським правом

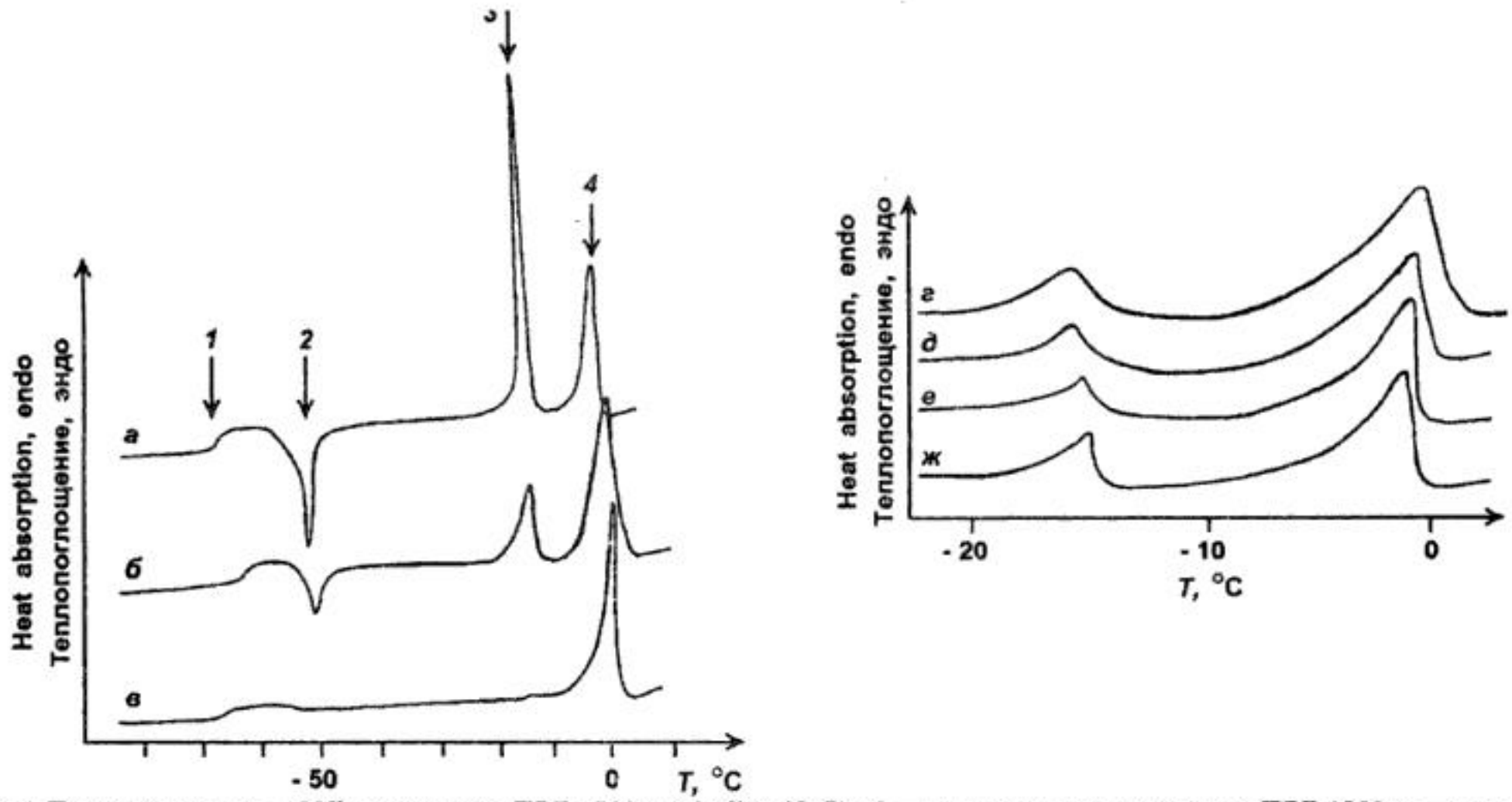


Рис. 1. Термограммы: *а* — 30%-го раствора ПЭГ-1500 (на 0,9%-м NaCl); *б* — надосадочной жидкости с ПЭГ-1500; *в* — суспензии эритроцитов, консервированных с ПЭГ-1500; *г* — надосадочной жидкости; *д* — 60%-й надосадочной жидкости + 40%-й эритромассы; *е* — 40%-й надосадочной жидкости + 60%-й эритромассы; *ж* — 100%-й суспензии эритроцитов

Fig. 1. Thermograms: *а* — 30% PEG-1500 solution (on 0,9% NaCL); *б* — supernatant liquid with PEG-1500; *в* — suspension of erythrocytes preserved with PEG-1500; *г* — supernatant liquid; *д* — 60% of supernatant liquid + 40% of erythromass; *е* — 40% of supernatant liquid + 60% of erythromass; *ж* — 100% of the suspension of erythrocytes

Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов изучали на основе анализа термограмм (рис. 1–3).

Из рис. 1 видно, что в 30%-м растворе ПЭГ-1500 при температуре –70 ÷ –60 °С наблюдается скачок теплопоглощения *1*, соответствующий переходу из метастабильного стеклообразного состояния в переохлажденную жидкость части образца, застекловавшейся при быстром охлаждении. Максимум экзотермического пика *2*, соответствующего переходу переохлажденной жидкости в кристаллическое состояние, приходится на температуру –50 °С. Узкий эндотермический пик *3* при температуре –17 °С соответствует плавлению эвтектики, а максимум эндотермического пика *4*. характеризующий полное плавление льда системы, наблюдается при температуре –4,5 °С. Таким образом, при охлаждении 30%-го раствора ПЭГ-1500 (на 0,9%-м NaCl) в системе образуются неравновесные стеклообразные включения, медленный отогрев способствует переходу системы в кристаллическое состояние. Данная закономерность сохраняется и для надосадочной жидкости, полученной после инкубации клеток с раствором ПЭГ-1500. На термограмме надосадочной жидкости с ПЭГ-1500 регистрируются как пики расстеклования *1* и кристаллизации *2*, так и пики плавления эвтектики *3* и полного плавления льда системы *4*. Поскольку концентрация ПЭГ-1500 в надосадочной жидкости составляла 19 ± 3%, интенсивность пиков *1*, *2* и *3* в надосадочной жидкости была меньше, чем в криоконсервирующем растворе ПЭГ-1500.

В суспензиях эритроцитов с ПЭГ-1500 наблюдались лишь небольшие пики расстеклования и кристаллизации (пики *1* и *2*), а также пики плавления эвтектики *3* и полного плавления льда системы *4*. Поскольку концентрация ПЭГ-1500 в надосадочной жидкости составляла 19 ± 3%, интенсивность пиков *1*, *2* и *3* в надосадочной жидкости была меньше, чем в криоконсервирующем растворе ПЭГ-1500.

В суспензиях эритроцитов с ПЭГ-1500 наблюдались лишь небольшие пики расстеклования и кристаллизации (пики *1* и *2*), а также пики плавления эвтектики *3* и полного плавления льда системы *4*. Поскольку концентрация ПЭГ-1500 в надосадочной жидкости составляла 19 ± 3%, интенсивность пиков *1*, *2* и *3* в надосадочной жидкости была меньше, чем в криоконсервирующем растворе ПЭГ-1500.

corresponding to the transition of supercooled liquid into crystalline state, is registred at the temperature of –50 °C. Narrow endothermal peak *3* at the temperature of –17 °C corresponds to the melting of eutectics and the maximum of endothermal peak *4*, characterizing a bulk ice melting of system, is observed at the temperature of –4.5 °C. Thus during cooling of 30% PEG-1500 solution (on 0,9% NaCl) in the system non-equilibrium vitreous inclusions form, slow warming leads to the transition of the system into crystalline state. Given regularity is remained for the supernatant liquid, obtained after cell incubation with PEG-1500 solution. Both peaks of devitrification *1* and crystallization *2*, and melting peaks of eutectics melting *3* and complete ice melting of the system *4* are registered in thermogram of supernatant liquid with PEG-1500. Since PEG-1500 concentration in supernatant liquid was 19 ± 3%, the intensity of *1*, *2*, *3* peaks in supernatant liquid was lower than in preserving PEG-1500 solution. In the suspensions of erythrocytes with PEG-1500 there were only slight peaks of devitrification and crystallization (peaks *1* and *2*) as well as the peaks of eutectics melting *3* and one of system's bulk ice *4*. This points to the fact that in erythrocytes preserved with protective medium containing PEG-1500 appears in less degree than in aqueous solution of cryopreservative the crystallization of ice from amorphous phase takes place.

Cryoprotective effect of polyethylene glycols is connected with their ability to bind the salts and increase the viscosity of medium during cooling [1]. Moreover, the incubation of erythrocytes in PEG-1500 hypertonic solution (1 800 mOsm) before cooling leads to an efficient cell dehydration (upto 70% of initial cell volume) and in the result the tendency to supercooling of intracellular solution increases. A

Матеріал, захищений авторським правом

ления эвтектики *3* и плавления льда системы *4*. Это указывает на то, что в присутствии криоконсерванта на основе ПЭГ-1500 в эритроцитах в значительно меньшей степени, чем в водном растворе криоконсерванта, происходит кристаллизация льда из аморфной фазы.

Криозащитное действие полиэтиленгликолей определяется их способностью связывать соли и повышать вязкость среды при охлаждении [1]. Более того, инкубация эритроцитов в гипертоническом растворе ПЭГ-1500 (1 800 мОсм) до охлаждения приводит к эффективному обезвоживанию клеток (до 70% от исходного объема клеток), в результате чего увеличивается тенденция к переохлаждению внутриклеточного раствора. Быстрое охлаждение образцов способствует переходу системы в стеклообразное состояние. Однако результаты проведенных экспериментов указывают на то, что в суспензиях эритроцитов, консервированных с ПЭГ-1500, количество застекловавшейся в процессе охлаждения фазы незначительно, основная масса воды в системе кристаллизуется.

Известно, что в изотонических условиях масса водной фракции в эритроцитах человека составляет 68,5% [6]. При охлаждении под действием осмотических сил эритроциты теряют до 75% исходной массы воды [9]. Проведенный нами расчет удельного теплопоглощения в процессе плавления показал, что площадь под пиком *4* полного плавления системы примерно одинакова в суспензиях клеток и в надосадочной жидкости (см. рис. 1). Так как клетки подвергались обезвоживанию в результате инкубации с криоконсервантом до охлаждения и стеклование в системе практически отсутствовало, можно предположить, что в суспензиях эритроцитов, консервируемых с ПЭГ-1500, наряду с внеклеточной, происходит и внутриклеточная кристаллизация. Вероятно, образующиеся мелкие кристаллы

rapid cooling of samples promotes to the transition of the system into vitreous state. Hence obtained results show that in the suspensions of erythrocytes preserved with PEG-1500 the amount of the phase vitrified during cooling is negligible, the main part of the water in the system crystallizes.

It is known that under isotonic conditions the mass of water fraction in human erythrocytes makes 68.5% [6]. During cooling under the effect of osmotic power erythrocytes lose upto 75% of initial water mass [9]. We calculated the specific heat absorption during melting. Obtained data demonstrate that the area under the peak *4* of a complete system melting was approximately equal in cell suspensions and supernatant liquid (see Fig. 1). Because of the cells' dehydration during the incubation with cryoprotective medium before cooling and absence of the vitrification, one can suppose that in suspensions of erythrocytes preserved with PEG-1500 along with extracellular, intracellular crystallization takes place. Probably forming small ice crystals do not significantly affect the cells, since the hemolysis of erythrocytes after thawing did not exceed 2%.

Unlike PEG-1500 the mechanism of protective effect of such penetrating cryoprotectants as 1.2-propanediol and glycerol is based on their ability to substitute and bind intracellular water, preventing the appearance of damaging gradients of the concentration of extra- and intracellular solution on the membrane.

The peaks of devitrification and crystallization *2* (Fig. 2 and 3) were practically not registered in thermograms of cell suspensions, as well as in ones of erythrocytes, preserved with PEG-1500. Since the samples studied represent complicated multicomponent system, comprising the complex of salts, sugars, proteins, lipids, non-electrolytes etc., the "ice–water" phase transition in contrast to binary aqueous solutions occurs in a wide temperature interval (–70 ÷ 0 °C).

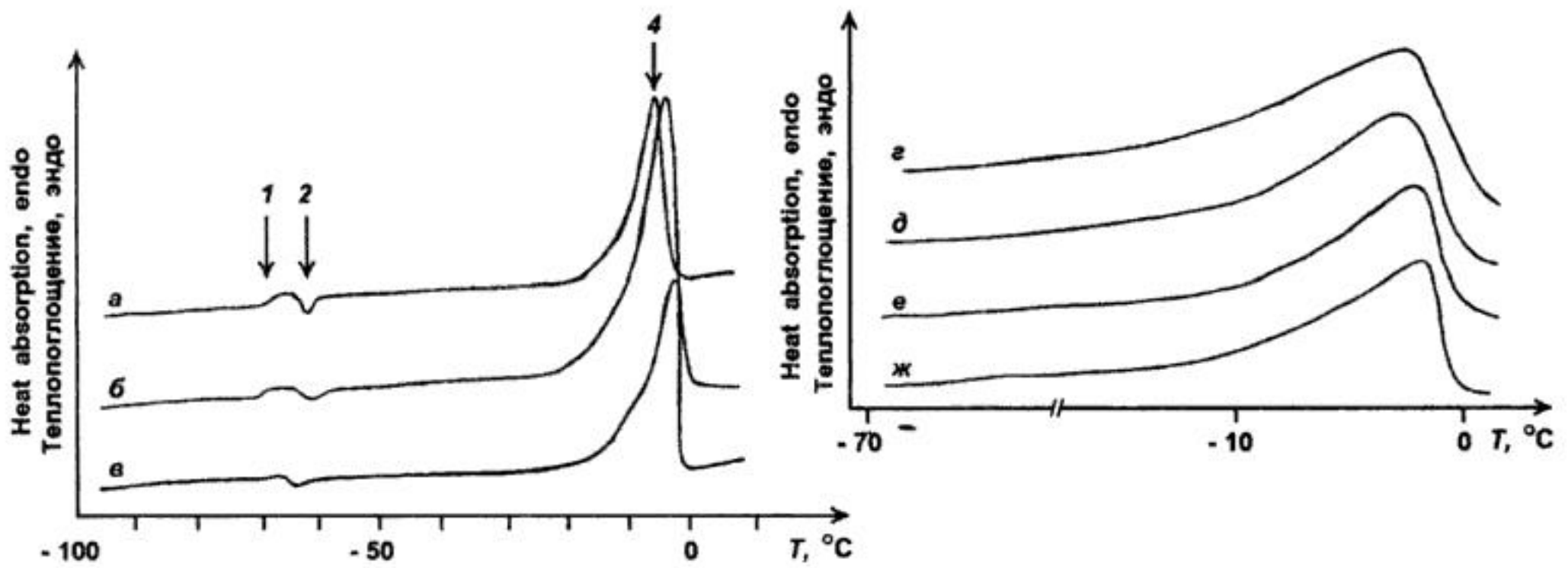


Рис. 2. Термограммы: *а* — криоконсерванта на основе глицерина; *б* — надосадочной жидкости; *в* — суспензии эритроцитов, консервированных с глицерином; *г* — надосадочной жидкости; *д* — 70%-й надосадочной жидкости + 30%-й эритромассы; *е* — 30%-й надосадочной жидкости + 70%-й эритромассы; *ж* — 100%-й суспензии эритроцитов

Fig. 2. Thermograms: *а* — cryoprotective medium containing glycerol; *б* — supernatant liquid; *в* — suspension of erythrocytes preserved with glycerol; *г* — supernatant liquid; *д* — 70% of supernatant liquid + 30% of erythromass; *е* — 30% of supernatant liquid + 70% of erythromass; *ж* — 100% of the suspension of erythrocytes

Матеріал, захищений авторським правом

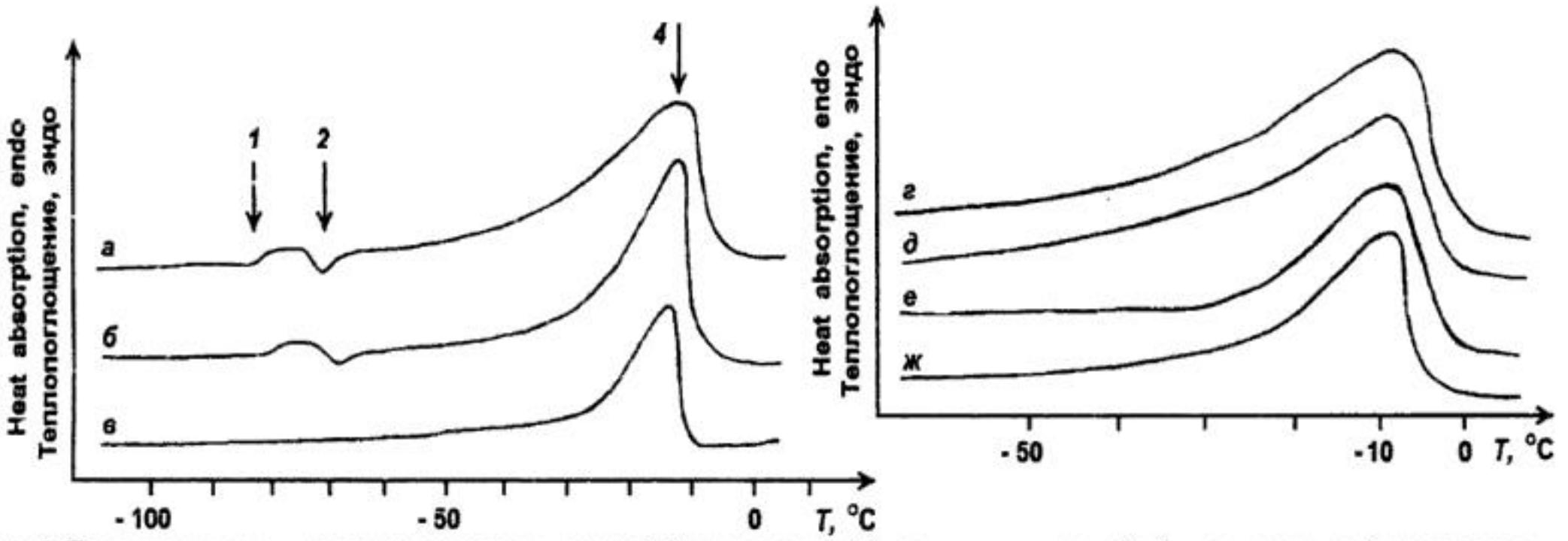


Рис. 3. Термограммы: *а* — криоконсерванта на основе 1,2-пропандиола ("пропандиосахароля"); *б* — надосадочной жидкости; *в* — суспензии эритроцитов, консервированных с пропандиосахаролем; *г* — надосадочной жидкости; *д* — 70%-й надосадочной жидкости + 30%-й эритромассы; *е* — 30%-й надосадочной жидкости + 70%-й эритромассы; *ж* — 100%-й суспензии эритроцитов

Fig. 3. Thermograms: *a* — cryoprotective medium containing 1.2-propanediol ("propanediosacharol"); *б* — supernatant liquid; *в* — suspension of erythrocytes preserved with propanediol sacharol; *г* — supernatant liquid; *д* — 70% of supernatant liquid + 30% of erythromass; *е* — 30% of supernatant liquid + 70% of erythromass; *ж* — 100% of the suspension of erythrocytes

льда не оказывают существенного повреждающего действия на клетки, поскольку гемолиз эритроцитов после оттаивания не превышал 2%.

В отличие от ПЭГ-1500 механизм защитного действия таких проникающих криопротекторов, как 1,2-пропандиол и глицерин, основан на их способности замещать и связывать внутриклеточную воду, препятствуя возникновению на мембране повреждающих градиентов концентрации вне- и внутриклеточного раствора.

Как и на термограммах эритроцитов, консервированных с ПЭГ-1500, на термограммах суспензий клеток, консервированных с глицерином и 1,2-пропандиолом, практически не регистрировались пики расстеклования и кристаллизации *2* (рис. 2 и 3). Поскольку исследуемые образцы представляют собой сложную многокомпонентную систему, включающую комплекс солей, сахаров, белков, липидов, неэлектролитов и т.д., фазовый переход лед–вода, в отличие от бинарных водных растворов, происходит в широком температурном интервале (–70 ÷ 0 °C).

Анализируя форму пиков полного плавления надосадочной жидкости и суспензий клеток с различным содержанием эритроцитов, можно видеть, что правый фронт этих пиков более узкий в образцах с высоким содержанием эритроцитов. Отсюда следует, что в условиях непрерывного повышения температуры время протаивания образцов, содержащих клетки, меньше, чем время, необходимое для полного протаивания водных растворов криоконсервантов.

В работе проведен расчет интегральной интенсивности пика теплопоглощения в процессе плавления образцов в зависимости от процентного содержания эритроцитов в суспензии. Как видно из рис. 4, увеличение содержания надосадочной жидкости (до 70% массы образца) не приводит к значительному увеличению количества закристаллизовавшейся воды.

We analysed the form of the peaks of bulk ice melting in supernatant liquid and cell suspension with various content of erythrocytes. It was found that right front of these peaks is more narrow in the samples with high content of erythrocytes. Thus under conditions of constant increase in the temperature the thawing period of samples, in comparison with the cells, is less that the time necessary for a complete thawing of aqueous solutions of cryoprotectants.

We calculated the integral intensity of the heat absorption peak during melting of samples with different percentage content of erythrocytes in suspension. Fig. 4 shows that increasing of the supernatant content (up to 70% of sample mass) did not result a considerable rising of the amount of crystallized water.

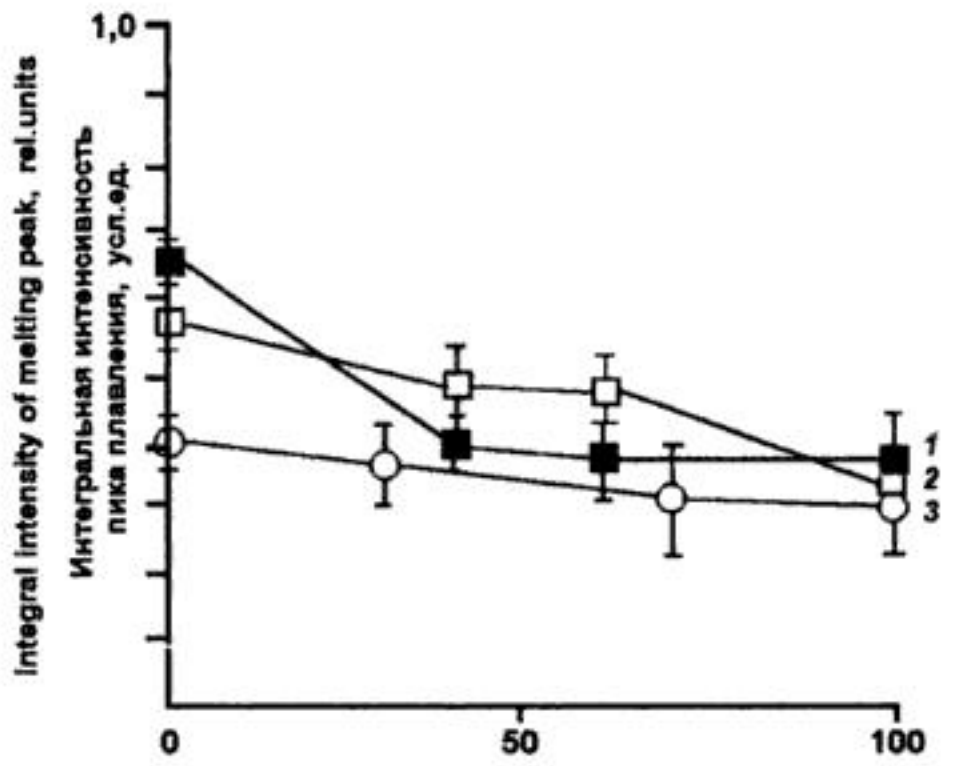


Рис. 4. Зависимость площади пика плавления (отнесенной к единице массы) от процентного содержания эритроцитов в образце: *1* — ПЭГ-1500; *2* — консерванта на основе глицерина; *3* — "пропандиосахароля"

Fig. 4. The dependency of melting peak area (regarding to mass unit) versus the percentage content of erythrocytes in the sample: *1* — PEG-1500; *2* — protective medium containing glycerol; *3* — "propanediosacharol"

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, несмотря на различия механизмов криозащиты и проницаемости исследуемых в работе веществ, наблюдается общая закономерность развития и протекания процессов изменения агрегатного состояния в консервируемых суспензиях эритроцитов на этапе замораживания–отогрева. Оптимальная методика замораживания (медленное охлаждение для эритроцитов с ПДС, быстрое охлаждение для ПЭГ-1500) не позволяла получить образцы в стеклообразном состоянии. Вместе с тем в суспензиях криоконсервированных эритроцитов не развиваются такие интенсивные процессы при низких температурах, как кристаллизация льда из аморфной фазы и плавление эвтектики ("пропандиосахароль" и консервант на основе глицерина). Основная масса воды в суспензиях эритроцитов с добавками глицерина, 1,2-пропандиола и ПЭГ-1500 кристаллизуется даже при высоких скоростях охлаждения, получаемых путем погружения образцов в жидкий азот. Расстеклование жидкости и кристаллизация из переохлажденного состояния (пики *1* и *2*) либо не регистрируются, либо сильно уменьшаются по интенсивности в клеточных суспензиях по сравнению с гомогенными системами — растворами криозащитных веществ или надосадочной жидкостью. Вероятно, для получения замороженных суспензий эритроцитов с более высокой степенью стеклования необходимы более высокие концентрации стеклующихся криозащитных агентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С.* Криоконсерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– С. 107–120.
2. *Воротилин А.М.* Замораживание клеток крови до –196 °С под защитой низкомолекулярных гликолей и глицерина. Повышение эффективности криоконсервации // Криобиология.– 1985.– № 3.– С. 15–20.
3. *Воротилин А.М., Зинченко А.В., Моисеев В.А., Подопригора Л.П.* Механизм повреждения эритроцитов при размораживании // Криобиология.– 1990.– № 3.– С. 23–27.
4. *Зинченко А.В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –150 ÷ 0 °С: Автореф. дис.... канд. физ.-мат. наук.– Киев, 1983.– 20 с.
5. *Зинченко А.В., Петренко А.Ю.* Низкотемпературные фазовые переходы в среде для криоконсервирования гепатоцитов на основе ДМСО // Физико-химические процессы в криобилогических системах: Сб. науч. трудов.– Харьков, 1991.– С. 56–60.
6. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions: A model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– 290.– P. 9–15.
7. *Ren H.S., Wei Y., Hua T.C., Zhang J.* Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions // Cryobiology.– 1994.– 2310, № 1.– P. 47–56.
8. *Spieles G., Kresin M., Loges K. et al.* The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes // Cryobiology.– 1995.– 2320, № 4.– P. 366–378.
9. *Wiest S.C., Steponkus P.L.* The osmotic behavior of human erythrocytes // Cryobiology.– 1979.– 2160.– P. 101–104.

Поступила 26.01.98

Thus in spite of the differences in the mechanisms of cryoprotection and permeability of studied cryoprotectants the development and course of the processes of the aggregate state change in preserved suspensions of erythrocytes at the freezing-thawing stage are demonstrated a general regularity. Optimal procedures of freezing (slow cooling for erythrocytes with PDS, rapid cooling for PEG-1500) did not allow to obtain the samples in a vitreous state. At the same time in the cryopreserved erythrocyte suspensions such intensive processes under low temperatures as ice crystallization from amorphous phase and eutectics melting ("propanediosacharol" and protective media containing glycerol) do not develop. The main part of the water in suspensions of erythrocytes with the additives of glycerol, 1.2-propanediol and PEG-1500 crystallizes even at high cooling rates (for sample immersed into a liquid nitrogen). Devitrification and crystallization from supercooled state (peaks *1* and *2*) either are not registered, or strongly decreased on the intensity in cell suspensions in comparison with homogenous systems — solutions of cryoprotective substances or supernatant liquid. Probably to obtain frozen suspensions of erythrocytes with a higher degree of vitrification the higher concentrations of vitrifying cryoprotectice agents are necessary.

REFERENCES

1. *Belous A.M., Shrago M.I., Pushkar N.S.* Cryopreservatives.– Kiev: Naukova Dumka, 1979.– P. 107–120.
2. *Vorotilin A.M.* Blood cell freezing down to –196 °C under the protection of low molecular glycols and glycerol. An enhancement of the cryopreservation efficiency // Kriobiologiya.– 1985.– № 3.– P. 15–20.
3. *Vorotilin A.M., Zinchenko A.V., Moiseyev V.A., Podoprigora L.P.* The mechanism of eryhthrocyte damage during freezing // Kriobiologiya.– 1990.– № 3.– P. 23–27.
4. *Zinchenko A.V.* Investigation of phase transitions of multiatom alcohols in the temperature range of –150 ÷ 0 °C. Author abstract of the thesis for obtaining the PhD (physics and mathematics).– Kiev, 1983.– P. 20.
5. *Zinchenko A.V., Petrenko A.Yu.* Low temperature phase transitions in the medium for cryopreservation of hepatocytes on the basis of DMSO // Physical and Chemical Processes in Cryobiological Systems: Coll of Sci. Works.– Kharkov, 1991.– P. 56–60.
6. *Farrant J., Woolgar A.E.* Human red cells under hypertonic conditions: A model system for investigating freezing damage. 1. Sodium chloride // Cryobiology.– 1972.– 9.– P. 9–15.
7. *Ren H.S., Wei Y., Hua T.C., Zhang J.* Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions // Cryobiology.– 1994.– 31, № 1.– P. 47–56.
8. *Spieles G., Kresin M., Loges K. Sputtek A. et al.* The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes // Cryobiology.– 1995.– 32, № 4.– P. 366–378.
9. *Wiest S.C., Steponkus P.L.* The osmotic behavior of human erythrocytes // Cryobiology.– 1979.– 16.– P. 101–104.

Accepted in 26.01.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.612.1.111:547.42

UDC 57.043.612.1.111:547.42

Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1. Морфологический аспект взаимодействия

Л. Г. КУЛЕШОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-Alcohol series. Part 1. Morphological aspect of interaction

L. G. KULESHOVA

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

Методами световой микроскопии и ^{1}H-ЯМР-спектроскопии исследовано влияние растворов неэлектролитов ряда Н-спиртов на морфологию эритроцитов человека и оценен их коэффициент распределения Q между клеткой и средой. Установлено, что в стационарном состоянии между формой эритроцитов и характером перераспределения неэлектролитов в системе "клетка–среда" существует взаимосвязь.

Методами світлової мікроскопії та ^{1}H-ЯМР-спектроскопії досліджено вплив розчинів неелектролітів ряду Н-спиртів на морфологію еритроцитів людини та оцінено їх коефіцієнт розподілу Q між клітиною і середовищем. Встановлено, що в стаціонарному стані між формою еритроцитів і характером перерозподілу неелектролітів в системі "клітина–середовище" існує взаємозв'язок.

The authors studied the effect of the solutions of non-electrolytes of H-alcohol series on morphology of human erythrocytes and their distribution coefficient (Q) between a cell and medium by means of light microscopy and ^{1}H-NMR. An interaction between erythrocyte shape and the character of non-electrolytes redistribution in the "cell–medium" system in stationary state was found.

В норме эритроцит представляет собой двояковогнутый диск, геометрические параметры которого обеспечивают ему уникальную способность к деформации. Под влиянием различных факторов (состава среды, ее тоничности, механических воздействий, лекарственных препаратов, патологических процессов в организме и т.д.) эритроциты теряют свою нативную форму. Мембрана эритроцита является тем первичным звеном, которое прежде всего отвечает на внешнее воздействие, а его форма – индикатором изменений, произошедших в мембране. При этом трансформация может протекать с образованием либо наружных спикул на мембране, кренирования (эхиноцитоз), либо инвагинированных клеток чашевидной формы (стоматоцитоз). Характер трансформации эритроцитов в растворах различных веществ определяется физико-химическими свойствами среды [3, 6].

В работе проведен анализ взаимосвязи морфологических изменений эритроцитов под влиянием неэлектролитов ряда Н-спиртов и характера их распределения в системе "клетка–среда".

Объектом исследований была донорская кровь человека, консервированная в растворе "Глюгицир" со сроком хранения до 4-х суток при 4 °С. Эритроциты получали из цельной крови путем ее троекратного центрифугирования в физиологическом

In the norm an erythrocyte is a concaved disk, geometrical paramters of which provide unique deformability. Under the influence of different factors (medium composition, its tonicity, mechanical effects, medical preparations, pathological processes in the organism etc.) erythrocytes lose their native shape. Erythrocyte membrane is an initial link answering, first of all, for external effect, but its shape is the indicator of change, occured inside membrane, thereat the transformation can proceed with speacule formation on the crenation membrane (echinocytosis) or invaginated cells of cup-like shape (stomatocytosis). The character of erythrocyte transformation in different substance solutions is determined by physical and chemical medium conditions [3, 6].

An analysis of the correlation of the erythrocyte morphological changes under the effect of non-electrolytes of H-alcohol series and the character of their redistribution in the "cell-medium" system was conducted in the work.

Human donor's blood, preserved in "Glugicir" solution with the term of storage up to 4 days at 4 °C was the object of the study. Erythrocytes were obtained from the whole blood by means of its thrice-repeated centrifugation in physiological solution (0,15 M of NaCl) during 5 min at 1 200g with following plasm separation from a dense suspension. Mor-

Матеріал, захищений авторським правом

растворе (0,15 М NaCl) в течение 5 мин при 1 200*g* с последующим отделением плазмы от плотной суспензии. Морфологические исследования проводили методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Ответ клеток на введение реагентов оценивали в капле крови, которую помещали между двумя покровными стеклами и равномерно распределяли тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне фиксировать их форму, начиная с 30 с реакции [1]. Регистрацию морфологической картины взаимодействия эритроцитов с растворами неэлектролитов проводили через 10 мин после начала контакта. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов использовали общепринятую классификацию, приведенную в [7].

Исследован следующий ряд неэлектролитов: этанол, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоль с молекулярным весом 400, 600, 1500. Растворы готовили на 15 мМ фосфатном буфере и 150 мМ NaCl (*pH* 7,4). Для исключения влияния собственно тоничности среды на форму эритроцитов эксперименты проводили в условиях постоянства внеклеточного осмотического давления в пределах 750 ± 50 мОсм/л. Осмолярность растворов контролировали на осмометре ОМКА 1Ц-01.

Как указывалось выше, в экспериментах были использованы эритроциты, отмытые физиологическим раствором. Представляло интерес проанализировать состояние клеток до помещения их в растворы неэлектролитов. Из рис. 1, *в* следует, что перенос клеток из плазмы (рис. 1, *а*) в физиологический раствор приводит к кренированию эритроцитов. При этом эритроциты значительно уменьшаются в поперечном сечении, что свидетельствует об их трансформации в сфероэхиноциты. Перенос эритроцитов из плазмы в фосфатный буфер также сопровождается резким уменьшением поперечного сечения клеток, однако эхиноцитоз не отмечается. Клетки имеют сглаженную поверхность мембраны с четко выраженной центральной ямкой (рис. 1, *б*), наличие которой характерно для куполообразных форм эритроцитов (стоматоцит третьей степени или сферостоматоцит).

При переносе эритроцитов из физиологического раствора в фосфатный буфер наблюдается исчезновение мембранных спикул (рис. 1, *г*). Клетки принимают форму, аналогичную приведенной на рис. 1, *б*.

Таким образом, предварительный морфологический анализ состояния эритроцитов показал, что последующие исследования проводились на исходно кренированных клетках. Наличие же в среде фосфат ионов нивелирует эхиноцитоз отмытых физиологическим раствором эритроцитов, трансформируя их в инвагинированные формы. В связи

phological studies have been carried out by the method of light microscopy by means of MBI-15U with photo registration of the morphological blood picture. The cell response to the reagent introduction was estimated in blood drop, located between two integumentary glasses and evenly redistributed by a thin layer. Thereat erythrocytes were in suspended state, that allowed to fix their shape thoroughly, beginning from 30 s of the reaction [1]. Morphological picture registration of the erythrocyte interaction with non-electrolyte solutions was conducted in 10 min after the contact beginning. In morphological estimation of shape peculiarities and superficial erythrocyte architectonics the classification, generally accepted was used [7].

The following non-electrolyte series were studied: ethanol, 1,2-propanediol, polyethylenglycol with molecular mass of 400, 600, 1500. The solutions were prepared by the 15 mM phosphate buffer and 150 mM of NaCl (*pH* 7.4). For the effect exclusion of the medium tonicity itself on the erythrocyte shape the experiments were carried out under the conditions of extracellular osmotic pressure in the range of 750 ± 50 mOsm/l. Solution osmolarity was controlled by means of OMKA 1C-01 osmometer.

As it has been mentioned above, erythrocytes washed-out by physiological solution, were used in experiments. It offered a great interest to analyse the cell state before their location in non-electrolyte solutions. As follows from Fig. 1, *в* the cell transfering from plasma (Fig. 1, *а*) into the physiological solution leads to erythrocyte crenation. Thereat erythrocytes considerably decrease in the cross-section, that testifies to their transformation into spheroechinocytes. Erythrocyte transfering from plasma into phosphate buffer is accompanied by a sharp decrease of the cell cross-section, but echinocytosis is not observed. The cells have smooth membrane surface with a well expressed centrai cavity (Fig. 1, *б*), which presense is characteristic for dome-like erythrocytes (stomatocytosis of the third level of spherostomatocytosis).

During the erythrocyte transfering from the physiological solution into phosphate buffer the membrane speacule disappearence is observed (Fig 1, *г*). The cells take a shape analogous to one given in Fig. 1, *б*.

Thus, preventive morphological analysis of the erythrocyte state has shown that the following studies have been carried out in initial crenated cells. The presense of phosphate-ions in medium runs a level of the ehinocytosis of erythrocytes washed-out by means of physiological solutions, transforming them into invaginated forms. In this connection the membrane irregularity appearance can be considered as specific effect of non-electrolyte.

Micropictures series, given in Fig. 2, illustrate the erythrocyte morphological response to non-electrolytes of H- alcohol series introduction. As follows to Fig. 2, *а* and *б*, the erythrocyte reaction on the introduction of 2% ehtanol solution and 2,7% of 1,2-

Матеріал, захищений авторським правом

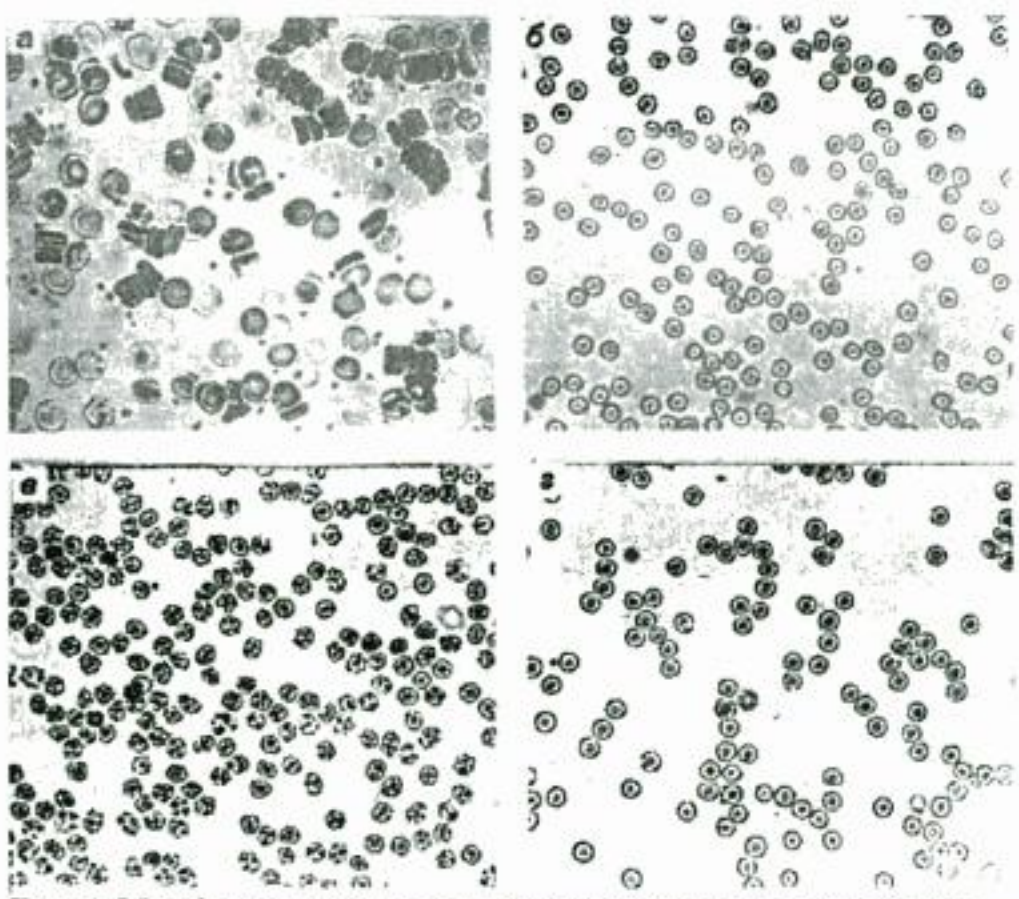


Рис. 1. Морфоэритрограммы донорской крови человека: *а* — цельная кровь; *б* — замена плазмы фосфатным буфером; *в* — замена плазмы физиологическим раствором; *г* — замена физиологического раствора фосфатным буфером. Увеличение при съемке ×200

Fig. 1. Morphoerythrogramms of human donor's blood: *а* — whole blood; *б* — plasm substitution by phosphate buffer; *в* — plasm substitution by physiological solution; *г* — substitution of the physiological solution by phosphate buffer. ×200 magnification when taking photos

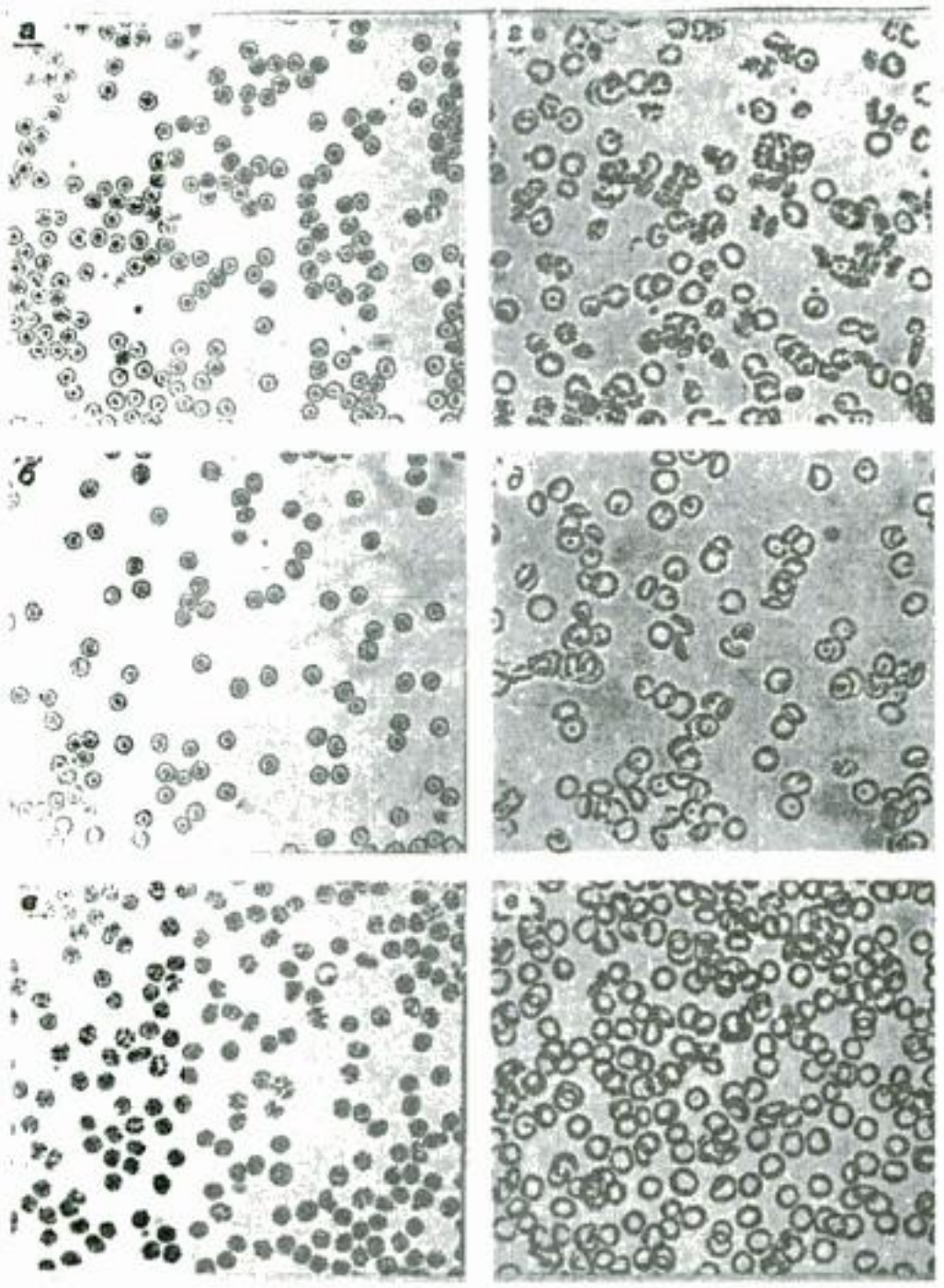


Рис. 2. Трансформация эритроцитов в растворах Н-спиртов (*pH* 7,4): *а* — 2%-й раствор этанола; *б* — 2,7%-й раствор 1,2-пропандиола; *в* — 3,3%-й раствор глицерина; *г* — 8,4%-й раствор ПЭГ-400; *д* — 10,2%-й раствор ПЭГ-600; *е* — 15%-й раствор ПЭГ-1500. Увеличение при съемке ×200

Fig. 2. Erythrocyte transformation in the H-alcohol solutions (*pH* 7.4): *а* — 2% ethanol solution; *б* — 2,7% 1,2-propanediol solution; *в* — 3,3% glycerol solution; *г* — 8,4% PEG-400 solution; *д* — 10,2% PEG-600 solution; *е* — 15% PEG-1500 solution. ×200 magnification when taking photos

с этим возникновение нерегулярности мембраны можно рассматривать как специфическое действие самого неэлектролита.

Серия микрофотографий, приведенная на рис. 2, иллюстрирует морфологический ответ эритроцитов на введение неэлектролитов ряда Н-спиртов. Как следует из рис. 2, *а* и *б*, реакция эритроцитов на введение 2,0%-го раствора этанола и 2,7%-го 1,2-пропандиола практически одинакова. Клетки трансформируются в куполообразные формы с различной глубиной и геометрией центральной ямки (сферостоматоцитоз). Реакция эритроцитов на введение 3,3%-го раствора глицерина сопровождается не только уменьшением размера клеток, но и формированием на поверхности мембраны многочисленных спикул, что указывает на выраженный сфероэхиноцитоз (рис. 2, *в*).

Качественно иной оказалась реакция клеток на введение растворов полиэтиленгликолей различной молекулярной массы. Так, суспендирование эритроцитов в 8,4%-м растворе ПЭГ-400 приводит к уплощению клеток (планоцитоз) и их обезвоживанию, о чем свидетельствуют увеличение поперечного сечения клеток, истончение тороидального ободка и увеличение диаметра центральной ямки. У преобладающего большинства эритроцитов отмечается нерегулярность мембраны в виде многочисленных спикул на тороидальном ободке (дискоэхиноцитоз, рис. 2, *г*). Реакция эритроцитов на введение 10,2%-го раствора ПЭГ-600 также сопровождается уплощением и обезвоживанием клеток. В поле зрения наблюдаются деформированные клетки неправильной формы разнообразной кон-

propanediol is practically equal. The cells transformed into dome-like shapes with different depth and geometry of the central hole (spherostomatocytosis). Erythrocyte response to introduction of 3,3% of glycerol solution is accompanied not only by the decrease of cell size, but by the formation of majority of speacules on membrane surface, that testifies to an expressed spheroechinocytosis (Fig. 2, *в*).

The cell response to the introduction of polyethylenglycol solutions with different molecular mass appeared to be qualitatively different. Thus, erythrocyte suspending in 8,4% PEG-400 solution leads to the cell flattening (planocytosis) and to dehydration of them, and increase of cell cross-section, toroid ring getting thinner and increase of central hole diameter testifies to this. Membrane irregularity in a shape of numerous speacules on toroid ring observes in the majority of erythrocytes (discoechinocytosis, Fig. 2, *г*). Erythrocyte response to the introduction of 10,2% PEG-600 solution also accompanies by the cell flattening and dehydration. Deformed cells of anamalous forms with different configuration are observed in

Матеріал, захищений авторським правом

фигурации. Дискоэхиноцитоз заметно снижен (рис. 2, *д*). Существенным отличием реакции эритроцитов на введение 15%-го раствора ПЭГ-1500 явилось отсутствие при обезвоживании деформированных клеток, а также сглаженность мембран. Клетки в основном чашевидной формы (стоматоцитоз второй степени, рис. 2, *е*).

Таким образом, сравнительный анализ реакции эритроцитов на введение в суспензию клеток исследованных Н-спиртов выявил принципиальную разницу в морфологическом ответе клеток для проникающих низкомолекулярных (этанол, 1,2-пропандиол, глицерин) и непроникающих высокомолекулярных (ПЭГ-400, ПЭГ-600, ПЭГ-1500) полимерных соединений. При взаимодействии эритроцитов с проникающими спиртами прослеживается сферолизация клеток с формированием как спикул на поверхности мембран, сфероэхиноцитоз (глицерин), так и сглаженных форм, сферостоматоцитоз (этанол, 1,2-пропандиол). В противном случае наблюдается обезвоживание эритроцитов, дискоэхиноцитоз (ПЭГ-400 – выраженный, ПЭГ-600 – умеренный), стоматоцитоз (ПЭГ-1500). Полученные результаты подтверждают представления о качественно различном механизме действия данных соединений прежде всего на клеточную мембрану [2].

Теоретические объяснения многообразия форм эритроцитов, обусловленных действием различных факторов, основаны на представлении о мембране как об упругой оболочке, обладающей упругостью изгиба [4, 5]. При этом существенную роль играет спонтанная кривизна мембраны K_s, которая представляет собой кривизну мембраны в ненапряженном состоянии. Нормальная клетка (дискоцит) соответствует отрицательной спонтанной кривизне. Если же спонтанная кривизна мембраны K_s отрицательна и не превосходит по абсолютной величине некоторое критическое значение, то клетка приобретает форму стоматоцита. Если же мембрана эритроцита имеет положительную спонтанную кривизну, т.е. стремится выгнуться выпуклостью наружу, то эритроцит трансформируется в эхиноцит. Возникновение спонтанной кривизны мембраны в соответствии с гипотезой "бислойной пары" может быть обусловлено различием площадей монослоев мембраны. При этом, если площадь внешнего монослоя больше внутреннего, то спонтанная кривизна K_s положительна, в противном случае – отрицательна. Другими словами, если молекулы воздействующего на эритроциты вещества способны встраиваться во внешний мембранный монослой, то увеличивается его площадь и кривизна бислоя сдвигается в положительном направлении, следовательно, эритроцит приобретает эхиноцитарную форму. Если же молекулы вещества встраиваются во внутренний монослой, спонтанная кривизна бислоя становится более отрицательной, что приводит к стоматоцитозу. Кроме того, возник-

a vision field. Discoechinocytosis decresed noticeably (Fig. 2, *д*). A considerable distinction of the erythrocyte reaction on the introduction of 15% PEG-1500 solution was the absense of deformed cells during the dehydration as well as membrane smoothing. Cells have, in general, cup-like shape (stomatocytosis of the second stage, Fig. 2, *е*).

Thus, the comparative study of erythrocyte response to the studied H-alcohol cell introduction into suspension revealed a principal difference in the morphological cell response to penetrating low-molecular (ehtanol, 1,2-propanediol, glycerol) and for non-penetrating highly-molecular (PEG-400, PEG-600, PEG-1500) polymer compounds. During erythrocyte interaction with penetrating alcohols the cell spherolization with the speacule formation on the membrane surface , spheroechynocytes (glycerol) and also smoothed forms, spherostomatosytosis (ehtanol, 1,2-propanediol) is observed during the erythrocyte interaction. The erythrocyte dehydration, discoechinocytosis (PEG-400 – expressed, PEG-600 – moderate) and stomatocytosis (PEG-1500). Obtained data confirm the ideas about qualitatively different mechanism of these compounds effect, first of all, on the cell membrane [2].

Theoretical explanations of the variety of erythrocyte shapes, conditioned by the effect of different factors, based on the view about the membrane as elastic cover with an elastic bend [4, 5]. Spontaneous membrane curvature K_s, representing membrane curvature in non-strained state, plays thereat an important role. Normal cell (discocyte) corresponds to negative spontaneous curvature. If the membrane spontaneous curvature K_s is negative and not exceeds some critical value on the absolute value, then the cell gains stomatocyte shape. If erythrocyte membrane has positive spontaneous curvature, that is going to bend by the convexity outside, then erythrocyte transforms into echinocyte. Membrane spontaneous curvature appearance in the accordance with "bilayer pair" hypothesis may be conditioned by the distinction of membrane monolayer areas. Thereat, if the area of outer monolayer is bigger than inner, then the spontaneous K_s curvature is positive, in opposite case – negative. By another words, if molecules of the substance, affecting erythrocytes are able to build into the outer membrane monolayer, then its area increases and bilayer curvature moves into positive direction and, therefore, the erythrocyte acquires an echinocyte form. If molecules of substances build into the inner monolayer, then bilayer spontaneous curvature become more negative, that leads to stomatocytosis. Besides that, spontaneous curvature appearance could be conditioned by the asymmetrical effective molecule shape, entering into membrane structure, and by asymmetrical redistribution of electric charge between outer and inner membrane surfaces. It has been shown in the work [7] that erythrocyte transformation is controlled by osmotic pressure of the spectrine gel and

Матеріал, захищений авторським правом

новение спонтанной кривизны может быть обусловлено асимметричной эффективной формой молекул, входящих в состав мембраны, а также асимметричным распределением электрического заряда между внешней и внутренней поверхностями мембраны. В работе [7] показано, что трансформация эритроцитов контролируется осмотическим давлением спектринового геля и поверхностным натяжением наружной и цитоплазматической частей липидного бислоя мембраны. При положительном отношении поверхностных натяжений двух частей бислоя и большой положительной или отрицательной величине осмотического давления наиболее вероятно образование эхиноцитарных форм, при небольших абсолютных значениях всех трех величин — чашевидной или двояковогнутой формы. Вполне понятно, что изменение состояния спектринового геля и физико-химических свойств цитоплазматических мембран при суспендировании клеток в растворах различных веществ может быть как следствием прямого взаимодействия веществ с мембраной, так и развиваться в процессе проникновения веществ внутрь клетки [8].

Изложенные далеко не полные представления о вероятных механизмах трансформации эритроцитов послужили основанием изучения перераспределения неэлектролитов ряда Н-спиртов между клеткой и средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кулешова Л.Г.* Гипотермическая устойчивость формы эритроцитов человека как оценка степени выраженности патологического процесса // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 1.– С. 48–52.
2. *Кулешова Л.Г.* Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1983.– 23 с.
3. *Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф.* Изучение кинетики взаимодействия эритроцитов человека с криопротекторами и солями // Криобиология и криомедицина.– 1980.– № 7.– С. 40–44.
4. *Маркин В.С.* Организация мембран в плоскости слоя и форма клетки. Биологические следствия теории // Биофизика.– 1981.– XXVI.– Вып. 1.– С. 158–167.
5. *Черный В.В., Пауличке М.* Влияние амфимиальных молекул на форму эритроцитов // Биол. мембраны.– 1990.– Т. 7, № 8.– С. 838–842.
6. *Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. и др.* Влияние криопротекторов на биологические системы.– Киев: Наук. думка, 1989.– 238 с.
7. *Bessis M.* Living Blood Cells and their Ultrastructure.– Berlin, Heidelberg, New-York. 1973.– 767 p.
8. *Stokke B.J., Mikkelsen A., Elgsaeter A.* The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 2. Numerrical analyses of cell shapes and shape transformftions // Eur. Biophys.J.– 1986.– V. 13, № 47.– P. 213–233.

Поступила 15.10.98

by the superficial tension of outer and cytoplasmatic parts of lipit membrane bilayer. At positive relation of superficial tensions of two bilayer parts and high positive or negative value of the osmotic pressure, the appearance of the echinocyte shapes is most probable when the absolute values of all three sizes of cup-like or concave form. It is clear that the state exchange of spectrine gel and of physical and chemical cytoplasmatic membrane characteristics during the cell suspending in different substance solution can be the cause of a direct interaction of the membrane with substances and develop during the process of substance penetration inside cell [8].

Given ideas, not quite complete, about the probable mechanisms of the erythrocyte transformation were the base for studying the non-electrolyte redistribution of H-alcohol series between the cell and the medium.

REFERENCES

1. *Kuleshova L.G.* Hypothermal stability of human erythrocyte shape as accounting of expressing degree of the pathological process // Problemy kriobiologii.– 1988.– № 1.– P. 48–52.
2. *Kuleshova L.G.* Ice-formation kinetics in living cells and modal systems: Author's abstract of thesis for obtaining Phd (biology) scientific degree.– Kharkov, 1983.– 23 p.
3. *Kuleshova L.G., Rozanov L.F.* The study of human erythrocyte interaction kinetics with salines and cryoprotectants // Kriobiologiya i kriomeditsina.– 1980.– № 7.– P. 40–44.
4. *Markin V.S.* Membrane organization in the layer surface and the cell shape. Biological causes of the theory // Biofizika.– 1981.– XXVI, № 1.– P. 158–167.
5. *Chernyi V.V., Paulichke M.* The effect of amphimial molecules on the erythrocyte shape // Biol. membrany.– 1990.– 7, № 8.– P. 838–842.
6. *Yurchenko T.N., Kozlova V.F., Skornyakov V.A. et al.* The cryoprotectant effect onto the biological systems.– Kiev, Nauk. dumka, 1989.– 238 p.
7. *Bessis M.* Living Blood Cells and their Ultrastructure.– Berlin, Heidelberg, New-York. 1973.– 767 p.
8. *Stokke B.J., Mikkelsen A., Elgsaeter A.* The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 2. Numerical analyses of cell shapes and shape transformations // Eur. Biophys.J.– 1986.– 13, № 47.– P. 213–233.

Accepted in 15.10.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.11.15

UDC 612.11.15

Влияние различных концентраций натрия хлорида на состояние гемоглобина внутри эритроцитов

С. Х. МЕЖИДОВ, Е. Д. РОЗАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

The effect of sodium chloride of different concentrations on the state of haemoglobin inside erythrocytes

S. KH. MEZHIDOV, E. D. ROZANOVA

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

Методом дифференциальной спектрофотометрии изучено влияние различных концентраций натрия хлорида на состояние гемоглобина внутри эритроцитов. Установлено, что при концентрации натрия хлорида 0,4 моль/л происходит длинноволновый сдвиг отрицательного максимума первой производной спектра поглощения (ППСП) при 293 нм, характерного для триптофана, при концентрациях выше 3,6 моль/л — коротковолновый. Кроме того, отмечается структурированье ППСП белка с повышением концентрации натрия хлорида до 3,6 моль/л.

Методом диференціальної спектрофотометрії вивчено вплив різних концентрацій натрію на стан гемоглобіну усередині еритроцитів. Встановлено, що при концентрації натрію хлориду 0,4 моль/л відбувається довгохвильовий зсув негативного максимуму першої похідної спектра поглинання (ІІПСП) при 293 нм, характерного для триптофану, а при концентраціях вище 3,6 моль/л — короткохвильовий. Окрім того, відзначається структурування ІІПСП білка з підвищенням концентрації натрію хлориду до 3,6 моль/л.

The effect of different sodium chloride concentrations on the state of haemoglobin inside erythrocytes was studied by the method of differential spectrophotometry. It has been established, that long-wave shift of negative maximum of the first derivative of absorption spectrum (FDAS) at 293 nm taking place at sodium chloride concentration 0.4 M/l, what is tryptophan characteristic, at concentations higher 3.6 M/l — short-wave displacement. Besides that, the structurization of FDAS protein with the increase of sodium chloride concentration up to 3.6 M/l is observed.

В настоящее время структурно-функциональное состояние внутриклеточного белка на этапах криоконсервирования изучено недостаточно [2, 3, 9]. При проведении исследований методом спектрофотометрии во время процессов замораживания-отогрева трудно учесть вклад белка, который в результате разрушения клеток оказался во внеклеточной среде. Тем не менее можно получить достаточно полную информацию о состоянии внутриклеточного белка в экспериментах, которые моделируют изменения состояния внутриклеточной среды, происходящие в процессе замораживания-отогрева. Одним из таких факторов является гиперконцентрация солей, возникающая в процессе кристаллизации внеклеточной воды [1]. Цель работы — изучение влияния концентрированных растворов натрия хлорида на состояние внутриэритроцитарного гемоглобина методом дифференциальной спектрофотометрии. Наиболее подходящим биообъектом для таких исследований является эритроцит, так как 95% его белка составляет внутриклеточный гемоглобин [7].

Для проведения исследований использовали эритроциты донорской крови человека, хранившиеся в течение 3–4 сут при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали 3 раза физиологическим раствором натрия хлорида, приготовленным на

Nowdays sructural-functional state of intracellular protein at the stages of cryopreservation has been insufficiently studied [2, 3, 9]. When conducting the investigations by the method of spectrophotometry during freezing-thawing processes it is difficult to take into the account protein contribution, which in a result of cell damage was found in intracellular medium. Nevertheless, it is possible to receive sufficiently complete information about the intracellular protein state in experiments, modelling changes of intracellular medium state, occured in freezing-thawing process. One of such factors is salt hyperconcentration appearing in crystallization process of extracellular water [1]. The aim of the work is to study the effect of sodium chloride concentrated solutions on the intraerythrocyte haemoglobin state by the method of differential spectrophotometry. The most suitable bioobject for such studies is erythrocyte, because 95% of its protein is intracellular haemoglobin [7].

Erythrocytes of human donor's blood, stored during 3–4 days at 4 °C were used for carrying out the investigations. Before the experiment conducting the erythrocytes were washed out three times by means of physiological solution of sodium chloride, prepared on 5 mM/l sodium phosphate buffer, $pH = 7.2$. Erythrocytes were centrifuged on the laboratory cen-

Матеріал, захищений авторським правом

5 ммоль/л натрий-фосфатном буфере, $pH = 7{,}2$. Центрифугировали эритроциты на лабораторной центрифуге ОПн-3 при 3 000 об/мин 15 мин. Затем эритромассу разводили физиологическим раствором в 16–20 раз и суспензию хранили на водяной бане со льдом. Перед исследованием эту суспензию взбалтывали и добавляли в растворы натрия хлорида 1:20, выдерживали 10 мин и записывали спектры поглощения в диапазоне длин волн 325–260 нм. Этот же образец сразу центрифугировали, записывали спектр надосадка для учета вклада внеклеточной среды и дифференцировали для получения ППСП. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре PAY UNICAM SP-8000 (Англия). Температура в кюветах поддерживалась 20 ± 1 °C путем термостатирования.

Очищенный гемоглобин получали на хроматографической колонке с сефадексом G-100, уравновешенной физиологическим раствором. Все растворы готовили весовым методом из реактивов марки ХЧ или ЧДА. Эксперименты проведены на крови 3-х доноров II группы Rh(+), $n = 9$.

Типичные ППСП эритроцитов в ультрафиолетовой (УФ) области приведены на рис. 1. Поскольку основным белком эритроцитов является гемоглобин [8], то это спектры поглощения внутриклеточного гемоглобина. Чтобы убедиться в правильности этого предположения, были получены красные тени, содержание гемоглобина в которых было в 6 раз меньше, чем в эритроцитах. Интенсивность спектра поглощения последних в ультрафиолетовой области уменьшалась пропорционально изменению концентрации гемоглобина в диапазоне 260–325 нм. Кроме того, для сравнения была вычислена ППСП очищенного гемоглобина (рис. 1), структура которой практически не отличается от ППСП гемоглобина, находящегося внутри эритро-

trifuge OPn-3 at 3 000 rot/min during 15 min. Then erythromass was diluted by means of physiological solution in 16–20 times and the suspension was stored on a water-bath with ice. Before the investigation this suspension was shaken and added into sodium chloride solutions in the ratio 1:20, exposed within 10 min and the absorption spectra were registered in the range of 325–260 nm wave length. This sample was centrifuged at once, the supernatant spectrum was registered for the contribution accounting of extracellular medium and differentiated for FDAS obtaining. The absorption spectra were registered by spectrophotometer PAY UNICAM SP-8000 (England). By means of thermostating the temperature in cuvettes was maintained 20 ± 1 °C.

Haemoglobin washing-out was obtained by means of chromatographic column with Sephadex G-100, balanced by means of physiological solution. All solutions were prepared by the weight method from reagents of chemically pure or pure for analysis model. Experiments were conducted on blood of 3 donors of the II group Rh(+), $n = 9$.

Typical FDAS of erythrocytes in UV region are shown in Fig. 1. As the main erythrocyte protein is haemoglobin [8], then these are absorption spectra of intracellular haemoglobin. In order to be sure in the correctness of this supposition the pink ghosts were received,the haemoglobin content in those was in 6 times lower than in erythrocytes. Intensity of absorption spectrum of the latter in UV region decreased proportionally to the haemoglobin concentration change in the range of 260–325 nm. Besides that the FDAS of washed haemoglobin (Fig. 1) which structure practically does not differ from FDAS of haemoglobin inside erythrocytes, was calculated for comparative study. It is known [6] that the human haemoglobin molecule keeps 6 tryptophane and

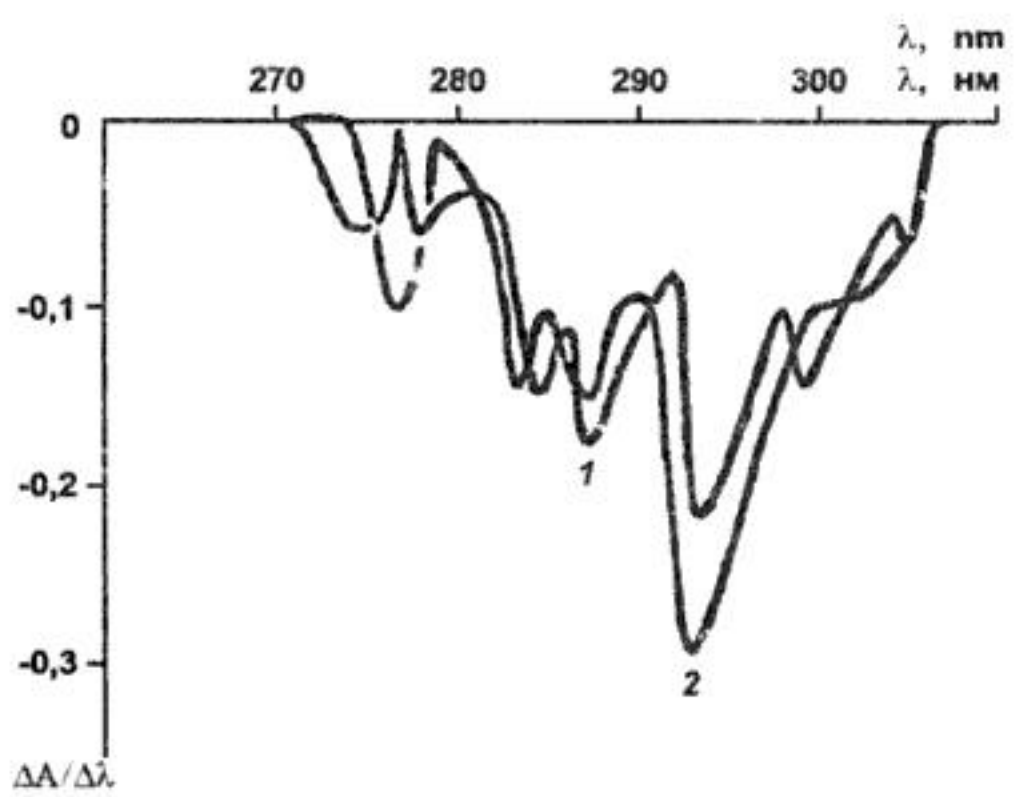


Рис. 1. Первая производная спектров поглощения гемоглобина: *1* — эритроциты в растворе натрия хлорида 0,15 моль/л; *2* — гемоглобин, очищенный на хроматографической колонке

Fig. 1. The first derivative of haemoglobin absorption spectra: *1* — erythrocytes in 0.15 M/l solution of sodium chloride; *2* — haemoglobin, washed-out in chromatographic column

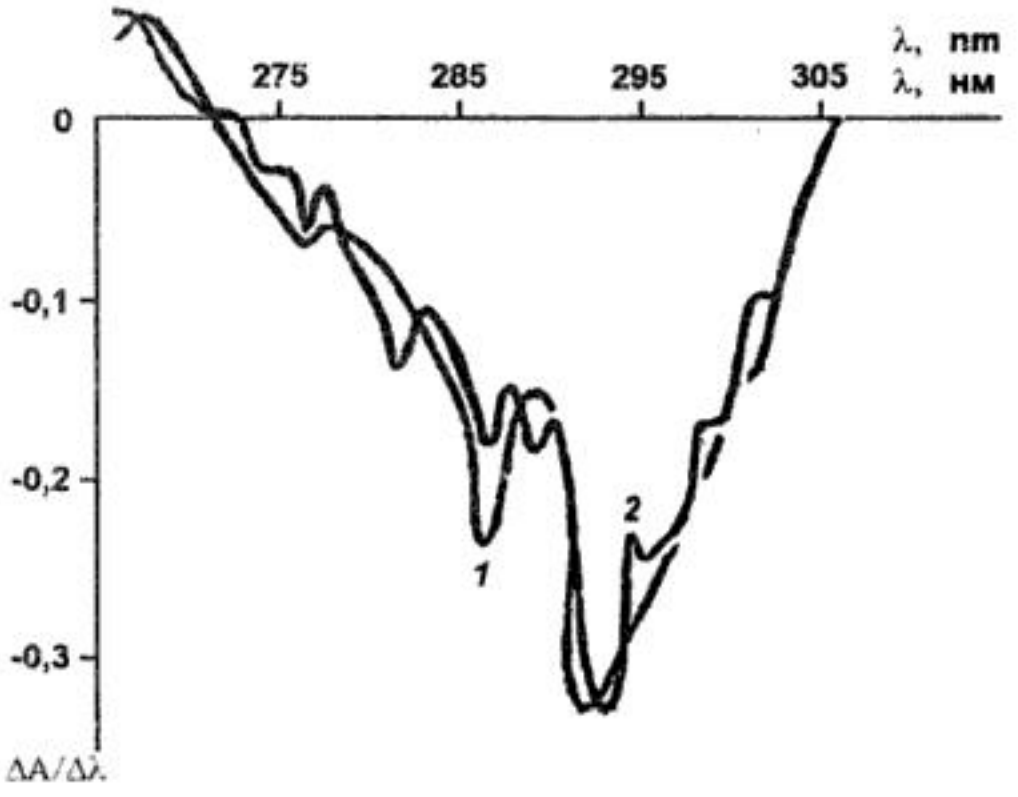


Рис. 2. Первая производная спектров поглощения гемоглобина: *1* — эритроциты в растворе натрия хлорида 0,15 моль/л; *2* — эритроциты в растворе натрия хлорида 0,40 моль/л

Fig. 2. The first derivative of haemoglobin absorption spectra: *1* — erythrocytes in 0.15 M/l solution of sodium chloride; *2* — erythrocytes in 0.40 M/l solution of sodium chloride

Матеріал, захищений авторським правом

цитов. Известно [6], что молекула гемоглобина человека содержит 6 триптофановых и 12 тирозиновых остатков. Так как молярный коэффициент экстинкции триптофана почти в 5 раз больше, чем у тирозина [5], то основной вклад в УФ спектр гемоглобина вносит триптофан. Хорошо выраженные отрицательные максимумы при 293 нм характерны именно для триптофана [5]. В отрицательные максимумы при 284–288 нм вносят вклад тирозин и триптофан[5]. Отрицательный максимум при 298–305 нм обусловлен скорее всего остатками триптофана [4].

Перевод эритроцитов в раствор натрия хлорида с концентрацией 0,40 моль/л приводит к изменению ППСП гемоглобина (рис. 2), и для всех доноров отмечаются смещение максимума триптофана при 293 нм в длинноволновую область, уменьшение интенсивности отрицательного максимума тирозина при 286–288 нм и структурирование ППСП. Согласно данным [1], при такой концентрации натрия хлорида во внеклеточной среде ионы натрия не проникают в клетку, но при этом происходят обезвоживание эритроцитов и концентрирование внутриклеточного содержимого. Причинами длинноволнового смещения максимума ППСП триптофана при 293 нм может быть либо уменьшение полярности окружающей среды, либо изменение конформации белка, в результате чего часть остатков триптофана становится менее доступной полярному растворителю.

Уменьшение интенсивности отрицательного максимума при 288 нм, по-видимому, обусловлено наложением максимума тирозина на минимум триптофана из-за длинноволнового смещения спектра первого [4].

Поскольку длинноволновый сдвиг отрицательных максимумов, относящихся к тирозину (276, 283 нм), не наблюдается, то можно предположить, что изменения структуры ППСП обусловлены изменением конформации гемоглобина, происходящей в процессе обезвоживания клетки. Возможно, это отчасти связано с изменением содержания различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина).

Об изменении содержания форм внутриэритроцитарного гемоглобина свидетельствуют наши данные, которые подтверждают, что в растворах натрия хлорида уменьшается содержание оксигемоглобина и увеличивается содержание дезокси- и метгемоглобина. Известно [10], что при дезоксигенации оксигемоглобина предпоследний с С-конца остаток тирозина, который был доступен растворителю, в дезоксигемоглобине оказывается в щели между F- и H-спиралями и закреплен там частично за счет ван-дер-ваальсовых контактов со спиралями, а частично водородных связей между ОН-группой тирозина и карбонильной группой валина [8, 10]. Такие изменения и могут привести к длинно-

12 thyrosine rests. As molar coefficient of tryptophane extinction almost in 5 times higher than in thyrosine [5], so tryptophane contributes mainly in UV haemoglobin spectrum. Well expressed negative maxima at 293 nm are characteristic for tryptophane [5]. Thyrosine and tryptophane [5] contribute negative maxima at 284–288 nm. A negative maximum at 298–305 nm is stipulated, probably, by thyrosine rests [4].

Erythrocyte transfering into sodium chloride solution with 0.40 M/l concentration leads to haemoglobin FDAS change (Fig. 2) and shift of tryptophane maximum at 293 nm in long-wave region, decrease of intensity of thyrosine negative maximum at 286–288 nm and FDAS structurization was observed in all donors. According to the data [1] at such sodium chloride concentration in extracellular medium sodium ions do not penetrate inside a cell but erythrocyte dehydratation and intracellular content concentration occured at this time. The causes of long-wave transference of tryptophane maximum at 293 nm may be decrease of environment polarity or protein conformation change, in a result of which the part of tryptophane rests became less accessible to polar solvent.

The decrease of negative maximum intensity at 288 nm, probably, stipulated by thyrosine maximum superposition on tryptophane minimum due to of long-wave spectrum transference of the first [4].

As long-wave transfer of the negative maxima related to thyrosine (276, 283 nm) not observe, so one can suppose that the changes of FDAS structure conditioned by haemoglobin conformation change occured in cell dehydration process. Probably, that it is partly connected with the changes of different forms of haemoglobin content (oxy-, dezoxy-, methaemoglobin).

Our data, confirming that in sodium chloride solutions the content of oxyhaemoglobin decreases and dezoxy- and methaemoglobin content increases to, testify about the change of the content of intraerythrocyte haemoglobin forms. It is known [10] that at oxyhaemoglobin dezoxygenation next to last from the C-end the thyrosine rest, accessible to solvent, in dezoxyhaemoglobin is found in a slit between F and H-spirals and partly by hydrogenous contacts between OH-group of thyrosine and carbonile group of valine [8, 10]. Such changes can lead to long-wave transfer of absorption spectrum of the part of thyrosine rests [5].

During the increase of the NaCl concentration in solution up to 1.2 M/l a part of cells begin to swell [1] in the result of membrane permeability damage for sodium ions. The changes in FDAS structure, testified to the increasing of polarity of intracellular medium observed: the negative maximum transfer from 295 to 293 nm, but long-wave maximum at 302 nm stays without changes. Such FDAS form remains at NaCl concentration 2 M/l too, when a part of erythrocytes damage. It should be noted, that with the increase of

Матеріал, захищений авторським правом

волновому смещению спектра поглощения части остатков тирозина [5].

При увеличении концентрации NaCl в растворе до 1,2 моль/л часть клеток в результате нарушения проницаемости их мембран для ионов натрия начинает набухать [1]. Наблюдаются изменения в структуре ППСП, свидетельствующие об увеличении полярности внутриклеточной среды: смещение отрицательного максимума 295 → 293 нм, однако длинноволновый максимум сохраняется при 302 нм. Такая же форма ППСП сохраняется и при концентрации NaCl 2 моль/л, когда часть эритроцитов разрушается. Следует отметить, что с увеличением концентрации натрия хлорида происходит структурирование ППСП гемоглобина, что видно из ППСП при концентрации натрия хлорида 0,4 и особенно 3,6 моль/л (рис. 3). Это, по-видимому, связано с тем, что аминокислотные остатки триптофана и тирозина находятся в различном окружении в результате концентрирования гемоглобина, изменения его конформации, возможно, его агрегации в некоторых участках цитозоля в результате действия высоких концентраций электролита. Следует отметить, что при концентрации натрия хлорида 3,6 моль/л повреждается более 60% эритроцитов и сохраняются клетки, наиболее устойчивые к действию концентрированных солей. В этих условиях происходит разбаланс биохимических реакций, протекающих в эритроцитах, о чем свидетельствуют данные об увеличении содержания метгемоглобина с $12{,}3 \pm 4{,}1\%$ в физиологическом растворе до $20{,}1 \pm 3{,}3\%$ в растворе натрия хлорида 3,6 моль/л.

Таким образом, в концентрированных солевых растворах гемоглобин внутри эритроцитов претерпевает конформационные изменения, которые связаны не только с влиянием концентрации солей, но и с изменением состава внутриклеточной среды и, по-видимому, концентрированием самих молекул гемоглобина, что приводит к длинно- или коротковолновому смещению максимума ППСП гемоглобина эритроцитов в зависимости от концентрации натрия хлорида и структурированию ППСП гемоглобина в гипертонических растворах.

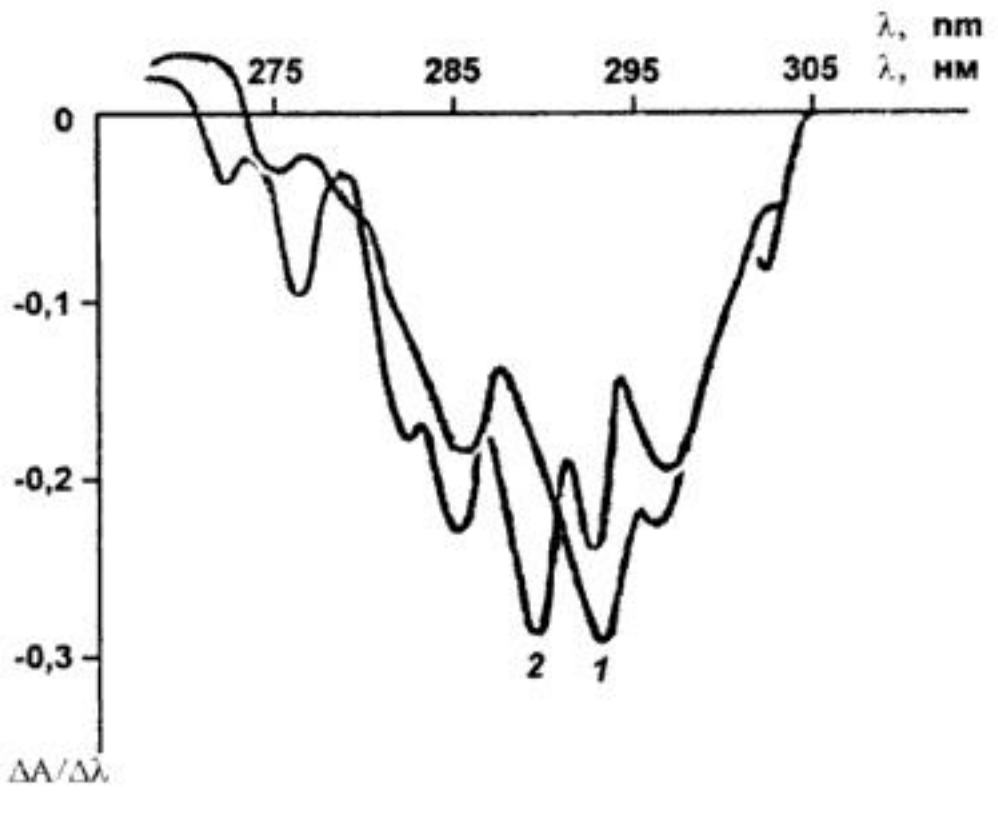


Рис. 3. Первая производная спектров поглощения гемоглобина: *1* — эритроциты в растворе натрия хлорида 0,15 моль/л; *2* — эритроциты в растворе натрия хлорида 3,60 моль/л

Fig. 3. The first derivative of haemoglobin absorption spectra: *1* — erythrocytes in 0.15 M/l solution of sodium chloride; *2* — erythrocytes in 3.60 M/l solution of sodium chloride

sodium chloride concentration the structurization of haemoglobin FDAS is occured, what is seen from FDAS at NaCl concentration 0,4 and especially 3.6 M/l (Fig. 3). This is connected, apparantly, with the fact: aminoxyde tryptophane and thyrosine rests are in different surroundings and in a result of haemoglobin concentrating, its conformation change, probably, its aggregation in some cytosole sections in a result of high concentrations of electrolyte effect. It should be said, that at NaCl concentrations 3.6 M/l more than 60% of erythrocytes damage and cells more stable to concentrative salt effect preserve. Under such conditions the disbalance of biochemical reactions, taking place in erythrocytes, occurs and the data about the increase of methaemoglobin content from $12.3 \pm 4.1\%$ in physiological solution up to $20.1 \pm 3.3\%$ in NaCl solution 3.6 M/l testify to this.

Thus, haemoglobin inside erythrocytes in concentrated salines is underwent the conformation changes, connected not only with the effect of salt concentration, but with the change of intracellular medium compound and, apparantly, by the concentrating of haemoglobin molecules, that leads to long-wave or short-wave transfer of FDAS maximum of haemoglobin erythrocytes depending on NaCl concentration and FDAS structuring of haemoglobin in hypertonic solutions.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бондаренко В.А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук.– Харьков.– 1988.– 450 с.
2. *Грек А.М.* Изучение некоторых биохимических механизмов действия низких температур и криопротекторов на эритроциты: Дис. ... канд. биол. наук.– М., 1979.– 132 с.
3. *Грищенко В.И., Межидов С.Х., Моисеев В.А., Нардид О.А.* Влияние температуры и концентрации различных веществ на микровязкость цитозоля эритроцитов // Биофизика.– 1995.– 40, № 1.– С. 106–109.
4. *Демченко А.П.* Температурные эффекты в электронных спектрах поглощения и структура белков // Молекулярная биология.– 1976.– № 2.– С. 305–313.
5. *Демченко А.П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков – Киев: Наук. думка, 1981.– 208 с.

REFERENCES

1. *Bondarenko V.A. Erythrocyte temperature shock development and prevention: Author's abstract of Doctor's (biology) thesis.– Kharkov.– 1998.– 450 p.*
2. *Grek A.M. Study of some biochemical mechanisms of low temperature and cryoprotectant effect on erythrocytes: Author's abstract of PhD (biology) thesis .– M., 1979.– 132 p.*
3. *Grischenko V.I., Mezhidov S.Kh., Moiseyev V.A., Nardid O. A.* The effect of temperature and different substances concentrations onto erythrocyte cytosole microviscosity // Biofizika.– 1995.– 40, № 1.– P. 106–109.

Матеріал, захищений авторським правом

6. *Ленинджер А.* Основы биохимии.– М.: Мир, 1985.– Т. 1.– 366 с.
7. *Нормальное* кроветворение и его регуляция / Под ред. Н.А. Федоровой.– М.: Медицина, 1976.– 543 с.
8. *Стародуб Н.Ф., Рекун Г.М., Шурьян И.М.* Радиационное поражение гемоглобина.– Киев: Наук. думка, 1976.– 130 с.
9. *Цымбал Л.В., Моисеев В.А.* Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов // Пробл. криобиологии - 1992.– № 2.– С. 13–20.
10. *Шаронов Ю.А., Шаронова Н.А.* Структура и функция гемоглобина // Молекулярная биология.– 1975.– № 9.– С. 145–172.

Поступила 21.07.98

4. *Demchenko A.P.* The temperature effects in electronic absorption spectra and protein structure // Molecularnaya biologiya.– 1976.– № 2.– P. 305–313.
5. *Demchenko A.P.* UV spectrophotometry and the protein structure.– Kiev: Nauk. dumka.– 1981.– 208 p.
6. *Lenidzher A.* Biochemical bases.– M.: Mir, 1985.– V. 1.– 366 p.
7. *Normal* hemopoiesis and its regulation / Ed. by N.A. Fedorova.– M.: Meditsina, 1976.– 543 p.
8. *Starodub N.S., Rekun G.M., Shuryan I.M.* Haemoglobin radioactive damage.– Kiev: Nauk. dumka, 1976.– 130 p.
9. *Tsymbal L.V., Moiseyev V.A.* The cryoprotectant effect onto membrane-combined and cytosole erythrocyte proteins // Problemy kriobiologii.– 1992.– № 2.– P. 13–20
10. *Sharonov Yu.A., Sharonova N.A.* The haemoglobin structure and function // Molekularnaya biologiya.– 1975.– № 9.– P. 145–172.

Accepted in 21.07.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043:612.35.014.41

UDC 57.043:612.35.014.41

О значении перекисных процессов в гибели криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых и голодных крыс

А. Ю. ПЕТРЕНКО, А. Д. РОСЛЯКОВ, О. В. ОЧЕНАШКО, Н. Н. МОИСЕЕВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

On the role of lipid peroxidation in the death of cryopreserved hepatocytes isolated from fed and fasted rats

A. YU. PETRENKO, A. D. ROSLYAKOV, O. V. OCHENASHKO, N. N. MOISEYEVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Исследованы интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и способность свежеизолированных и криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых и голодных крыс, переживать инкубацию в среде без субстратов. Установлено, что гепатоциты, выделенные из сытых крыс, сохраняют интактность плазматической мембраны и удерживают на низком уровне интенсивность перекисных процессов в течение 120 мин инкубации в минимальной солевой среде. При инкубации гепатоцитов, выделенных из голодавших в течение 3-х суток животных, наблюдается времязависимая гибель клеток, которая сопровождается индукцией ПОЛ. Антиоксидант подавляет развитие ПОЛ и замедляет гибель клеток. После криоконсервирования и отделения поврежденных клеток в градиенте плотности перколла жизнеспособность суспензий сохраняется на уровне свежеизолированных и не зависит от условий питания животных. Исходный уровень ПОЛ не изменяется после криоконсервирования, но более резко возрастает при инкубации гепатоцитов голодных крыс. Параллельно с индукцией ПОЛ увеличивается процент поврежденных клеток в суспензии. После криоконсервирования антиоксидант подавляет индукцию перекисных процессов, но не предотвращает гибель клеток голодных крыс. Авторы полагают, что ПОЛ не является существенным фактором криоповреждения, а индуцируется в необратимо поврежденных клетках.

Досліджено інтенсивність перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і здатність свіжоізольованих і кріоконсервованих гепатоцитів, виділених з ситих та голодних щурів, переживати інкубацію в середовищі без субстратів. Встановлено, що гепатоцити, виділені з ситих щурів, зберігають інтактність плазматичної мембрани і утримують на низькому рівні інтенсивність перекисних процесів протягом 120 хв інкубації у мінімальному сольовому середовищі. При інкубації гепатоцитів, виділених з тварин, що голодували протягом 3-х діб, спостерігається залежна від часу загибель клітин, яка супроводжується індукцією ПОЛ. Антиоксидант подавляє розвиток ПОЛ і уповільнює загибель клітин. Після кріоконсервування і виділення пошкоджених клітин у градієнті щільності перколла життєздатність суспензій зберігається на рівні свіжоізольованих і не залежить від умов годування тварин. Вихідний рівень ПОЛ не змінюється після кріоконсервування, але більш різко підвищується при інкубації гепатоцитів голодних щурів. Паралельно з індукцією ПОЛ збільшується відсоток пошкоджених клітин у суспензії. Після кріоконсервування антиоксидант подавляє індукцію перекисних процесів, але не запобігає загибелі клітин голодних щурів. Автори вважають, що ПОЛ не є суттєвим фактором кріоушкодження, а індукується у необоротно пошкоджених клітинах.

The intensity of lipid peroxidation (LPO) and the ability of freshly-isolated and cryopreserved hepatocytes, isolated from fed and fasted rats to survive the incubation in the minimal-salt solution have been investigated. It has been established that the hepatocytes isolated from fed rats keep the integrity of plasma membrane and retain the intensity of lipid peroxidation at a low level during 120 min of the incubation in a salt solution. When incubating hepatocytes isolated from animals being starved within 3 days, a time-depending death of cells which is accompanied by LPO induction has been observed. An antioxidant suppresses the LPO development and slows down the cell death. After cryopreservation and separation of damaged cells in percoll introduction density gradient, the viability of suspensions remains at the level of freshly-isolated ones and does not depend on nutrition conditions of animals. LPO initial level has not been changed after cryopreservation, but more sharply increases during the incubation of fasted rat's hepatocytes. The percentage of damaged cells in the suspension increases simultaneously with LPO induction. After cryopreservation an antioxidant suppresses the induction of peroxidative processes, but does not prevent the cell death of fasted rats. The authors suggest that LPO is not a significant cryodamage factor, but is induced in irunreversibly damaged cells.

Долгое время ПОЛ рассматривали как один из основных факторов криоповреждения [1]. В работах [8, 11] подвергнута сомнению возможность существенной активации перекисных процессов в цикле замораживания-отогрева. Более вероятна индукция ПОЛ после криовоздействия в результате смещения метаболического равновесия в клетке. Действительно в настоящее время ПОЛ рассматри-

LPO has been considered for a long time as one of principal factors of cryodamage [1]. In the works [8, 11] the possibility of a considerable activation of lipid peroxidation in freeze-thawing cycle was contradictory. LPO induction is more probable after low temperature procedure as a result of metabolic balance shifting in a cell. Really, LPO is observed now as one of the exchange mechanisms of membrane components

Матеріал, захищений авторським правом

вают как один из механизмов обмена компонентов биомембран [2]. В физиологических условиях скорость ПОЛ контролируется "системой глутатиона", использующей донором восстановительных эквивалентов NADPH, т.е. зависит от соотношения активностей путей, генерирующих и потребляющих этот нуклеотид. Отсюда вытекает, что снижение общего метаболического потенциала клетки может повысить чувствительность ПОЛ к внешним воздействиям. Одним из путей снижения метаболического потенциала необходимо рассматривать голодание, так как при этом истощаются эндогенные запасы клетки, например гликогена [7].

В [9] было показано, что при возвращении суспензии криоконсервированных гепатоцитов в физиологические условия в ходе инкубации часть клеток повреждается. Процессы, приводящие к гибели в этих условиях, могут иметь биохимическую природу, и ПОЛ можно рассматривать как один из таких процессов. Результаты исследования, направленные на выяснение роли перекисных процессов в гибели клеток, противоречивы [1, 5, 6, 10, 11]. Цель данной работы — исследование динамики ПОЛ и жизнеспособности при инкубации интактных и криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых и голодных крыс.

Эксперименты проводились на гепатоцитах, выделенных неферментативным методом [4] из печени самок крыс линии Вистар с массой тела 200–250 г. Контрольная группа животных находилась на обычном пищевом рационе, опытная группа голодала в течение 3-х суток. Часть гепатоцитов криоконсервировали под защитой 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО). Процедура криоконсервирования, включающая быстрое двухэтапное замораживание до –196 °С с остановкой при –25 °С. была описана в [9]. Для сравнения результатов, полученных на свежеизолированных и криоконсервированных гепатоцитах, суспензию деконсервированных клеток очищали в растворе перколла [9]. В результате очистки жизнеспособность клеток, определенная по окрашиванию трипановым синим (0,5%-й раствор), до и после криоконсервирования практически не отличалась.

Инкубацию свежеизолированных и деконсервированных клеток (на протяжении 2-х часов) проводили при температуре 37 °С в Кребс-Гензелейт бикарбонатном буфере, дополнительно содержащем 25 mM HEPES и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА, фракция V).

Интенсивность перекисного окисления определяли по накоплению продуктов, дающих цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой. Для этого через каждые 30 мин инкубации 1,5 мл суспензии с концентрацией клеток $2 \cdot 10^6$/мл смешивали с 0,5 мл 30%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Содержание ТБК-активных продуктов определяли в кислом безбелковом экстракте после окрашивания 1%-м раствором тиобарбитуровой кислоты при 532 нм [2].

Из рис. 1, *а* видно, что жизнеспособность суспензий гепатоцитов, выделенных из сытых и голод-

[2]. Under physiological conditions LPO rate is controlled by the "glutathione system", using NADPH as a donor of reduced equivalents, i.e. depending on the ratio of the pathways activities generating and using this nucleotide. The fact is that a decrease in general metabolic potential can increase LPO sensitivity to external effects resulted in it. It is necessary to consider the starvation as one of the pathwayss of metabolic potential decrease, because thereby the endogenous reserves of a cell, glycogen [7], for example, are exhausted.

In [9] it has been shown that during the removal of cryopreserved hepatocyte suspension into physiological conditions a part of cells is damaged during the incubation. The processes resulting in the death under these conditions may be of biological nature and LPO may be considered as one of such processes. The results of the study directed at the revealing of the role of lipid peroxidation in cell death are contradictory [1, 5, 6, 10, 11]. The aim of given work is to study LPO dynamics and the viability of intact and cryopreserved hepatocytes isolated from fed and fasted rats during the incubation.

Experiments were conducted in hepatocytes isolated by means of non-enzymatic method [4] from the liver of rat's females of Wistar line with a body mass of 200–250 g. A control group of animals had an ordinary ration, an experimental one starved within 3 days. A part of hepatocytes was cryopreserved under 10% dimethylsulfoxide (DMSO) protection. The procedure of cryopreservation including rapid two-stage freezing down to –196 °C was described in [9]. In order to compare the results obtained in freshly isolated and cryopreserved hepatocytes, the suspension of cryopreserved cells was purified in Percoll solution [9]. As a result of the purification the viability of cells determined by trypane blue staining (0,5% solution) was not practically distinguished before and after cryopreservation.

The incubation of freshly isolated and frozen-thawed cells (within 2 hours) was carried out at 37 °C temperature in Krebs–Henseleit bicarbonate buffer, additionally containing 25 mM HEPES and 1% bovine serum albumin (BSA, fraction V).

The intensity of peroxidation was determined by the product accumulation giving a coloured reaction with thiobarbituric acid. For this aim in each 30 min of the incubation, 1.5 ml of suspension with cell concentration of $2 \cdot 10^6$/ml were mixed with 0.5 ml of 3-chloroacetic acid 30% solution. The content of TBA-active products was determined in an acid without protein extraction after staining by 1% solution of thiobarbituric acid at 532 nm [2].

As it is seen from Fig. 1, *a* the viability of hepatocyte suspensions isolated from fed and fasted rats did not differ and made not less than 80%. During an isothermal incubation in a salt solution without substrate the viability of hepatocytes isolated from fed rats did not change within all time of the observation

Матеріал, захищений авторським правом

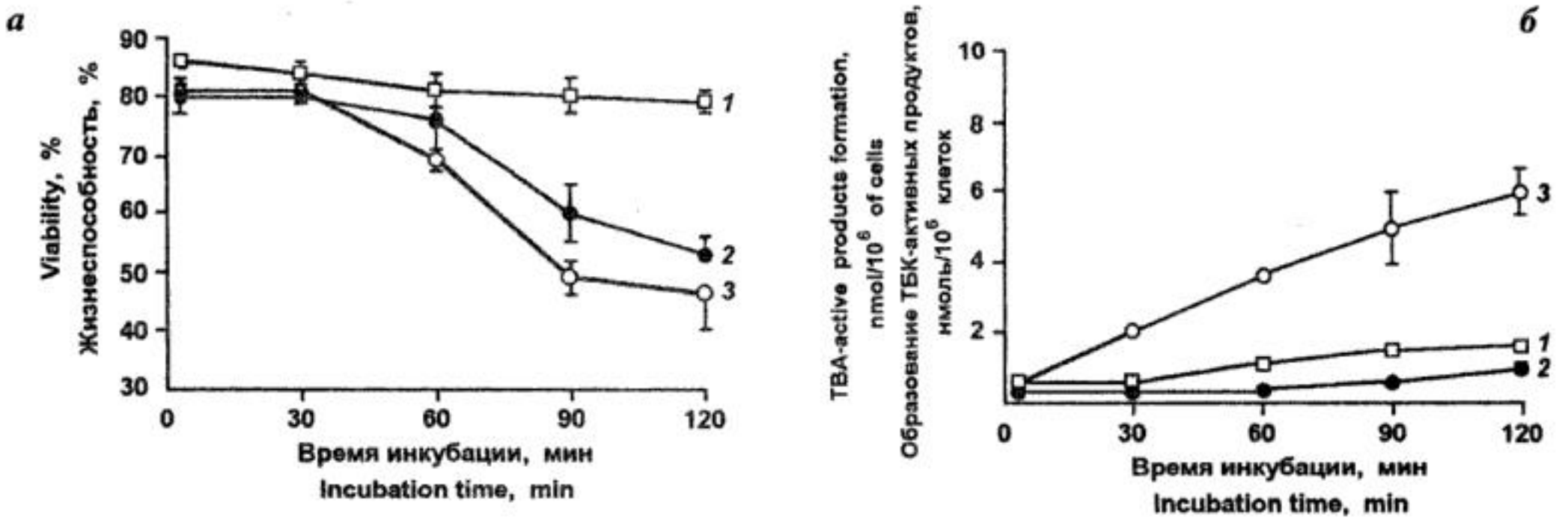


Рис. 1. Изменение жизнеспособности (*а*) и содержания ТБК-активных продуктов (*б*) в течение инкубации свежеизолированных гепатоцитов, выделенных из печени сытых (*1*) или голодных (*2, 3*) крыс при отсутствии (*3*) либо присутствии антиоксиданта (*2*)

Fig. 1. The change of the viability (*a*) and TBA-active products (*b*) during the incubation of freshly-isolated hepatocytes, isolated from the liver of fed (*1*) or fasted (*2, 3*) rats at the antioxidant absence (*3*) or presence (*2*)

ных крыс, не отличалась и составляла не менее 80%. В процессе изотермической инкубации в минимальной солевой среде без субстратов жизнеспособность гепатоцитов, выделенных из сытых крыс, не изменялась в течение всего времени наблюдения (2 ч). Клетки, полученные из голодных животных, были способны сохранять целостность первые 30 мин инкубации, через 1 ч жизнеспособность уменьшалась, а через 1,5 ч количество погибших клеток в суспензии достигало 50% и практически не изменялось на последнем этапе (90–120 мин) инкубации. Введение в состав среды инкубации антиоксиданта ионола (20 мкМ) не предотвращало, но замедляло гибель гепатоцитов, полученных из голодных крыс (рис. 1, *а*). Так, достоверное снижение жизнеспособности суспензии было обнаружено через 90 мин инкубации. Действие ионола носило временный характер и через 2 ч инкубации значения жизнеспособности гепатоцитов голодных крыс в присутствии и при отсутствии антиоксиданта не отличались.

Из рис. 1, *б* видно, что содержание ТБК-активных продуктов в гепатоцитах, выделенных из сытых животных, оставалось на низком уровне в ходе всей инкубации. В то же время при инкубации клеток печени голодных крыс наблюдалось накопление продуктов ПОЛ. При этом достоверные различия в содержании ТБК-активных продуктов были выявлены уже на 30-й минуте инкубации, т.е. в то время, когда жизнеспособность суспензии не отличалась от ее начальных значений и уровня сытых животных (рис. 1, *а*). Это может свидетельствовать о вовлечении перекисных процессов в гибель клеток голодных крыс при инкубации, а с другой стороны, может быть связано с более высокой чувствительностью биохимического метода определения ТБК-активных продуктов по сравнению с морфологическим. Присутствие антиоксиданта в среде инкубации подавляло индукцию перекисного окисления липидов (рис. 1, *б*).

В результате очистки криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых и голодных

(2 hrs). Cells obtained from fasted animals were capable to keep the integrity during first 30 min of the incubation, in 1 hr the viability decreased and in 1.5 hrs a number of dead cells in suspension reached 50% and did not practically change at the last incubation stage (90–120 min). The introduction of butylated hydroxytoluene antioxidant (20 μM) into the composition of incubation medium did not prevent but slowed the death of hepatocytes obtained from fasted rats (Fig. 1, *a*). Thus, a significant decrease in a suspension viability was revealed in 90 min of the incubation. The butylated hydroxytoluene effect had a temporary character and in 2 hrs of the incubation the values of hepatocyte viability of fasted rats in the presence and absence of an antioxidant did not differ.

As it is seen from Fig. 1, *б* the content of TBA-active products in hepatocytes isolated from fed animals remained at a low level during all the incubation. At the same time during liver cell incubation of fasted rats the accumulation of LPO products was observed. thereby statistically significant differencies in the content of TBA-active products were already revealed on the 30th min of incubation, i.e. at the time when suspension viability did not distinguish from its initial values and from the level of fed animals (Fig. 1, *a*). This fact can testify to an advantage of lipid peroxidation involving in the death of cells of fasted rats during the incubation, but on the other hand it is connected with a higher sensitivity of biochemical method of TBA-active product determination in comparison with a morphological one. The presence of an antioxidant in incubation medium supressed the induction of lipid peroxidation (Fig. 1, *б*).

As a result of the purification of cryopreserved hepatocytes isolated from fed and fasted rats, their viability did not differ from the level of freshly-isolated ones in percoll introduction density gradient. But the removal of frozen-thawed cells isolated both from fed and fasted animals into a salt solution caused the death of approximately 10% of cells (Fig. 2, *a*). During the following incubation the viability of cryo-

Матеріал, захищений авторським правом

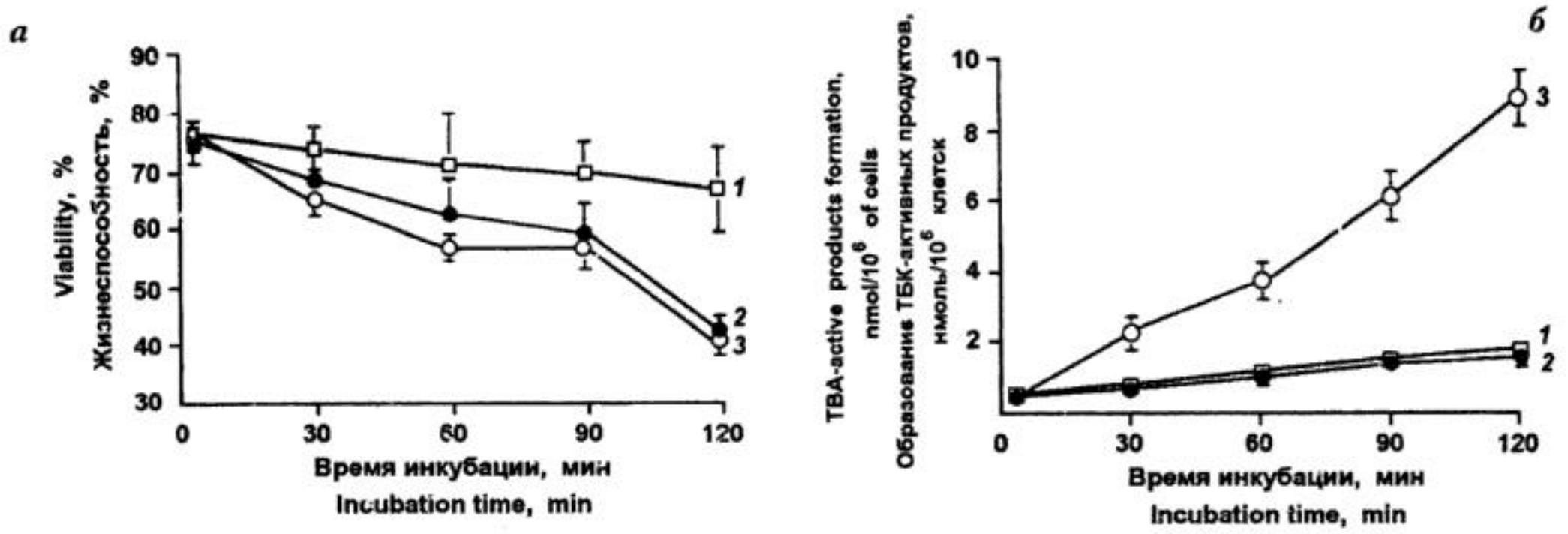


Рис. 2. Изменение жизнеспособности (*а*) и содержания ТБК-активных продуктов (*б*) в течение инкубации криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из печени сытых (*1*) или голодных (*2, 3*) крыс при отсутствии (*3*) либо присутствии антиоксиданта (*2*)

Fog. 2. The change of the viability (*a*) and TBA-active products (*b*) during the incubation of cryopreserved hepatocytes, isolated from the liver of fed (*1*) or fasted (*2, 3*) rats at the antioxidant absence (*3*) or presence (*2*)

крыс, в градиенте плотности перколла их жизнеспособность не отличалась от уровня свежеизолированных. Однако перенесение деконсервированных клеток, выделенных как из сытых, так и голодавших животных, в минимальную солевую среду вызывало гибель около 10% клеток (рис. 2, *а*). При дальнейшей инкубации жизнеспособность криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из сытых животных, медленно снижалась, но оставалась на достаточно высоком уровне (около 70%) даже после 2-х часов инкубации. Жизнеспособность гепатоцитов голодных крыс после криоконсервирования достоверно уменьшалась уже через 30 мин инкубации, а через 120 мин составляла около 40% (рис. 2, *а*). Параллельно снижению жизнеспособности в суспензии криоконсервированных гепатоцитов голодных крыс активировались перекисные процессы (рис. 2, *б*). При этом уровень ТБК-активных продуктов после криоконсервирования нарастал быстрее, чем в свежеизолированных клетках. Антиоксидант полностью подавлял развитие перекисных процессов в криоконсервированных гепатоцитах, выделенных из голодных крыс, но практически не влиял на снижение жизнеспособности.

Способность клеток переживать инкубацию в минимальной солевой среде без субстратов можно рассматривать не только как модель клинического применения гепатоцитов для экстракорпоральной гемоперфузии, но и как тест на устойчивость к неблагоприятным условиям. Действительно, если гепатоциты, выделенные из сытых крыс, сохраняют жизнеспособность в течение 2-х часов инкубации, то истощенные по эндогенным субстратам гепатоциты голодных животных начинают гибнуть уже через 1 ч инкубации. В это время гибель клеток из голодных животных можно предотвратить введением антиоксиданта в среду инкубации, что указывает на роль перекисных процессов в повреждении клеток. Наиболее вероятным механизмом индукции ПОЛ при голодании является ингибирование глутатион-пероксидазной активности, которая в норме контролируется высоким соотношением восстанов-

preserved hepatocytes isolated from fed animals slowly decreased but remained on a quite high level (about 70%) even after 2 hrs incubation. The viability of hepatocytes of fasted rats after cryopreservation statistically significant decreased already in 30 min of the incubation, but in 120 min made about 40% (Fig. 2, *a*). Lipid peroxidation were activated simultaneously with a decrease in the viability of fasted rat cryopreserved hepatocytes in the suspension (Fig. 2, *б*). thereby the level of TBA-active products after cryopreservation increased more rapidly than in freshly-isolated cells. The antioxidant completely suppressed the development of lipid peroxidation in cryopreserved hepatocytes isolated from fasted rats, but did not practically affect the decrease in the viability.

The ability of cells to survive the incubation into a salt solution without substrate can be considered not only as a model of hepatocyte clinical application for extracorporal hemoperfusion, but and as a test on the resistance to unfavourable conditions. In fact, if hepatocytes isolated from fed rats keep the viability within 2 hrs of the incubation, then hepatocytes of fasted animals exhausted on endogenous substrate begin to die already in 1 hr of the incubation. At this moment the death of cells from fasted animals may be prevented by means of an anioxidant introduction into the incubation medium, that points to the role of lipid peroxidation in cell damage. The inhibition of glutathione-peroxidase activity which is controlled, in the norm, by a high ratio of reduced and oxidized forms of glutathione is the most probable mechanism of LPO induction at the starvation. NADPH is a donor of reduced equivalents for glutathione system [4]. When starving due to an exhaustion of glycogen accumulations the activity of pentose-phosphate cycle [8], the main pathways of $NADP^+$ reduced in cell cytoplasma, is suppressed and, correspondingly, the degree of glutathione reduced decreases, the activity of glutathione-peroxidase is suppressed. In this case the antioxidant binding free radicals of lipid hydrop-

Матеріал, захищений авторським правом

ленных и окисленных форм глутатиона. Донором восстановительных эквивалентов для системы глутатиона является NADPH [4]. При голодании вследствие истощения запасов гликогена подавляется активность пентозо-фосфатного цикла [8] — основного пути восстановления $NADP^+$ в цитоплазме клетки — и соответственно снижается степень восстановленности глутатиона, угнетается активность глутатион-пероксидазы. В этом случае антиоксидант, связывая свободные радикалы гидроперекисей липидов, неразрушенные глутатион-пероксидазой, замедляет гибель клеток. Следует отметить, что антиоксидант предотвращает гибель гепатоцитов, выделенных из голодавших животных, лишь в очень узком временном интервале (60 мин), а затем его действие снижается и через 120 мин инкубации уже практически не проявляется.

В результате криоконсервирования часть клеток (около 20%) необратимо повреждается. Для исключения влияния этих клеток на способность интактных переживать инкубацию без субстрата поврежденные гепатоциты удаляли из суспензии путем ее очистки в градиенте плотности перколла. И хотя конечные густые суспензии криоконсервированных клеток по жизнеспособности не отличались от свежеизолированных, помещение их в физиологические условия (солевую среду при 37 °С) приводило к моментальной гибели достоверно значимой части (около 10%) клеток. При этом доля погибших клеток не зависела от условий питания животных-доноров и присутствия антиоксиданта в среде. В [9] было отмечено, что аналогичный эффект наблюдается при инкубации гепатоцитов в питательных средах, а также при введении различных субстратов. Можно полагать, что гибель данной популяции криоконсервированных гепатоцитов при возвращении в физиологические условия обусловлена не метаболическими нарушениями, а имеет физическую природу.

Гепатоциты, выделенные из сытых крыс и сохранившие целостность плазматической мембраны при криоконсервировании и переносе в физиологические условия, способны сохранять жизнеспособность и низкий уровень перекисных процессов при последующей 2-часовой инкубации в среде без субстратов. Учитывая, что инкубация в таких условиях требует кооперативного функционирования метаболических путей, реализующихся в различных компартментах, этот факт указывает на полное сохранение функции клеток при низкотемпературном консервировании.

Динамика гибели криоконсервированных гепатоцитов, выделенных из голодавших животных, в ходе инкубации несколько отличается от свежеизолированных. Во-первых, они не способны сохранять интактность плазматической мембраны даже в течение первых 30 мин. Во-вторых, резкое снижение жизнеспособности наблюдается на последнем этапе инкубации, когда число погибших клеток снижается на 15%, а также в криоконсервированных гепатоцитах из голодных животных отмечается более высокая скорость накопления ТБК-активных

eroxides, which are not destroyed by glutathione-peroxidase, slows down the death of cells. It should be noted that the antioxidant prevents the death of hepatocytes isolated from animals being starved only in a very short time interval (60 min), and then its action decreases and in 120 min of the incubation has not practically manifested yet.

As a result of cryopreservation a part of cells (about 20%) is unreversibly damaged. Impaired hepatocytes were removed from the suspension by means of its purification in percoll introduction density gradient in order to exclude the effect of these cells on the ability of intact ones to survive the incubation without substrate. And though final dense suspensions of cryopreserved cells did not differ from freshly-isolated ones by on the viability, their location under physiological conditions (saline medium at 37 °C) resulted in an instant death of a statistically significant part (about 10%) of cells. thereby a fraction of dead cells did not depend on nutrition conditions of animals-donors and on the presence of an antioxidant in the medium. It has been noted [9] that an analogous effect is observed during the incubation in cultural media, as well as when introducing various substrate. One can suppose that the death of given population of cryopreserved hepatocytes during the returning in physiological conditions is not stipulated by metabolic impairments, but has a physical nature.

Hepatocytes isolated from fed rats and kept the integrity of plasma membrane during the cryopreservation and the shifting into physiological conditions are capable to keep the viability and a low level of lipid peroxidation at following 2 hrs incubation in the medium without substrates. Taking into consideration the fact that the incubation under such conditions requires a co-operative functioning of metabolic pathways which are realized in different compartments, it points to a complete integrity of cell function at low temperature preservation.

The dynamics of cryopreserved hepatocyte death isolated from fasting animals during the incubation slightly differs from freshly-isolated ones. First of all, they are not capable to keep the integrity of plasma membrane even during first 30 min. Secondly place, a sharp decrease in the viability has been observed at the last stage of the incubation when a number of dead cells decreases by 15%, as well as in cryopreserved hepatocytes from fasted animals a higher rate of TBA-active product accumulation in comparison with freshly-isolated ones has been noted. thereby a question on cause and effect relationship between LPO induction and cell death has appeared. The fact of the absence of a statistically significant protective effect of antioxidant on the ability of frozen-thawed cells of fasted rats to survive the incubation may be the answer. In fact, if the butylated hydroxytoluene completely prevents LPO induction and does not affect the decrease in the viability, then hepatocytes death is stipulated by other causes requiring a special inves-

Матеріал, захищений авторським правом

продуктов по сравнению со свежеизолированными. При этом возникает вопрос о причинно-следственной взаимосвязи индукции ПОЛ и гибели клеток. Ответом может служить факт отсутствия достоверного защитного действия антиоксиданта на способность деконсервированных клеток голодных крыс переживать инкубацию. Действительно, если ионол полностью предотвращает индукцию ПОЛ и не влияет на снижение жизнеспособности, значит, гибель гепатоцитов обусловлена другими причинами, требующими специального исследования, а перекисные процессы активируются в мертвых клетках и направлены на их разборку.

Данные настоящей работы не позволяют рассматривать ПОЛ как один из основных факторов криоповреждения, поскольку уровень ТБК-активных продуктов не изменяется после криоконсервирования гепатоцитов, выделенных как из голодных, так и сытых крыс.

Очевидно, что эффективность применения гепатоцитов для трансплантации больным с печеночной недостаточностью во многом зависит от исходного состояния донора и, в частности, от режима его питания. Особенно это важно при использовании ксеногенного материала (например, в устройстве искусственная печень, включающем гепатоциты свиньи), когда исходное состояние органа донора может быть легко изменено. Вместе с тем этот вопрос остается малоизученным. Результаты работы показывают, что для органозаместительной функции целесообразно использовать гепатоциты сытых животных. Клетки, выделенные из голодных животных, более чувствительны к продолжительной инкубации в среде без субстрата, а также к другим неблагоприятным воздействиям. Так, при выделении гепатоцитов из голодных животных выход клеток на 1 г ткани был значительно ниже, чем из сытых. Кроме этого, в процессе криоконсервирования и очистки потери гепатоцитов, выделенных из голодных крыс, были более значительными. Следовательно, для трансплантации предпочтение следует отдавать донорам, находящимся на полноценном пищевом рационе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
2. *Владимиров Ю.А., Арчаков И.А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
3. *Гепатоцит*: функционально-метаболические свойства / Под ред. Л. Н. Лукьяновой.– М.: Наука, 1985.– 270 с.
4. *Петренко А.Ю., Андриенко А.Н., Кравченко Л.П. и др.* Некоторые характеристики состояния гепатоцитов крыс, изолированных неферментативным способом и инкубируемых *in vitro* // Цитология.– 1989.– 31, № 5.– С. 608–611.
5. *Пикфорд М.А., Сандин Б., Грин К.Дж. и др.* Воздействие аллопуринола и нифедипина на окислительное повреждение мембраны и функциональную выживаемость изотрансплантантов легкого крысы после 48 часов хранения // Тезисы международной конференции "Успехи современной криобиологии".– Харьков, 1992.– С. 141.
6. *Comparti M.* Biology of discase lipid peroxydation and cellular damage in toxic liver injury // Laboratory investigation.– 1985.– 53, № 6.– P. 599–625.

tigation, but lipid peroxidation are activated in dead cells and are directed at their diassembly.

The data of given work do not allow to consider LPO as one of principal factors of cryodamage, because the level of TBA-active products has not changed after cryopreservation of hepatocytes isolated from both fasted and fed rats.

This is evident that the efficiency of hepatocyte application for the transplantation to patients with hepatic insufficiency depends to a large extent on donor's initial state and, in particular, on his/her nutrition status. It is especially important when using a xenogenic material (for example, in artificial liver device including pig's hepatocytes), when the initial state of donor's organ may easily changed. At the same time, this question remains insufficiantly known. The results of the work show that for an organ-substituting function it is expedient to use hepatocytes of fed animals. Cells isolated from fasted animals are more sensitive to a prolonged incubation in the medium without substrate, as well as to another unfavourable effects. Thus, when isolating hepatocytes from fasted animals, the yield of cells on 1 g of tissue was considerably lower then from fed ones. Besides, during the process of cryopreservation and purification, the loss of hepatocytes isolated from fasted rats were more significant. So, the preference for the transplantation should be given to the donors, being on a valuable ration.

REFERENCES

1. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Structural changes of biological membranes at cooling.– Kiev: Nauk. Dumka, 1982.– 255 p.
2. *Vladimirov Yu.A., Archakov I.A.* Lipid peroxidation in biological membranes.– M.: Nauka, 1972.– 252 p.
3. *Hepatocyte*: functional and metabolic properties / Ed. by L. N. Lukyanova.– M.: Nauka, 1985.– 270 p.
4. *Petrenko A.Yu., Andrienko A.N., Kravchenko L.P. et al.* Some characteristics of rat's hepatocyte state, isolated by enzyme-free method and *in vitro* incubated //Cytologiya.– 1989.– 31, № 5.– P. 608–611.
5. *Pikford M.A., Sandin B., Green C.J. et al.* The effect of allopurinole and nyphedipine on membrane oxidative damage and functional survival of rat's lung isotransplant after 48 hrs storage // Abstracts of international conference "Progresses of modern cryobiology".– Kharkov, 1992.– P. 141.
6. *Comparti M.* Biology of discase lipid peroxydation and cellular damage in toxic liver injury // Laboratory investigation.– 1985.– 53, № 6.– P. 599–625.
7. *Mc Cune S.A., Durant P.J. et al.* Comparative studies on fatty acid syntesis, glucogen metabolism, and gluconeogenesis dy hepatocytes isolated from lean and obese zucker rats // Metabolism.– 1981.– 30, № 12.– P. 1170–1177.
8. *Petrenko A.Yu.* A mechanism of latent cryoinjury and reparation of mitochondria // Cryobiology.– 1992.– № 29.– P. 144–152.
9. *Petrenko A.Yu. , Grischuk B.P., Roslyakov A.D. et al.* Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in percoll introduction density gradient // Cryo-Letters.– 1992.– 13, № 2.– P. 87–98.
10. *Ungermach F.R.* Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A // Free Radicals liver injury: Proc. Int. Meet Turin, 1985, Oxford; Washington D.C.– 1985.– P. 127–134.

Матеріал, захищений авторським правом

7. *Mc Cune S.A., Durant P.J. et al.* Comparative studies on fatty acid syntesis, glucogen metabolism, and gluconeogenesis dy hepatocytes isolated from lean and obese zucker rats // Metabolism.– 1981.– 30, № 12.– P. 1170–1177.
8. *Petrenko A.Yu.* A mechanism of latent cryoinjury and reparation of mitochondria // Cryobiology.– 1992.– № 29.– P. 144–152.
9. *Petrenko A.Yu. , Grischuk B.P., Roslyakov A.D. et al.* Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in percoll introduction density gradient // Cryo-Letters.– 1992.– 13, № 2.– P. 87–98.
10. *Ungermach F.R.* Plasma membrane damage of hepatocytes following lipid peroxidation: involvement of phospholipase A // Free Radicals liver injury: Proc. Int. Meet Turin, 1985, Oxford; Washington D.C.– 1985.– P. 127–134.
11. *Whiteley G.S.W., Fuller B.J., Hobbs K.E.F.* Lipid peroxidation in liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Cryo-Letters.– 1992.– 13, № 2.– P. 83–86.

Поступила 16.06.98

11. *Whiteley G.S.W., Fuller B.J., Hobbs K.E.F.* Lipid peroxidation in liver tissue specimens stored at subzero temperatures // Cryo-Letters.– 1992.– 13, № 2.– P. 83–86.

Accepted on 16.06.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.577.352.336

UDC 57.043.577.352.336

Изменения центров сорбции ДСМ в тенях эритроцитов после действия низкой температуры

Т. С. ДЮБКО, О. А. НАРДИД

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The changes of DSM sorption centers in erythrocyte ghosts after low temperature effect

T. S. DYUBKO, O. A. NARDID

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

С использованием флуоресцентного зонда 4-[N-диметиламиностирил]-1-метилпиридиний N-толуолсульфоната (ДСМ) изучено влияние низкой температуры на структуру мембран теней эритроцитов. Результаты флуоресцентных исследований интерпретированы с помощью анализа неоднородного уширения спектров флуоресценции растворителем. Полученные данные свидетельствуют о существовании, по крайней мере, трех типов центров связывания ДСМ на мембранах эритроцитов. Действие низкой температуры приводит к изменению структуры мембран эритроцитов, что выражается в усилении связывания зонда с мембраной и появлении более гидрофобных центров сорбции.

З використанням флуоресцентного зонду (4-N-диметиламіностирил)-1-метилпіридиній N-толуолсульфонату (ДСМ) досліджено вплив низької температури на структуру мембран тіней еритроцитів. Результати флуоресцентних досліджень інтерпретовано за допомогою аналізу неоднорідного уширення спектрів флуоресценції розчинником. Отримані дані свідчать про існування, принаймні, трьох типів центрів зв'язування ДСМ на мембранах еритроцитів. Дія низької температури призводить до зміни структури мембран еритроцитів, що виявляється у збільшенні зв'язування зонду з мембраною та появі більш гідрофобних центрів сорбції.

Low temperature effect on the membrane structure of erythrocyte ghosts has been studied using 4-n-[dimethylaminostyryl]-1-methylpiridinium n-toluene sulphonate (DSM) fluorescent probe. The results of fluorescent studies were interpreted by means of the analysis of fluorescence spectrum inhomogeneous broadening by a solvent. The data obtained testify to an existence, at least, of three types of DSM binding centers on erythrocyte membranes. Low temperature effect results in the change of erythrocyte membrane structure, that is manifested in the strengthening of the probe binding with the membrane and in the appearence of more hydrophobic centers of sorption.

Метод флуоресцентных зондов чувствителен к изменениям структурного состояния биологических мембран [6, 8]. Однако ограниченность интерпретации традиционных параметров спектра флуоресценции (положение максимума, квантовый выход и т.п.) вызывает необходимость искать дополнительные критерии. Подход, основанный на анализе формы и определении параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции зондов АНС и ФНА [1–4], позволил детерминировать причины изменения их параметров. Определяемый в результате такого анализа параметр ν^c, названный Бойцовым В. М. и соавт. центром распределения неоднородного уширения, отражает гидрофобность микроокружения зонда более адекватно, чем традиционно используемый параметр λ_{max}, а параметр σ, именуемый дисперсией неоднородного уширения, позволяет охарактеризовать подвижность диполей окружения. В случае однородных участков связывания зонда этот метод может быть использован для характеристики гидрофобности и микровязкости зон сорбции.

Основываясь на теоретических предпосылках [1–4], в работе выполнен анализ формы спектра флуоресценции зонда ДСМ [6] (структурная фор-

The method of fluorescent probes is sensitive to the changes of structural state of biological membranes [6, 8]. But the limited interpretation of traditional parameters of fluorescence spectrum (position of maximum, quantum yield, etc.) needs a search for additional criteria. The method based on the shape analysis and parameter determination of fluorescence spectrum inhomogeneous broadening of ANS and PNA probes [1–4] allowed to reveal the change causes of their parameters. The ν^c parameter, determined as a result of such an analysis, named by Boytsov V.M. and co-authors as the distribution center of inhomogeneous broadening, refelects more adequate the hydrophobity of the probe microenvironment than the λ_{max} parameter traditionally used, but the σ parameter called the dispersion of heterogenous broadening allows to characterize the motility of environment dipoles. On homogeneous binding sites this method can be used for the characterization of hydrophobity and microviscosity of sorption zones.

Basing on theoretical premises [1–4], the analysis of the shape of fluorescence spectrum of DSM probe [6] (structural formula of the probe is presented in the figure in a top right corn) has been performed in the

Матеріал, захищений авторським правом

флуоресценции зонда ДСМ [6] (структурная формула зонда дана на рисунке в правом верхнем углу) и приведен результат применения подхода к оценке изменения структурного состояния мембран эритроцитов, подвергнутых действию низкой температуры.

Белые тени эритроцитов из донорской крови получали гипотоническим гемолизом [12] и суспендировали в 5 мМ Na-фосфат-NaCl-буфере, *pH* 7,4. Концентрацию белка в препаратах определяли по методу Лоури [13].

Замораживание со скоростью 200 °С/мин осуществляли быстрым погружением образцов в полиэтиленовых ампулах в жидкий азот (–196 °С), оттаивание – при встряхивании на водяной бане (40 °С).

Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали на спектрофлуориметре "Hitachi F-4010" (Япония) с автоматической коррекцией спектров в термостатированной кювете при 22 °С. Точность поддержания температуры была ±1 °С. Спектры накапливали в каждой точке в течение 2 с. Длина волны возбуждения – 460 нм, ширина входной и выходной щелей – 2 и 5 нм соответственно.

В рамках модели формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул, предложенной в [1–4], спектры флуоресценции ДСМ в различных растворителях описывали уравнением [5]:

$$S(\nu, C, \nu^c, \sigma) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \mu^2(\nu_s) \times$$

$$\times \frac{C}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu^c - \nu_s}{\sigma}\right)^2\right\} d\nu_s, \qquad (1)$$

где ν – частота излучаемого света; C – нормировочный коэффициент; ν^c, σ – центр и дисперсия распределения неоднородного уширения спектра; $\Gamma(\nu_s)$ – полуширина однородной лоренцевой линии перехода; ν_s – частота перехода системы; $\mu^2(\nu_s)$ – вероятность распада возбужденного электронного состояния с излучением.

Параметры C, ν и σ определяли методом наименьших квадратов, минимизируя функцию

$$F = \sum_{j=1}^{N} \left[I(\nu_j) - S(\nu_j)\right]^2, \qquad (2)$$

где N – число экспериментальных точек; $I(\nu_j)$ – интенсивность экспериментального спектра.

По аналогии с [4] зависимости Γ и μ^2 от частоты ν_s представляли в виде:

$$\Gamma(\nu_s) = a_0 + a_1\nu_s + a_2\nu_s^2; \qquad (3)$$

$$\lg \mu^2(\nu_s) = b_0 + b_1\nu_s + b_2\nu_s^2. \qquad (4)$$

work, and the result of the approach application to the estimation of the change of the erythrocyte membranes structural state subjected to the low temperature effect has been shown.

Erythrocyte white ghosts from donor's blood were obtained by means of hypotonic hemolysis [12] and were suspended in 5 mM of Na-phosphate-NaCl-buffer, *pH* 7.4. Protein concentration in preparations has been determined by Lowry's method [13].

The freezing with 200 °C/min rate was conducted by a quick immersion of samples in polyethylene ampoules into a liquid nitrogen (–196 °C), the thawing – at the shaking in a water bath (40 °C).

DSM fluorescence spectra were recorded by spectrofluorimeter "Hitachi F-4010" (Japan) with automatic spectrum correction in thermostatic cuvette at 22 °C. The accuracy of temperature maintenance was ± 1 °C. Spectra were accumulated in each point within 2 s. The excitation wavelength was 460 nm, the width of excitation and emission slits – 2 and 5 nm, correspondingly.

In frames of the formation model of electronic and oscillatory spectra of polyatomic molecules, proposed in [1–4], DSM flurescence spectra in various solvents have been described by the equation [5]:

$$S(\nu, C, \nu^c, \sigma) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s)^2 + \Gamma^2(\nu_s)} \mu^2(\nu_s) \times$$

$$\times \frac{C}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{\nu^c - \nu_s}{\sigma}\right)^2\right\} d\nu_s, \qquad (1)$$

where ν – the frequency of emitted light; C – normalizing coefficient; ν^c, σ – the center and dispersion of the distribution of the spectrum inhomogeneous broadening; $\Gamma(\nu_s)$ – the halfwidth of homogeneous Lorentz line of the transition; ν_s – the frequency of the system transition; $\mu^2(\nu_s)$ – the probability of an excited electronic state decay with emission.

C, ν and σ parameters have been determined by means of the method of least squares, minimizing the function

$$F = \sum_{j=1}^{N} \left[I(\nu_j) - S(\nu_j)\right]^2, \qquad (2)$$

where N – a number of experimental points; $I(\nu_j)$ – intensity of experimental spectrum.

By analogy with [4], dependencies Γ and μ^2 on ν_s frequency were presented as:

$$\Gamma(\nu_s) = a_0 + a_1\nu_s + a_2\nu_s^2; \qquad (3)$$

$$\lg \mu^2(\nu_s) = b_0 + b_1\nu_s + b_2\nu_s^2. \qquad (4)$$

a_0, a_1, a_2 and b_0, b_1, b_2 coefficients were selected in such a way that in the minimum of the function F the ratio would be accomplished

Матеріал, захищений авторським правом

Коэффициенты a_0, a_1, a_2 и b_0, b_1, b_2 подбирали так, чтобы в минимуме функции F выполнялось соотношение

$$f = \sqrt{(F/N)(1/I_{max})} \le \delta, \qquad (5)$$

где I_{max} – интенсивность в максимуме экспериментального спектра; δ – погрешность измерения, не превышающая в наших экспериментах 2%.

Функции $\Gamma(\nu_s)$ и $\mu^2(\nu_s)$ были найдены при анализе спектров флуоресценции ДСМ в воде, буфере и смесях воды с этанолом, глицерином и ацетоном. Вычисленные значения коэффициентов уравнений (3) и (4) составили:

$$a_0 = 5{,}184 \cdot 10^3;\ a_1 = -0{,}526;\ a_2 = 1{,}375 \cdot 10^{-5};$$
$$b_0 = -11{,}383;\ b_1 = 1{,}081 \cdot 10^{-3};\ b_2 = -2{,}827 \cdot 10^{-8}.$$

Спектры флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами, описывали уравнением

$$S(\nu, \{C_i, \nu_i^2, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^{n} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s^2) + \Gamma^2(\nu_s)} \times$$

$$\times \frac{\mu^2(\nu_s) k_i C}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} \exp\left\{\frac{1}{2}\left(\frac{\nu_i^c - \nu_s}{\sigma_i}\right)^2\right\} d\nu_s, \qquad (6)$$

где n – число спектральных компонент, соответствующих различным формам зонда; k_i – вклад i-й формы зонда в суммарный спектр; ν_i^c, σ_i – параметры неоднородного уширения i-й компоненты. Первоначально полагали, что $n = 1$, и в минимуме функции F по уравнению (5) рассчитывали параметр f. Поскольку при $n = 1$ величина f превышала погрешность измерения (2%), значение n увеличили до двух. В предположении о наличии двух форм ДСМ удалось найти такие параметры ν_i^c, σ_i и K_i, при которых выполнялось соотношение $f \le 0{,}02$. Обработку экспериментальных данных проводили по специально разработанной программе на ЭВМ.

Как видно из рисунка, спектр флуоресценции ДСМ в водно-солевом растворе имеет максимум при длине волны 610 нм. При связывании с мембранами эритроцитов максимум спектра смещается в коротковолновую сторону на 8 нм, а интенсивность свечения возрастает примерно в 2 раза. После замораживания наблюдаются дальнейший коротковолновый сдвиг спектра до 594 нм и увеличение интенсивности флуоресценции.

Проведенный анализ формы спектра флуоресценции показал, что в буфере он с высокой точностью подгонки (< 1%) описывается одной компонентой с параметрами $\nu^c = 15\,810\ см^{-1}$ и $\sigma = 965\ см^{-1}$. Разложение спектров флуоресценции ДСМ в мембранах производили с учетом, что данный зонд относится к классу флуоресцентных веществ, перераспределяющихся между мембраной и водной фазой [2]. При этом в суспензии нативных мембран эритроцитов, кроме буферной составляю-

$$f = \sqrt{(F/N)(1/I_{max})} \le \delta, \qquad (5)$$

where I_{max} – the intensity of the maximum of an experimental spectrum; δ – measurement error, in our experiment not exceeding 2%.

Functions $\Gamma(\nu_s)$ and $\mu^2(\nu_s)$ were found during the analysis of DSM fluorescence spectra in water, buffer and mixtures of water with ethanol, glycerol and aceton. Calculated values of coefficients of the equations (3) and (4) made:

$$a_0 = 5{,}184 \cdot 10^3;\ a_1 = -0{,}526;\ a_2 = 1{,}375 \cdot 10^{-5};$$
$$b_0 = -11{,}383;\ b_1 = 1{,}081 \cdot 10^{-3};\ b_2 = -2{,}827 \cdot 10^{-8}.$$

Fluorescence spectra of DSM, connected with membranes, were described by equation:

$$S(\nu, \{C_i, \nu_i^2, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^{n} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(\nu_s)}{(\nu - \nu_s^2) + \Gamma^2(\nu_s)} \times$$

$$\times \frac{\mu^2(\nu_s) k_i C}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} \exp\left\{\frac{1}{2}\left(\frac{\nu_i^c - \nu_s}{\sigma_i}\right)^2\right\} d\nu_s, \qquad (6)$$

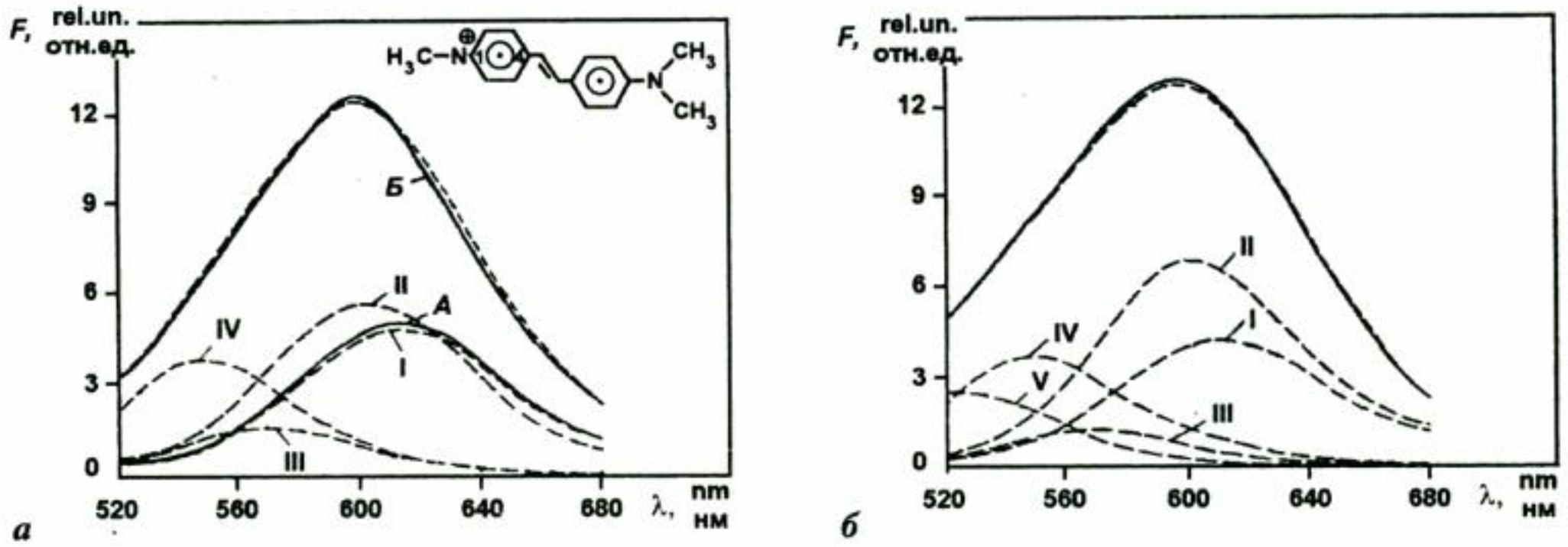
where n – a number of spectral components, corresponding to different probe shapes; k_i – the contribution of i-th probe shape in a summary spectrum; ν_i^c, σ_i – parameters of inhomogeneous broadening of i-th component. It was originally supposed that $n = 1$, and the f parameter was calculated by the equation (5) in minimum of function F. Since at $n = 1$ the f value exceeded the measurement error (2%), the n value was increased upto two. Supposing the presence of two shapes of DSM we could find such parameters of ν_i^c, σ_i and k_i, where the ratio $f \le 0.02$ was accomplished.

The experimental data processing was done by computer using specially designed software.

As it is seen from the figure, DSM fluorescence spectrum in a aqueous-saline solution has maximum at the wave-length of 610 nm. When binding with erythrocyte membranes the spectrum maximum are shifting to a short-wave side by 8 nm, but the fluorescence intensity increases approximately twice. After freezing, following short-wave shift of the spectrum up to 594 nm and an increase in fluorescence intensity have been observed.

The analysis of the fluorescence spectrum shape performed has shown, that in a buffer it is described with a high adjustment accuracy (< 1%) by one component with parameters of $\nu^c = 15\,810\ cm^{-1}$ and $\sigma = 965\ cm^{-1}$. The decomposition of DSM fluorescence spectra in membranes has been conducted taking into consideration the fact that the given probe is classified as a fluorescent substance, which are distributed between a membrane and a water phase [2]. There at in the suspension of native membranes of erythrocytes, except a buffer component (I), we have managed to isolate more three components of the spectrum (Table). The existence of several spectral

Матеріал, захищений авторським правом



Спектры флуоресценции ДСМ и их составляющие (римские цифры): *а* — в буфере (*А*, I) и нативных мембранах эритроцитов (*Б*, II, III, IV); *б* — в тенях эритроцитов после замораживания-отогрева (I, II, III, IV, V)

DSM fluorescence spectra and their components (Roman numerals): *а* — in the buffer (*A*, I) and native erythrocyte membranes (*B*, II, III, IV); *б* — in erythrocyte ghosts after freeze-thawing (I, II, III, IV, V).

щей (I), удалось выделить еще три составляющие спектра (таблица). Существование нескольких спектральных форм ДСМ, связанного с мембраной, очевидно, обусловлено сорбцией зонда на участках, имеющих различные физико-химические характеристики. Так как величины параметров неоднородного уширения ν^c и σ для центров типа II близки к тем, которые вычислены для зонда в буферном растворе, мы предполагаем, что участки типа II расположены на поверхности мембран. Поскольку молекула ДСМ имеет единичный положительный заряд, весьма вероятно, что в состав участков связывания зонда входят отрицательно заряженные полярные группы молекул фосфолипидов и белков. Существование участков связывания типов III и IV, характеризующихся меньшей полярностью ($\nu_3^c = 17\,240\ см^{-1}$, $\sigma_3 = 990\ см^{-1}$; $\nu_4^c = 17\,975\ см^{-1}$, $\sigma_4 = 968\ см^{-1}$), по-видимому, является результатом проникновения ДСМ во внутреннюю область бислоя.

shapes of a bound with membrane DSM is obviously stipulated by the probe sorption on the sites having different physical and chemical characteristics. As the parameter values ν^c and σ of inhomogeneous broadening for centers of type II are similar to those, which have been calculated for the probe in a buffer solution, we suppose that the sites of type II are located on a membrane surface. As DSM molecule has a single positive charge it is highly probable that negatively charged polar groups of phospholipid and protein molecules compose the sites of probe binding. The presence of binding sites of type III and IV which are characterized by lesser polarity ($\nu_3^c = 17\,240\ cm^{-1}$, $\sigma_3 = 990\ cm^{-1}$; $\nu_4^c = 17\,975\ cm^{-1}$, $\sigma_4 = 968\ cm^{-1}$), apparently results in DSM penetration into an internal field of bilayer.

Parameter values of inhomogeneous broadening for the sites of type III ($\nu_3^c = 17\,240\ cm^{-1}$ and $\sigma_3 = 990\ cm^{-1}$) where small quantity of the probe (ap-

Параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в нативных и замороженных-отогретых тенях эритроцитов

Типы центров связывания	Параметры неоднородного уширения	Тени эритроцитов	
		нативные	после замораживания-отогрева
II	ν_2^c, $см^{-1}$	16 130	16 130
	σ_2, $см^{-1}$	935	935
	k_2	0,40	0,44
III	ν_3^c, $см^{-1}$	17 240	17 240
	σ_3, $см^{-1}$	990	990
	k_3	0,06	0,04
IV	ν_4^c, $см^{-1}$	17 975	17 975
	σ_4, $см^{-1}$	968	968
	k_4	0,13	0,12
V	ν_5^c, $см^{-1}$		18 820
	σ_5, $см^{-1}$		970
	k_5		0,07

Parameters of inhomogeneous broadening of DSM fluorescence spectra in erythrocyte ghosts before and after freezing

Types of binding centers	Parameters of inhomogeneous broadening	Erythrocyte ghosts	
		native	after freeze-thawing
II	ν_2^c, cm^{-1}	16 130	16 130
	σ_2, cm^{-1}	935	935
	k_2	0.40	0.44
III	ν_3^c, cm^{-1}	17 240	17 240
	σ_3, cm^{-1}	990	990
	k_3	0.06	0.04
IV	ν_4^c, cm^{-1}	17 975	17 975
	σ_4, cm^{-1}	968	968
	k_4	0.13	0.12
V	ν_5^c, cm^{-1}		18 820
	σ_5, cm^{-1}		970
	k_5		0.07

Матеріал, захищений авторським правом

Значения параметров неоднородного уширения для участков типа III ($\nu_3^c = 17\,240\ см^{-1}$ и $\sigma_3 = 990\ см^{-1}$), в которых сорбировано небольшое количество зонда (около 6%), могут, по нашему мнению, характеризовать участки белок-липидных контактов.

После криовоздействия наблюдалось как увеличение количества связанного с мембранами ДСМ, так и его перераспределение между различными типами участков связывания. Обнаружены также более гидрофобные по типу участки связывания (тип V), которые характеризуются наибольшей величиной параметра ν^c (см. рисунок *б*).

Методом электронной микроскопии замораживания-скалывания [9] показано, что замораживание клеток крови со скоростью 200 °С/мин до температуры жидкого азота оказывает значительное влияние на структурное состояние эритроцитарных мембран. Если в нативных клетках внутримембранные частицы (ВМЧ) имели равномерное распределение, то после быстрого замораживания наблюдалась их агрегация и появлялись свободные от ВМЧ участки. В [7, 10, 11] отмечено нарушение конформации и взаимного пространственного расположения цитоскелетных и интегральных белков эритроцитарных мембран после криовоздействия.

Анализируя данные литературы, можно прийти к заключению, что в основе низкотемпературного нарушения структуры эритроцитарных мембран лежит сложный комплекс взаимосвязанных процессов, затрагивающих как белковую, так и липидную фазы. Обнаруженные после замораживания изменения характеристик центров сорбции ДСМ на эритроцитарных мембранах, по-видимому, отражают эти процессы. Увеличение гидрофобности микроокружения зонда и усиление его связызания с мембраной может, в частности, быть результатом большего встраивания зонда в мембрану вследствие увеличения при агрегации ВМЧ доли свободного липида, ранее контактировавшего с белками. В то же время, учитывая, что ДСМ имеет примерно одинаковое сродство с зоной глицериновых остатков и с поверхностью липидного бислоя [6], мы не исключаем возможности появления дополнительных центров сорбции зонда в области белок-липидных контактов в результате происшедших конформационных изменений мембранных белков. Для уточнения причин наблюдаемых изменений спектра ДСМ необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бойцов В.М.* Исследование параметров спектров флуоресценции зондов в модельных условиях // Биофизика.– 1982.– Т. 27, № 5.– С. 786–790.
2. *Бойцов В.М., Орлов С.Н.* Применение анализа спектров флуоресценции зондов для исследования структурного состояния сорбента // Биофизика.– 1982.– Т. 27, № 6.– С. 1049–1052.

proximately 6%) were adsorbed, may, in our opinion, characterize the sites of protein-lipid contacts.

After cryoeffect both the increase in a number of DSM bound with membranes, and its redistribution between various types of binding sites have been observed. More hydrophobic by the type binding sites (type V) characterizing on the highest value of the ν^c parameter (see the figure *б*) have been also revealed.

The freezing of blood cells with the rate of 200 °C/min down to the temperature of a liquid nitrogen by means of the method of electronic microscopy of freeze-fracturing [9] considerably affects structural state of erythrocyte membranes. If in native cells intramembrane particles (IMP) have an uniform distribution, then after rapid freezing it has been observed their aggregation and the sites free of IMP have appeared. In [7, 10, 11] the impairment of the conformation of relative spatial location of cytoskeletal and integral ptoteins of erythrocyte membranes after cryoeffect has been noted.

Analysing the literature data one can conclude that a compound complex of interrelated processes affecting both protein and lipid phases forms the basis of low temperature impairment of erythrocyte membrane structure. The changes of characteristics of DSM sorption center on erythrocyte membranes revealed after freezing, apparently, reflect those processes. The increase in hydrophobity of the probe microenvironment and the enhancement of its binding with membrane can specifically result in greater probe building in a membrane in consequence of the increase in a part of free lipid, being early contacted with proteins, during the IMP aggregation. At the same time, taking into consideration the fact, that DSM has approximately the same affinity with a zone of glycerol residues and with lipid bilayer surface [6], we do not exclude the possibility of the appearence of additional sorption centers of the probe in the field of protein-lipid contacts as a result of the occured conformational changes of membrane proteins. Additional investigations should be carried out in order to precise the causes of the changes observed of DSM spectrum.

REFERENCES

1. *Boytsov V.M.* The study of parameters of the probe fluorescence spectra under model conditions // Biofizika.– 1982.– V. 27, № 5.– P. 786–790.
2. *Boytsov V.M., Orlov S.N.* The application of the analysis of the probe fluorescence spectra for study of sorbent structural state // Biofizika.– 1982.– V. 27, № 6.– P. 1049–1052.
3. *Boytsov V.M., Yuzhakov V.I.* The determination of the width of homogenous relaxative component of luminescence spectra of complex molecules in solutions // Rep. of USSR Acad. of Sci.– 1985.– V. 281, № 2.– P. 358–363.
4. *Boytsov V.M.* Fluorescent probes: analysis of spectra for study of inhomogeneous sorption centers // Biol. membranes.– 1982.– V. 4, № 7.– P. 677–695.
5. *Gorbenko G.P., Dyubko T.S.* Interaction of 4-n-(dimethylaminostyryl)-1-methylpiridine n-toluenesulphonate with liposomes: analysis of fluorescence spectra //Biofizika.– 1996.– V. 41, № 2.– P. 348–354.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Бойцов В.М., Южаков В.И.* Определение ширины однородной релаксационной составляющей спектров люминесценции сложных молекул в растворах // Докл. АН СССР.– 1985.– Т. 281, № 2.– С. 358–363.
4. *Бойцов В.М.* Флуоресцентные зонды: анализ спектров для изучения гетерогенных центров сорбции // Биол. мембраны.– 1982.– Т. 4, № 7.– С. 677–695.
5. *Горбенко Г.П., Дюбко Т.С.* Взаимодействие 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний-N-толуолсульфоната с липосомами: анализ спектров флуоресценции // Биофизика.– 1996.– Т. 41, № 2.– С. 348–354.
6. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 276 с.
7. *Землянских Н.Г.* Структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов в процессе консервирования под защитой ПЭО-1500: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1991.– 112 с.
8. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии.– М.: Мир, 1986.– 496 с.
9. *Репин Н.В.* Электронно-микроскопическое изучение характера кристаллизации при замораживании водных растворов криопротекторов и некоторых клеток: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1984.– 197 с.
10. *Репина С.В., Цымбал Л.В.* Влияние цитоскелетных белков на температурозависимые перестройки в мембранах эритроцитов // Криобиология.– 1988.– № 2.– С. 49–51.
11. *Репина С.В.* Особенности термоиндуцированных структурных перестроек мембран эритроцитов пойкилотермного и гетеротермного организмов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1990.– 135 с.
12. *Dodge J., Mitchell C., Hanahan D.* The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. and Biophys.– 1963.– 100.– P. 119–130.
13. *Lowry O., Kosenbrough N., Farr F., Randall R.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– 193, № 1.– P. 265–275.

Поступила 09.03.98

6. *Dobretsov G.E.* Fluorescent probes in the investigation of cells, membranes and lipoproteins.– M.: Nauka, 1989.– 276 p.
7. *Zemlyanskikh N.G.* Structural and functional changes of erythrocyte membranes during preservation under PEO-1500 protection: Thesis for obtaining PhD (biology).– Kharkov, 1991.– 112 p.
8. *Lakovich J.* Basis of fluorescent spectroscopy.– M.: Mir, 1996.– 496 p.
9. *Repin N.V.* Electronic and microscopy study of the crystallization character when freezing aqueous solutions of cryoprotectants and some cells: Thesis for obtaining PhD (biology).– Kharkov, 1984.– 197 p.
10. *Repina S.V., Tsymbal L.V.* Cytoskeletal protein effect on temperature dependent rearrangement in erythrocyte membranes // Kriobiologiya.– 1988.– № 2.– P. 49–51.
11. *Repina S.V* Peculiarities of thermoinduced structural rearrangements of erythrocyte membranes of poikilothermal and heterothermal organisms: Thesis for obtaining PhD (biology).– Kharkov, 1990.– 135 p.
12. *Dodge J., Mitchell C., Hanahan D.* The preparation and chemical characteristics of gemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. and Biophys.– 1963.– 100.– P. 119–130.
13. *Lowry O., Kosenbrough N., Farr F., Randall R.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– 193, № 1.– P. 265–275.

Accepted in 09.03.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 611.84.88: 612.821: 615.276

UDC 57.043: 611.84.88: 612.821: 615.276

Модуляція L- та DL-триптофаном серотонінових рецепторів першого типу головного мозку щурів

Р. І. КРАТЕНКО

Харківський державний медичний університет

L- and DL-tryptophane modulation of rat brain first type serotonin receptors

R. I. KRATENKO

Kharkov State Medical University

Досліджувалась модуляція L- та DL-триптофаном серотонінових рецепторів першого типу головного мозку щурів з високим та низьким рівнем аудіогенної збудливості. Показано, що L- та DL-триптофан виявляє максимальну позитивну модулюючу дію у діапазоні концентрації від 100 нМ до 1 мкМ для серотонінових рецепторів епілептогенних ділянок головного мозку високозбудливих щурів. У порівнянні з L-триптофаном DL-триптофан має більший позитивний та менший негативний модулюючі ефекти.

Исследовалась модуляция L- и DL-триптофаном серотониновых рецепторов первого типа головного мозга крыс с высоким и низким уровнем аудиогенной возбудимости. Показано, что L- и DL-триптофан оказывает максимальное положительное модулирующее действие в диапазоне концентраций от 100 нМ до 1 мкМ для серотониновых рецепторов эпилептогенных структур головного мозга высоковозбудимых крыс. В сравнении с L-триптофаном DL-триптофан проявляет больший положительный и меньший отрицательный модулирующие эффекты.

L- and DL-tryptophane modulation of rat brain first type serotonin receptors with a high and low level of audiogenic excitability was studied. It has been shown that L- and DL-tryptophane shows maximum positive modulating effect in the range of concentration from n/Mol up to μMol for serotonin receptors of epileptogenic sections in highly-excitated rat's brain. DL-tryptophane has more positive and less negative modulating effects in comparison with L-tryptophane.

З'ясування механізмів формування та регуляції збудливості головного мозку є однією з важливих тем досліджень сучасної біології та експериментальної медицини. Патологічно підвищена збудливість головного мозку, висока судомна готовність лежать в основі виникнення та розвитку ряду захворювань: епілепсії, маніакально-депресивного психозу, мігрені та ін. [2, 9]. Сучасна терапія епілепсії включає використання хірургічних, психотерапевтичних методів, застосування фармпрепаратів [8]. Проте радикальних засобів лікування цього захворювання не знайдено [6].

У літературі наведено багато фактичного матеріалу щодо досліджень різних біохімічних та фізіологічних параметрів у хворих на епілепсію та у тварин з високим рівнем судомної готовності мозку, але ці дані суперечливі [6, 8, 9].

Велику роль у формуванні судомних станів відіграють зміни нейромедіаторних процесів у ЦНС [9]. Зміни ці можуть стосуватися окремих ланцюгів різноманітних медіаторних систем або порушень рівноваги між нейромедіаторними системами [9, 10].

За даними літератури серотонінергічна нейромедіаторна система має гальмуючий, антиепілептичний та антистресовий вплив на клітини головного мозку [9]. Однак серотонінові рецептори різних структур головного мозку, їх стан, кількість

Determination of the formation mechanisms and brain excitability regulation is one of important themes of modern biology and experimental medicine investigations. Pathologically increased brain excitability, a high seizure susceptibility is in the base of appearance and development of many diseases: epilepsy, maniacally depressed psychosis, migraine etc. [2, 9]. Modern epilepsy therapy includes an application of surgical, psychotherapeutical methods, pharmacological preparation application [8]. However the radical ways of this disease treatment is not found [6]. There are many facts concered by different investigations of biochemical and physiological parameters in patients with epilepsy and in animals with a high level of brain seizure susceptibility in literature, but these data are contradictory [6, 8, 9]. Neuromediatory process changes in CNS [9] play a great role in the formation of spastic states. These changes deal with either separate chains in different mediatory systems or balance disorder between mediator systems [9,10]. According to literature data, serotoninergetic neuromediatory system shows inhibiting, antiepileptic and antistress effect onto brain cells [9]. But serotonin receptors of different brain structures, their state, some type number and especially, modulating effect of different substances on definite receptor type in connection with an increased brain excitability are insufficiently studied.

Матеріал, захищений авторським правом

окремих типів, а особливо модулююча дія різних речовин на певні типи рецепторів у зв'язку з підвищеною збудливістю мозку досліджені недостатньо.

Адекватною моделлю для дослідження епілептогенних станів виступають тварини з високим рівнем судомної готовності мозку [7].

Результати клінічних досліджень виявили можливість усунення судомних припадків L- та DL-триптофаном, до того ж суміш рацематів була більш ефективною [11]. У [1, 3] також зазначається про лікування хворих на епілепсію L-формою цієї амінокислоти. Припускається, що терапевтичний ефект пов'язаний зі збільшенням концентрації у головному мозку гальмівного та антиепілептичного нейромедіатора — серотоніну [9, 10]. Однак цілком можливо, що ця амінокислота має позитивний модулюючий ефект на центральну ділянку серотонінергічної системи — серотонінові рецептори.

Враховуючи викладене вище, метою дослідження було вивчення модулюючих ефектів L- та DL-триптофану на серотонінові рецептори першого типу в різних ділянках головного мозку щурів з високим та низьким рівнями аудіогенної судомної збудливості.

Об'єктами дослідження стали 112 тримісячних щурів лінії Вістар, які були поділені за реакцією на аудіогенний подразник (дзвоник 96 дБ, 120 с) на дві групи — з високою (В) та низькою (Н) збудливістю головного мозку. Диференціацію щурів на групи виконували за відомими методиками [7]. Експерименти проводили через 14 днів після аудіогенного тестування.

Тварин декапітували, виділяли головний мозок та препарували його на льоду. При поділенні мозку на ділянки користувались атласом De Groot [12]. Для експериментів були взяті області дорсального та вентрального гіпокампа, мигдалевидного комплексу (ділянки лімбічної системи, що характеризуються низьким судомним порогом [9]) та мозочок, який більшість дослідників вважають гальмівним відділом.

Радіорецепторний аналіз проводився на грубій синаптосомальній фракції ділянок мозку щурів [13]. Параметри зв'язування — константу дисоціації K_d та максимальну кількість місць зв'язування B_{max} — ^{3}H-серотоніну з серотоніновими рецепторами першого типу — визначали за методом, описаним у [14].

Виділення комплексу "ліганд–рецептор" з середовища інкубації та очищення його від мітки, що не зв'язалася з рецепторами, проводилися за допомогою центрифугування з середовищем розподілу (суміш складних ефірів ортофталевої кислоти — дибутилфталату та динонілфталату, — питома вага якої дорівнювала 1,013 г/см^3 при температурі 20 °С [4]).

Криву насичення для серотонінових рецепторів першого типу будували за зростаючою концентрацією селективного ліганду (від 2 до 40 нМ). Мо-

Animals with a high level of brain seizure susceptibility [7] served as an adequate model for the epileptogenic state study.

Clinical study results showed the possibility of spastic attacks removal by L- and DL-tryptophane and racemate mixture was more efficient [11]. One can note on the treatment of patients with epilepsy of this aminoacid L-shape [1,3] and suppose, that the therapeutical method is connected with the concentration increase in brain of inhibiting and antiepileptic neurotransmitter — serotonin [9,10]. But it is possible that this aminoacid shows positive modulating effect on a central region of serotoninergetic system — serotonin receptors.

According to the given information, modulating effect study of L- and DL-tryptophane on serotonin receptors of the first type in different rat's brain sections with a high and low levels of audiogenic spastic excitability was the aim of the investigation.

112 Wistar line rats of 3 months' age were divided by their response on audiogenic stimulus (96 dB bell, 120 s) onto two groups — with a high (H) and low (L) brain excitability. Rat's differentiation by groups was conducted according to the known methods [7]. An experiments were carried out in 14 days after the audiogenic test.

Animals were decapitated, brain was isolated and preparated on ice. During the brain dividing into sections,the authors used De Groot atlas [12]. Dorsal and vectral hyppocampus regions of amygdala complex (sections of limbical system, characterizing by low spastic threshold [9]) and cerebellum, which is considered by a majority of scientists as a high spastic thresh-old section, were used for the experiments.

Radio-receptor analysis was conducted in the rough synaptosomal fraction of rat's brain sections [13]. Binding parameters — dissociation constant K_d and maximum number of binding places B_{max} of ^{3}H-serotonin with serotonin receptors of the first type were determined by means of the given method [14].

"Ligand–receptor complex" isolation from the incubation medium and its washing-out of the label, that had not been bound with receptors was conducted by means of centrifugation with the division medium (ortoftale acid complex esters mixture — dibutylphtalat and dinonilphtalat) which specific weight was 1,013 g/cm^3 at 20 °C temperature.

Saturation curve for the first type serotonin receptors was built up by the increase in selective ligand concentration (from 2 up to 40 nMol). L- and DL-tryptophane modulating effect was studied in physiological concentrations of these substances: 40, 100 nMol and 1 μMol. Specific binding of the first type receptors was determined as a difference between indices of total binding and non-specific, when "cold", non-labelled ligand was added; binding receptor possibility B_{max} and the dissociation constant of "ligand–receptor" K_d complex were determined by means of the Sketchard's diagram.

Матеріал, захищений авторським правом

дулююча дія L- та DL-триптофану досліджувалась при фізіологічних концентраціях цих речовин: 40, 100 нМ та 1 мкМ. Специфічне зв'язування рецепторів першого типу визначали як різницю між показниками загального зв'язування та неспецифічного за умов додавання "холодного" (немміченого) ліганду, зв'язуючу здатність рецепторів B_{max} та константу дисоціації комплексу "ліганд–рецептор" K_d – за графіком Скетчарда.

Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерного аналізу IBM PC/AT за програмою "Ліганд" (ХДМІ, 1992).

В експериментах використовували ^{3}H-серотонін (питома активність 8 мКі/ммоль), серотонін креатинін сульфату ("холодний" ліганд) виробництва AMERSHAM (Англія) і L- та DL-триптофан виробництва SYNOPHARM (Германія).

При вивченні модулюючого впливу L- та DL-триптофану на серотонінові рецептори першого типу було поставлено ряд дослідів для визначення параметрів зв'язування ^{3}H-серотоніну з рецепторами першого типу без внесення у систему модулятора. Отримані результати використовували як контроль для подальших досліджень.

Зв'язування ліганду описувалось за двоцентровою моделлю. Для доказу припущення про наявність різних пулів рецепторів був розрахований коефіцієнт Хілла, який дорівнював одиниці, що свідчило при відсутність кооперативних взаємодій між кількома частинами молекули одного рецептора. Таким чином, були визначені високо- та низь-

A result treatment was conducted by means of IBM PC/AT computer analysis by the "Ligand" program (Kharkov State Medical Institute, 1992).

^{3}H-serotonin (specific weight of 8 mKi/mol), serotonin creatinin sulphate ("cold" ligand) produced by AMERSHAM (England) and L- and DL-tryptophane, produced by SYNOPHARM (Germany) were used in the experiments.

During the study of L- and DL-tryptophane modulating effect on the first type serotonin receptors a number of investigations were carried out for the binding parameter determination of ^{3}H-serotonin with the first type receptors without modulator introduction in the system. Obtained results were used as the control for next investigations.

Ligand binding was described according to two-center model. To prove the suppositions of the presence of different receptor pools, the Hill coefficient equal to zero was calculated, that testifies to the absence of cooperative interaction between some molecule parts of one receptor. Thus, a high and low affinic pools of the first type serotonin receptors were determined.

In highly excitated animals in comparison with low-excitated ones the decreased receptor affinity (both pools) in amygdala section (Table 4) and increased affinity in cerebellum (Table 1) and in ventral and dorsal hypocamp sections (Table 2, 3) was revealed.

A number of binding sites of ^{3}H-serotonin (both pools) in animals with an increased seizure susceptibility in respect to low-excitated animals was statisti-

Таблиця 1 **Table 1**

Параметри зв'язування ^{3}H-серотоніну з серотоніновими рецепторами мозочка щурів з різним рівнем аудіогенної збудливості за умов модулюючої дії L- та DL-триптофану

Parameters of ^{3}H-serotonin binding with serotonin receptors of rat cerebellum with low audiogenic excitability level under the conditions of L- and DL-tryptophane modulating effect

Групи щурів Rat group	Концентрація триптофану, мкМ Tryptophane concentration, μM	Високоафінний пул Highly affinic pool		Низькоафінний пул Low-affinic pool	
		K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein	K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein
Н	0	1,52 ± 0,04	160 ± 7,44	3,16 ± 0,08	151 ± 7,33
	L-0,04	1,50 ± 0,08	168 ± 6,08	3,13 ± 0,15	156 ± 5,7
	L-0,1	1,34 ± 0,06*	138 ± 15,2*	2,81 ± 0,12*	128 ± 14,2*
	L-1	1,55 ± 0,16	194 ± 15,7*	3,23 ± 0,31	174 ± 13,5*
	DL-0,04	1,20 ± 0,15*,**	191 ± 13,7*,**	2,56 ± 0,29*,**	170 ± 13,2
	DL-0,1	1,13 ± 0,17*	176 ± 10,9**	2,46 ± 0,32*	149 ± 15,5
	DL-1	1,26 ± 0,08*,**	238 ± 22,6*,**	2,74 ± 0,14*,**	206 ± 19,3*
В	0	0,69 ± 0,07	123 ± 6,29	1,60 ± 0,13	93,2 ± 4,94
	L-0,04	0,64 ± 0,10	123 ± 7,98	1,58 ± 0,19	87,7 ± 7,63
	L-0,1	0,56 ± 0,09	113 ± 15,3	1,38 ± 0,17	76,0 ± 6,51*
	L-1	0,70 ± 0,08	127 ± 15,6	1,62 ± 0,15	95,6 ± 11,8
	DL-0,04	0,68 ± 0,18	186 ± 23,9*,**	1,53 ± 0,25	137 ± 25,4*,**
	DL-0,1	0,66 ± 0,14	192 ± 22,0*,**	1,54 ± 0,23	150 ± 24,5*,**
	DL-1	0,78 ± 0,15	199 ± 23,5*,**	1,72 ± 0,25	128 ± 15,5*

Примітка. * — достовірно порівняно з контрольними величинами ($p < 0,05$); ** — достовірно порівняно з величинами за умов модуляції L-триптофаном ($p < 0,05$).

Note. * — statistically significant in comparison with control values ($p < 0.05$); ** — statistically significant in comparison with values under the modulating conditions by L-tryptophane ($p < 0.05$)

Матеріал, захищений авторським правом

Таблиця 2 **Table 2**

Параметри зв'язування ^{3}H-серотоніну з серотоніновими рецепторами вентрального гіпокампа щурів з різним рівнем аудіогенної збудливості за умов модулюючої дії L- та DL-триптофану

The parameters of ^{3}H-serotonin binding with serotonin receptors of rat central hypocamp with different audiogenic excitability level under the conditions of L- and DL-tryptophane modulating effect

Групи щурів Rat group	Концентрація триптофану, мкМ Tryptophane concentration, μM	Високоафінний пул Highly affinic pool		Низькоафінний пул Low-affinic pool	
		K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein	K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein
H	0	4,75 ± 0,26	154 ± 9,52	9,66 ± 0,52	151 ± 9,44
	L-0,04	4,06 ± 0,25*	147 ± 7,55	8,22 ± 0,51*	144 ± 7,53
	L-0,1	3,11 ± 0,30*	236 ± 30,5*	6,28 ± 0,60*	231 ± 30,1*
	L-1	4,00 ± 0,18*	224 ± 16,8*	8,03 ± 0,37*	222 ± 16,6*
	DL-0,04	4,68 ± 0,19**	264 ± 23,5*,**	9,40 ± 0,38**	262 ± 23,3*,**
	DL-0,1	4,39 ± 0,27**	249 ± 17,8*	8,88 ± 0,50**	247 ± 17,7*
	DL-1	3,57 ± 0,42*	151 ± 10,2**	7,26 ± 0,84*	147 ± 10,5**
B	0	1,80 ± 0,08	105 ± 5,99	3,74 ± 0,15	98,8 ± 6,59
	L-0,04	1,70 ± 0,09	128 ± 15,1*	3,52 ± 0,19	130 ± 15,8*
	L-0,1	1,43 ± 0,17*	142 ± 9,90*	2,98 ± 0,33*	132 ± 10,3*
	L-1	0,85 ± 0,05*	164 ± 22,4*	1,87 ± 0,09*	138 ± 18,4*
	DL-0,04	1,92 ± 0,25	159 ± 15,2*,**	3,94 ± 0,48	150 ± 14,7*,**
	DL-0,1	1,76 ± 0,19	155 ± 10,6*	3,86 ± 0,35**	133 ± 10,7*
	DL-1	1,79 ± 0,18**	223 ± 21,6*,**	3,87 ± 0,34**	196 ± 20,4*,**

Примітка. * — достовірно порівняно з контрольними величинами ($p < 0,05$); ** — достовірно порівняно з величинами за умов модуляції L-триптофаном ($p < 0,05$).

Note. * — statistically significant in comparison with control values ($p < 0.05$); ** — statistically significant in comparison with values under the modulating conditions by L-tryptophane ($p < 0.05$)

коафінний пули серотонінових рецепторів першого типу.

У високозбудливих тварин порівняно з низькозбудливими були виявлені знижена спорідненість рецепторів (обидва пули) в області мигдалини (табл. 4) та підвищена спорідненість у мозочку

cally significant lower in cerebellum (Table 1) and in ventral and dorsal hypocamp sections (Table 2, 3).

The first type serotonin receptors mediate inhibitive processes in CNS and in a result of this their affinity to selective ligand in rat of H group amygdala section regarding to low-excitated is decreased and

Таблиця 3 **Table 3**

Параметри зв'язування ^{3}H-серотоніну з серотоніновими рецепторами дорсального гіпокампа щурів з різним рівнем аудіогенної збудливості за умов модулюючої дії L- та DL-триптофану

Parameters of ^{3}H-serotonin binding with serotonin receptors of rat dorsal hypocamp with different audiogenic excitability level under the conditions of L- and DL-tryptophane modulating effect

Групи щурів Rat group	Концентрація триптофану, мкМ Tryptophane concentration, μM	Високоафінний пул Highly affinic pool		Низькоафінний пул Low-affinic pool	
		K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein	K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein
H	0	3,69 ± 0,07	263 ± 9,08	7,42 ± 0,14	261 ± 8,92
	L-0,04	3,13 ± 0,23*	159 ± 12,1*	6,45 ± 0,47*	153 ± 11,4*
	L-0,1	1,93 ± 0,13*	169 ± 18,5*	4,05 ± 0,29*	158 ± 18,7*
	L-1	1,14 ± 0,08*	171 ± 11,9*	2,43 ± 0,15*	152 ± 10,9*
	DL-0,04	3,14 ± 0,38*	178 ± 33,1*	6,37 ± 0,77*	173 ± 31,5**
	DL-0,1	2,16 ± 0,27*	332 ± 17,4*,**	4,24 ± 0,66*	299 ± 16,5*,**
	DL-1	1,33 ± 0,15*	367 ± 41,7*,**	3,02 ± 0,35*,**	293 ± 36,0**
B	0	2,10 ± 0,08	152 ± 6,92	4,29 ± 0,16	147 ± 6,74
	L-0,04	1,85 ± 0,12*	144 ± 14,1	3,80 ± 0,23*	130 ± 14,0
	L-0,1	1,32 ± 0,14*	204 ± 19,4*	2,77 ± 0,26*	186 ± 19,3*
	L-1	1,11 ± 0,07*	125 ± 10,5*	2,37 ± 0,13*	110 ± 8,11*
	DL-0,04	1,71 ± 0,20*	161 ± 20,1	3,53 ± 0,39*	130 ± 19,3
	DL-0,1	1,43 ± 0,18*	226 ± 37,2*,**	2,90 ± 0,32*	210 ± 33,5*
	DL-1	1,17 ± 0,26*	269 ± 24,8*,**	2,49 ± 0,48*	213 ± 32,9*,**

Примітка. * — достовірно порівняно з контрольними величинами ($p < 0,05$); ** — достовірно порівняно з величинами за умов модуляції L-триптофаном ($p < 0,05$).

Note. * — statistically significant in comparison with control values ($p < 0.05$); ** — statistically significant in comparison with values under the modulating conditions by L-tryptophane ($p < 0.05$)

Матеріал, захищений авторським правом

Таблиця 4

Table 4

Параметри зв'язування ^{3}H-серотоніну з серотоніновими рецепторами мигдалини щурів з різним рівнем аудіогенної збудливості за умов модулюючої дії L- та DL-триптофану

Parameters of ^{3}H-serotonin binding with serotonin receptors of rat's amygdala with different audiogenic excitability level under the conditions of L- and DL-tryptophane modulating effect

Групи щурів Rat group	Концентрація триптофану, мкМ Tryptophane concentration, μM	Високоафінний пул Highly affinic pool		Низькоафінний пул Low-affinic pool	
		K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein	K_d, нМ K_d, nM	B_{max}, фМ/мг білка B_{max}, fM/mg of protein
Н	0	4,11 ± 0,08	225 ± 18,8	8,29 ± 0,18	223 ± 18,5
	L-0,04	4,32 ± 0,50	339 ± 47,5*	8,69 ± 0,99*	335 ± 47,4*
	L-0,1	3,78 ± 0,40	338 ± 45,7*	7,62 ± 0,79	333 ± 44,8*
	L-1	1,78 ± 0,21*	234 ± 22,9	3,68 ± 0,40*	221 ± 23,2
	DL-0,04	3,80 ± 0,37	213 ± 28,7**	7,66 ± 0,73	203 ± 26,0**
	DL-0,1	1,37 ± 0,13*,**	292 ± 40,6*	2,88 ± 0,24*,**	229 ± 31,0**
	DL-1	0,77 ± 0,14*,**	425 ± 26,1*,**	1,85 ± 0,25*,**	281 ± 18,4*,**
В	0	5,60 ± 0,25	212 ± 13,4	11,3 ± 0,48	210 ± 13,9
	L-0,04	3,48 ± 0,18*	244 ± 28,8	7,02 ± 0,35*	240 ± 29,6
	L-0,1	2,78 ± 0,42*	259 ± 44,2	5,67 ± 0,84*	253 ± 44,4
	L-1	3,13 ± 0,49*	272 ± 33,6*	6,33 ± 0,96*	267 ± 33,9*
	DL-0,04	3,30 ± 0,28*	211 ± 35,1	6,71 ± 0,57*	205 ± 34,6
	DL-0,1	2,39 ± 0,31*	221 ± 23,0	4,86 ± 0,62*	213 ± 21,3
	DL-1	2,30 ± 0,29*,**	168 ± 13,4*,**	4,68 ± 0,65*	161 ± 13,0*,**

Примітка. * — достовірно порівняно з контрольними величинами ($p < 0,05$); ** — достовірно порівняно з величинами за умов модуляції L-триптофаном ($p < 0,05$).

Note. * — statistically significant in comparison with control values ($p < 0.05$); ** — statistically significant in comparison with values under the modulating conditions by L-tryptophane, ($p < 0.05$)

(табл. 1) і областях вентрального та дорсального гіпокампа (табл. 2. 3).

Кількість місць зв'язування ^{3}H-серотоніну (обидва пули) у тварин з підвищеною судомною готовністю відносно низькозбудливих була достовірно нижча у мозочку (табл. 1) та областях вентрального і дорсального гіпокампа (табл. 2, 3).

Серотонінові рецептори першого типу опосереднюють гальмівні процеси у ЦНС, тому знижена спорідненість їх до селективного ліганду в області мигдалини щурів групи В відносно низькозбудливих свідчить про наявність більш високого рівня збудливості в цій ділянці.

До компенсаторних реакцій мозку високозбудливих щурів можна віднести підвищену афінність рецепторів в областях вентрального та дорсального гіпокампа відносно таких у тварин групи Н. У цих епілептогенних ділянках судомні реакції виникають внаслідок дисбалансу усередині моноамінергічної системи і пріоритету процесів збудження над гальмівними за рахунок як активації норадренергічних і дофамінергічних механізмів [9], так і збільшення кількості серотонінових рецепторів другого типу [14].

У мозочку високозбудливих тварин афінність рецепторів першого типу найвища (табл. 1), а оскільки нейрони мозочку мають гальмівний характер дії на ділянки лімбічної системи, їх гальмування *in vivo*, можливо, здатне викликати активацію цих ділянок у щурів групи В.

У досліді за умов дії L- та DL-триптофану константи дисоціації та кількість місць зв'язування селективного ліганду суттєво відрізнялись від контрольних показників (табл. 1–4). Одержані результати свідчать про наявність більш високого рівня збудливості в цій ділянці.

An increased receptor affinity in ventral and dorsal hyppocampus sections in respect to such animals of H group, one can relate to brain compensatory reactions of high-excitated rats. In these epileptogenic sections spastic reactions appear in a result of disbalance inside of monoaminergetic system and excitability process priority over then inhibitive processes by noradrenenergetic and dophaminergetic mechanism activation [9] and an increase of second type serotonin receptor number [14].

In highly-excitated animal's cerebellum the first type receptor affinity is the highest (Table 1) but if cerebellum neurons show the effect inhibitive character on the limbical system sections, so their braking in vivo, perhaps, is able to provoke these section activation in rats of H group.

Under the conditions of L- and DL-tryptophane effect of the dissociation constant and a number of binding places of the selective ligand are actually differed from the control data (Table 1–4) in the experiment. Obtained results testify to the following: L- and DL-tryptophane affected onto the first type serotonin receptors of rat brain as alosteric modulator of metaffinoid nature (increased receptor affinity to ligand) and non-competitory, metactoid one (increased the number of active receptor forms).

L-tryptophane has shown a positive modulating effect, increasing the affinity in these receptor types in a majority of examined brain sections in highly excitated rats in statistically and significant lower extent in comparison with low-excitated ones, except

Матеріал, захищений авторським правом

тати свідчать про те, що L- та DL-триптофан діяв на серотонінові рецептори першого типу головного мозку щурів як алостеричний модулятор метафіноїдної (підвищував спорідненість рецепторів до ліганду) та неконкурентної, тобто метактоїдної (підвищував кількість активних форм рецепторів), природи.

L-триптофан виявляв позитивний модулюючий ефект, збільшуючи афінність означеного типу рецепторів у більшості досліджених ділянок головного мозку високозбудливих щурів у достовірно меншій мірі порівняно з низькозбудливими, окрім області мигдалини (табл. 4), в якій висока чутливість рецепторів за умов дії цього модулятора може пояснюватися компенсаторною реакцією тварин групи В на підвищену судомну готовність цієї ділянки.

У тварин з високим рівнем збудливості порівняно з низькозбудливими щурами DL-триптофан виявляв позитивний модулюючий ефект у достовірно більшій мірі, підвищуючи афінність серотонінових рецепторів та кількість зв'язування місць ^{3}H-серотоніну в більшості досліджених структур головного мозку.

Привертає увагу нездатність рецепторів мозочку тварин групи В змінювати кінетичні параметри (особливо K_d) під впливом модуляторів. Можливо, це пояснюється тим, що *in vivo* модулятори усували б надмірну збудливість лімбічної системи, яка зв'язана колатералями з мозочком, за допомогою інгібірування гальмівних рецепторів у цьому відділі мозку, таким чином могли б відновлювати гальмівну функцію його серотонінцептивних нейронів.

Факт підвищення афінності серотонінових рецепторів областей вентрального та дорсального гіпокампа у щурів обох груп під впливом L- та DL-триптофану можна розцінювати як активацію процесів гальмування в цих ділянках. Однак підвищення афінності більш виявлено у низькозбудливих щурів.

У [5] зазначено, що в процесі регуляції рівня збудливості нейронів константа дисоціації постсинаптичних рецепторів має більше значення порівняно з кількістю цих рецепторів, отже знижені значення K_d серотонінових рецепторів у мигдалині, гіпокампі вентральному і дорсальному, а також підвищені значення цієї величини у мозочку високозбудливих щурів за умов дії L- та DL-триптофану можуть пояснювати терапевтичні ефекти цих амінокислот при лікуванні хворих на епілепсію.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Аванесова Т. С., Свиридова Е. И.* Терапевтическая активность триптофана и его влияние на обмен серотонина у больных эпилепсией // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова.– 1980.– 80, № 6.– С. 857–863.
2. *Бехтерева Н. П.* Здоровый и больной мозг человека.– Спб.: Наука, 1998.– 365 с.

of amygdala tract (Table 4) in where a high receptor sensitivity under the condition of this modulator effect may be explained by the compensatory response of H-group animals to an increased seizure susceptibility of this section.

In animals with a high excitability level DL-tryptophane has shown a positive modulating effect in statistically significant bigger extent in comparison with low-excitated rats, increasing the serotonin receptor affinity and a number of binding places of ^{3}H-serotonin in the majority of brain structures.

Cerebellum receptor inability in H-group animals to change kinetic parameters (especially K_d) under the effect of modulators attracts the attention. Probably, it is explained by the fact that in vivo modulators would remove an excessive limbical system excitability, connecting cerebellum with collaterals by means of brake receptor inhibition in this brain section could renew the brake function of serotoninceptive neurons.

The fact of affinity increase of serotonin receptors in ventral and dorsal hypocamp sections in rats of both groups under the effect of L- and DL-tryptophane one can consider as a brake process activation in these sections. But the affinity increase was more revealed in low-excitated rats.

In [5] it has been mentioned that during the regulation process of neuron excitability level the dissociation constant of postsynaptic receptors plays the greatest role in comparison with this receptor number, so decreased Cd values of serotonin receptors in amygdala, in ventral and dorsal hypocamp, and increased characteristics of this value in highly-excitated rat cerebellum under the conditions of L- and DL-tryptophane effect a therapeutical effects of these aminoacids could be explained during the treatment of epilepsy patients.

REFERENCES

1. *Avanesova T.S., Sviridova Ye.I.* Therapeutical tryptophane activity and its effect on the serotonin change in patients with epilepsy // Journ. nevrologii i psihiatrii im. Korsakova.– 1980.– 80, № 6.– P. 857–863.
2. *Bekhtereva N.P.* Health and damaged human brain.– Spb.: Nauka, 1988.– 365 p.
3. *Babileyshvily Sh. I.* Tryptophane aminoxide as antiepileptic means // Klinicheskaya meditsina.– 1980.– 58, № 1.– P. 91-96.
4. *Biological* membranes / Ed. by J. Findley, W. Evanz.– M.: Mir, 1990.– 425 p.
5. *Gopkalov V.G.* Serotonin metabolism and reception in rats with different level of audiogenic spastic brain readiness: Author's abstract of PhD (biology).– Kharkov, 1993.– 183 p.
6. *Karlov V.A.* Epilepsy.– M.: Medicina, 1990.– 336 p.
7. *Krushinsky L.V.* Animal's behaviour forming in the norm and pathology.– M.: Publishing House of the Moscow Lomonosov University, 1960.– 162 p.
8. *Pogodayev K.I.* Epileptology and brain pathochemistry (to etiology pathogenesis and epilepsy treatment theory).– M.: Medicina, 1990.–268 p.
9. *Sergiyenko N.G., Grischenko V.I., Lodzinova G.A.* Biogenic monoamines and brain excitability.– Kiyev: Nauk. Dumka, 1992.– 148 p.

Матеріал, захищений авторським правом

3. *Бибилейшвили Ш. И.* Аминокислота триптофан как противоэпилептическое средство // Клиническая медицина.– 1980.– 58, № 1.– С. 91–96.
4. *Биологические* мембраны / Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза.– М.: Мир, 1990.– 425 с.
5. *Голкалов В. Г.* Метаболизм и рецепция серотонина у крыс с разным уровнем аудиогенной судорожной готовности головного мозга: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1993.– 183 с.
6. *Карлов В. А.* Эпилепсия.– М.: Медицина, 1990.– 336 с.
7. *Крушинский Л. В.* Формирование поведения животных в норме и патологии.– М.: Изд-во Моск. ун-та им. Ломоносова, 1960.– 162 с.
8. *Погодаев К. И.* Эпилептология и патохимия мозга (к теории этиологии, патогенеза и лечения эпилепсии).– М.: Медицина, 1990.– 268 с.
9. *Сергиенко Н. Г., Грищенко В. И., Логинова Г. А.* Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга.– Киев: Наук. думка, 1992.– 148 с.
10. *Сергиенко Н. Г., Логинова Г. А., Попова Л. Д.* Пути создания унитарной теории эпилептогенеза // Биологически активные вещества и регуляция функций мозга: Сб. науч. трудов.– Харьков, 1990.– С. 3–11.
11. *Сергиенко Е. Н.* Опыт лечения больных эпилепсией путем коррекции метаболизма триптофана // Биологически активные вещества и регуляция функций мозга: Сб. науч. трудов.– Харьков, 1992.– С. 85–87.
12. *De Groot J.* The rat forebrain in stereotaxis coordinates.– 1959.– 48 p.
13. *De Robertis E.* Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region // Science.– 1967.– 156, № 4.– P. 907–914.
14. *Peroutka S.J., Lebovitz R.M., Snyder S.H.* Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides // Mol. Pharmacol.– 1981.– 16, № 3.– P. 700–708.

Надійшла 09.02.98

10. *Sergiyenko N.G., Loginova G.A., Popova L.D.* Ways of creation of epileptogenesis unitary theory // Biologically active substances and brain function regulation.– Kharkov, 1990.– P. 3–11.
11. *Sergiyenko E.N.* An experience of epilepsy patient's treatment by means of tryptophane metabolism correction // Biologically active substances and brain function regulation: Coll. of Sci. Works.– Kharkov, 1992.– P. 85–87.
12. *De Groot J.* The rat forebrain in stereotaxis coordinates.– 1959.– 48 p.
13. *De Robertis E.* Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region // Science.– 1967.– 156, № 4.– P. 907–914.
14. *Peroutka S.J., Lebovitz R.M., Snyder S.H.* Serotonin receptor binding sites affected differentially by guanine nucleotides // Mol. Pharmacol.– 1981.– 16, № 3.– P. 700–708.

Accepted in 09.02.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.81.013: 57.085.23

UDC 611.81.013: 57.085.23

Особенности пролиферации и дифференцировки нативных криоконсервированных эмбриональных нервных клеток человека. Сообщение 2. Подбор оптимальных условий культивирования нативных клеток эмбрионального мозга человека

Н. Н. БАБЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Peculiarities of proliferation and differentiation of native and cryopreserved human embryonic nerve cells. Part 2. Selection of optimal conditions for native cell culturing of human embryonic brain

N. N. BABENKO

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

Изучены особенности развития эмбриональных нервных клеток человека с использованием различных субстратов для культивирования и нескольких вариантов питательных сред. Показано, что наиболее эффективной является питательная среда DMEM (полная) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, глюкозы и инсулина. Стекло как субстрат для культивирования клеток эмбрионального мозга человека неприемлемо. При использовании коллагена наблюдались рост и пролиферация части клеток. Необходимо решить проблему прикрепления всех жизнеспособных клеток.

Вивчено особливості розвитку ембріональних нервових клітин людини з використанням різних субстратів для культивування та кількох варіантів живильних середовищ. Показано, що найбільш ефективним є живильне середовище DMEM (повне) з додаванням ембріональної телячої сироватки, глюкози та інсуліну. Скло як субстрат для культивування клітин ембріонального мозку людини неприйнятне. При використанні колагену спостерігались ріст та проліферація частини клітин. Необхідно вирішити проблему прикріплення всіх життєздатних клітин.

Peculiarities of the development of human embryonic nerve cells using various substrata for culturing and some variants of cultural media were investigated. It has been shown that DMEM cultural medium (complete) with addition of embryonic bull serum, glucose and insulin is the most efficient. A glass as a substratum for culturing of human embryonic brain cells is not acceptable. When using collagen the growth and proliferation of a part of cells were observed. It is necessary to solve the task of an attachment of all viable cells.

Культивирование клеток эмбрионального мозга человека является одним из доступных и достаточно объективных методов оценки морфофункциональных свойств донорского материала перед клиническим применением. Однако культивирование мозга человека по сравнению с мозгом животных связано с трудностями получения, хранения и транспортировки материала, а также разработки состава питательной среды, метода культивирования и идентификации клеточных элементов.

Преимущества инъекционного введения диссоциированных эмбриональных нервных клеток по сравнению с пересадкой цельных фрагментов эмбриональной ткани в пораженные участки мозга [12] определяют необходимость изучения поведения эмбриональных нервных клеток в условиях суспензионной культуры.

Для культивирования клеток мозга эмбрионов человека важным является подбор подложки. Под-

The culturing of cells of human embryonic brain is one of available and quite objective methods for the estimation of morphofunctional properties of donor's material before clinical application. But the culturing of human brain in comparison with animal brain is entailed some difficulties of obtaining, storage and transportation of material, as well as the development of cultural medium composition, the method of culturing and identification of cellular elements.

The advantages of dissociated embryonic nerve cell injection in comparison with the transplantation of integral fragments of embryonic tissue into affected areas of brain [12] determine the necessity of study of embryonic nerve cell behaviour under conditions of suspension culture.

The selection of an undercover is very important for culturing of human embryo brain cells. Both covering glasses [1, 2, 5] without any attaching media and

Матеріал, захищений авторським правом

ложками могут быть как покровные стекла [1, 2, 5] без каких-либо прикрепляющих сред, так и субстраты, имеющие заряд (коллаген или полиаминокислоты). В данной работе проводилось сравнение эффективности использования различных субстратов при культивировании эмбриональных нервных клеток человека. При этом особое внимание было обращено на механический и ферментативный методы получения клеточной суспензии эмбриональной нервной ткани.

Метод механической дезинтеграции с использованием пастеровских пипеток и специальных нейлоновых сит мало приемлем для ткани мозга эмбрионов поздних сроков (более 12 недель гестации) в связи с интенсивным повреждением отростков, что является причиной гибели нейронов [5].

Метод ферментативной дезинтеграции [11] основан на протеолитическом действии трипсина, что позволяет получать моноклеточную взвесь без агрегатов. Однако решающую роль в обеспечении жизнеспособности клеток играет качество фермента. Хорошие результаты дает лишь применение высокоочищенного фермента, в противном случае наблюдается гибель клеток [8]. Кроме того, клетки, подвергнутые предварительной трипсинизации, хуже переносят процесс замораживания-оттаивания [10], так как трипсин, применяемый даже в очень небольшой концентрации, нарушает свойства проницаемости мембран клеток [6].

В данной работе был применен метод мягкой гомогенизации ткани мозга в гомогенизаторе Поттера. При его использовании исключается повреждающее действие трипсина и не наблюдается значительной гибели клеток, так как объектом исследований являются эмбрионы ранних сроков гестации, когда еще отсутствуют стойкие межклеточные связи.

Наиболее часто компонентами питательных сред, необходимых для культивирования нервных клеток теплокровных животных, являются сыворотка крови, аминокислоты, солевые растворы, экстракты эмбриональных тканей. Существенное значение также имеют глюкоза и инсулин [4, 7]. В последнее время усиливается интерес исследователей к бессывороточным питательным средам известного состава [1, 9].

Изложенное определяет необходимость исследования оптимизации методов культивирования клеток эмбрионального мозга человека ранних сроков гестации. Материалом для исследования служила нервная ткань эмбрионов человека 5–6 (Э5–6) и 10–11 (Э10–11) недель гестации, полученных при искусственных абортах. В стерильных условиях мозг эмбрионов освобождали от мезенхимной оболочки и разрезали на несколько фрагментов. Кусочки мозга переносили в стеклянный гомогенизатор Поттера с 0,5–1,0 мл раствора Хенкса и пестиком осторожно раздавливали фрагменты до получения однородной массы, которую пропус-

substrata with the charge (collagen or polyaminoacids) may be used as the undercover. A comparison of the efficiency of various substrata usage when culturing human embryonic nerve cells was conducted in given work. Thereat a special attention was paid to mechanical and enzymatic methods for the obtaining of cellular suspension of embryonic nerve tissue. The method of mechanical desintegration using Pasteur's pipettes and special nylon sieves is slightly acceptable for brain tissue of embryos of late terms (more than 12 weeks of gestation) in connection with an intensive impairment of sprouts that is the cause of neuron death [5].

The method of enzymatic desintegration [11], is based on a proteolytic effect of trypsin, that allows to obtain a monocellular suspension without aggregates. But the quality of enzyme plays a decisive role in cell viability providing. Only the application of highly purified enzyme provides good results, otherwise, the death of cells are observed [8]. Besides, the method of trypsinization is not quite acceptable for nerve tissue culturing: trypsin applied even in a quite small concentration impairs properties of cell membrane permeability [6]. The cells subjected to a preliminary trypsinization endure freeze-thawing process worse [10].

In given work the method of soft homogenization of brain tissue in Potter's homogenizer was applied. At its usage the trypsin damaging effect is excluded and a considerable death of cells is not observed, since as the object of studies are embryos of early terms of gestation, when stable intracellular interactions are not present yet.

Blood serum, amino acids, saline solutions, embryonic tissues extractions are the most often the components of cultural media necessary for culturing of homoiothermal animals' nerve cells. Glucose and insulin have a great significance too [4,7]. For the recent time the interest of investigators for cultural media without serum of known composition has increased [1,9].

The mentioned above determines the necessity to invesigate the optimization of culturing methods of human embryonic brain cells of early gestation terms. Nerve tissue of human embryos of 5–6 (E5–6) and 10–11 (E10–11) gestation weeks obtained at artificial abortions was a material for study. Under sterile conditions a mesenchyme membrane was removed from embryo's brain and cut into several fragments. Pieces of brain were removed into glass Potter's homogenizer with 0.5–1.0 ml of Henks's solution and fragments were carefully crushed upto the obtaining of gomogenous mass by means of pestle, which was put through the apparatus for blood and blood substitutes transfusion (BT-11-03) and then via syringe needles of reducing diameter. Covering glasses placed into penicilline bottles with cultural medium and Petri dishes of 40 mm diameter, covered with collagen served as the undercover for suspension culture.

Матеріал, захищений авторським правом

кали через устройство для переливания крови и кровезаменителей (ПК-11-03), а затем через инъекционные иглы уменьшающегося диаметра. Подложкой для суспензионной культуры служили покровные стекла, помещенные в пенициллиновые флаконы с питательной средой, и чашки Петри диаметром 40 мм, покрытые коллагеном.

Исходными компонентами среды для культивирования были: питательная среда DMEM, заменимые и незаменимые аминокислоты, витамины, раствор пирувата Na, Hepes-буфер (фирмы "Serva"). Из них готовили основной рабочий состав питательной среды. Для выбора ее оптимального состава использовали три варианта:

I – DMEM (основная) + 10% FBS;

II – DMEM (основная) + 10% FBS + инсулин + глюкоза;

III – DMEM (основная) + глюкоза + инсулин (без FBS).

Концентрация инсулина составляла 0,2 Ед/мл питательной среды, глюкозы – 500 мг%, а конечная концентрация клеток в суспензии для культивирования была $1,0-1,5\cdot10^5$ клеток/мл. Среду меняли каждые 3-4 сут в течение всего периода культивирования. Окраску производили азур-эозином по Романовскому и метиленовым синим по Нисслю согласно методике [5].

Перед культивированием клеток был проведен анализ полученной суспензии. После дезинтеграции и окрашивания 0,3%-м раствором трипанового синего $90 \pm 1,83\%$ клеток нативной суспензии оставались жизнеспособными.

Первым был опробирован метод культивирования эмбриональных нервных клеток (ЭНК) на покровных стеклах без наносимого субстрата в пенициллиновых флаконах с использованием трех питательных сред. Донорским материалом служили клеточные суспензии эмбрионов разных сроков гестации (5–6 и 10–11 недель). Это не имело для культивирования решающего значения, так как клетки во всех вариантах не прикреплялись к стеклу и оставались в суспензии. В осадке после центрифугирования культуральной жидкости определялись как обломки погибших клеток и отростки, так и жизнеспособные клетки. Очевидно, при культивировании нервных клеток применение таких нейтральных (не имеющих заряда) субстратов, как стекло, неприемлемо. Это привело к выводу использовать в качестве подложки пластиковые чашки Петри, но уже покрытые коллагеном, который имеет положительный заряд и мог бы способствовать прикреплению эмбриональных нервных клеток. Этот вариант был опробирован на питательных средах с культивированием клеток двух возрастов донорского материала Э5–6 и Э10–11. При использовании среды I на коллагеновом субстрате прикреплялась лишь часть клеток. На 7-е сутки культивирования клетки как Э5–6, так и Э10–11 располагались монослоем на субстрате, но

Initial medium components for culturing were: cultural medium DMEM, replaceable and essential amino acids, vitamins, solution of Na pyruvate, Hepes-buffer ("Serva" firm). The principal content of cultural medium was prepared from them. To choose its optimal content, 3 variants were used:

I – DMEM (principal) + 10% FBS;

II – DMEM (principal) + 10% FBS + insulin + glucose;

III – DMEM (principal) + glucose+insulin (without FBS).

Insulin concentration was 0.2 Unit/ml of cultural medium, glucose – 500 mg% and final concentration of cells in suspension for culturing – $10-1.5\cdot10^5$ of cells/ml. The medium was changed every 3–4 days during all period of culturing. Staining was performed by means of azur-eosin by Romanovsky and methylene blue by Nissle according to the method [5].

The analysis of suspension obtained was carried out before cell culturing. After desintegration and staining by means of 0.3% solution of trypane blue, $90 \pm 1.83\%$ of native suspension cells remained viable.

The method of embryonic nerve cell (ENC) culturing on covering glasses without substratum in penicillin bottles using three cultural media was tested the first. Cellular suspensions obtained from embryos of different gestation term (5–6 and 10–11 weeks) were served as a donor's material. This fact did not have a decisive significance for culturing, because in all variants the cells were not attached to a glass and remained into a suspension. In sediment after cultural liquid centrifugation both fragments of dead cells and sprouts, and viable cells were determined. It is evident, that during nerve cell culturing the application of such neutral (without charge) substrata as a glass is not acceptable. This fact led to a conclusion to use plastic Petri dishes as an undercover, but already covered with collagen, which had a positive charge and might contribute to the attachment of embryonic nerve cells. This variant was tested on cultural media with cell culturing of two ages of E5–6 and E10–11 donor's material. When using the medium I on collagenous substratum only a part of cells was attached. On the 7th day of culturing both E5–6 and E10–11 cells were located by monolayer on the substratum, but processes of specific adhesion and formation of aggregates were not observed in them. A cellular content was identical to the initial. E5–6 cells were mainly presented by medulloblasts and already by the 10th day of culturing such signs of destruction as pyknosis and flattening of nuclei, vacuolization of cytoplasm and "obscurity" of cellular membranes became notable in them. It should be noted that such a picture was observed when using all variants of cultural media for E5–6. So we concluded that differentiation of nerve cells in culture was related to an age of initial material.

According to [3] the intracellular interactions and the signals by those cells exchanged [illegible] such

Матеріал, захищений авторським правом

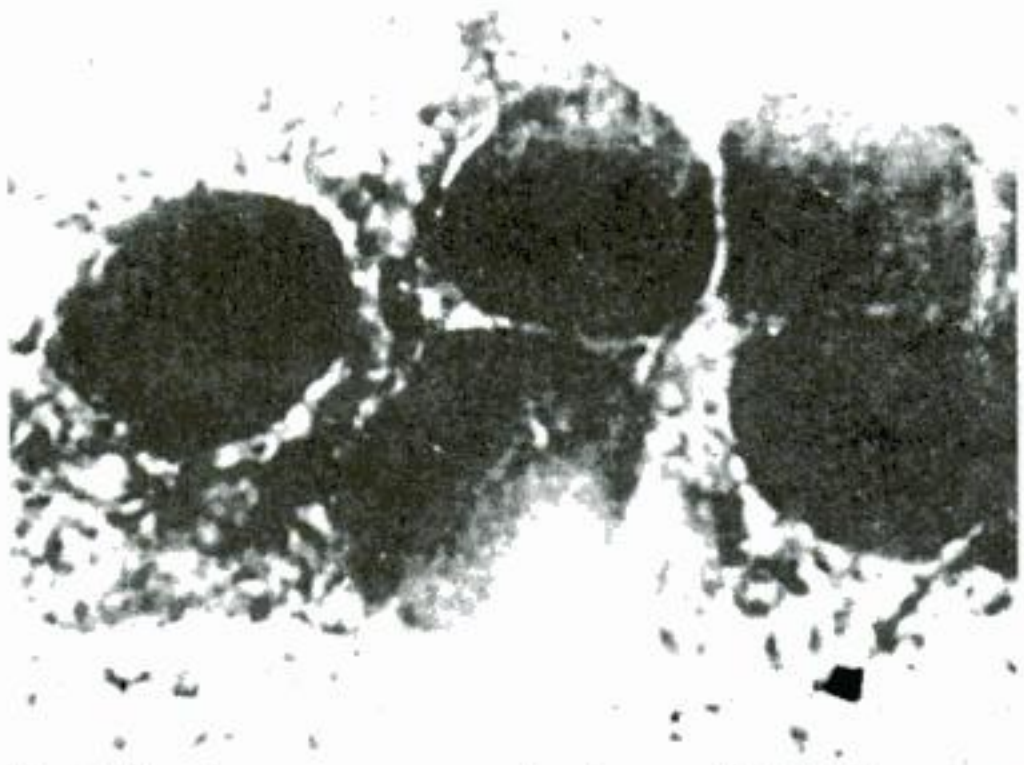


Рис. 1. Телофаза в монослое нейробластов Э10–11. Коллаген, среда I, 7 сут культивирования. Суспензионная культура

Fig. 1. Telophase in a monolayer of neuroblasts E10–11. Collagen, medium I, 7 days of culturing. Suspension culture

в них не наблюдались процессы специфической адгезии и образования агрегатов. Клеточный состав был идентичен исходному. Клетки Э5–6 были представлены в основном медуллобластами и уже к 10-м суткам культивирования в них стали заметны признаки деструкции: пикноз и сплющивание ядер, вакуоляризация цитоплазмы и "размытость" клеточных мембран. Следует отметить, что такая картина наблюдалась при использовании всех вариантов питательных сред для Э5–6. Поэтому был сделан вывод, что дифференцировка нервных клеток в культуре связана с возрастом исходного материала.

В соответствии с [3] для дифференцировки клеток эмбриона Э5–6 *in vivo* важную роль играют межклеточные взаимодействия и те сигналы, которыми обмениваются клетки, информируя друг друга о своем положении, закрепляя генетическую программу дальнейшего развития. Нарушение этих межклеточных взаимодействий в процессе дезинтеграции приводит к утрате клетками ранних сроков гестации способности к прогрессивной дифференцировке и последующей гибели в условиях культивирования.

Монослой клеток Э10–11 к 7-м суткам культивирования был представлен нейробластами. Морфологическая характеристика этих клеток идентична таковой *in vivo*. Клетки имели большое ядро, иногда два–три или более ядрышка, расположенных эксцентрично, и тонкий ободок цитоплазмы без специфической зернистости (рис. 1). Иногда встречались клетки в состоянии митотического деления.

На 14-е сутки культивирования клетки Э10–11 распластывались на субстрате. В отдельных клетках ядра располагались эксцентрично, и клетка приобретала полярность (рис. 2). Однако наряду с началом дифференцировки у части клеток культуры наблюдались явления деградации. К 21-м суткам культивирования все клетки погибали. Следовательно, нервным клеткам для успешной



Рис. 2. Начало распластывания клеток на коллагене. Суспензионная культура. Э10–11, среда I, 14 сут культивирования

Fig. 2. Beginning of cell spreading on collagen. Suspension culture. E10–11, medium I, 14 days of culturing

other on their position, fixing a genetic program of following development, play an important role for differentiation of E5–6 embryo cells *in vivo*. The impairment of these intracellular interactions during the desintegration process results in a loss by cells of early terms of gestation of the ability to a progressive differentiation and following death under culturing conditions.

The monolayer of E10–11 cells by the 7th day of culturing was presented by neuroblasts. A morphological characteristics of these cells are identical to that *in vivo*. Cells had a big nucleus, sometimes two-three or more nucleoli located eccentrically, and a thin skin of cytoplasm without specific graininess (Fig. 1). Sometimes we found cells in the state of mitotic fission.

On the 14th day of culturing, E10–11 cells were spread on the substratum. In some cells the nuclei were located eccentrically and a cell acquired polarity (Fig. 2). But side by side with the beginning of the differentiation, the phenomena of degradation in a part of cultural cells were observed. By the 21th day of culturing all cells died. But nerve cells need exogenous factors shifting the metabolism of cell in the side of anabolism for a successful defferentiation and the increase in survival term in a culture. The most known from them are insulin and glucose [4], we included into the composition of culturing medium III. Under serum-free conditions only single cells were attached to the substratum and a principal mass was suspended in the cultural medium and was removed at its first change. So, the medium II (with addition of serum, insulin and glucose) and collagen was used as a substratum. In given variant of the culturing, cells were adhesed to an undercover, covered with a collagen. On the 7th day the monolayer presented by both neuroblasts, and glioblasts was determined. Neuroblasts had cone-, pyramid-like or poloymorphous shape with a buble-like clear nucleus containing nucleoli. On the 14th day initial stages of sprouts forming with a cone shape with some thickenings at

Матеріал, захищений авторським правом

дифференцировки и увеличения срока переживания в культуре необходимы экзогенные факторы, сдвигающие метаболизм клетки в сторону анаболизма. Наиболее известными из них являются инсулин и глюкоза [4], которые были включены нами в состав питательной среды III. В условиях бессывороточной среды только единичные клетки прикреплялись к субстрату, основная же масса была взвешенной в питательной среде и удалялась при первой ее смене. Поэтому были использованы среда II (с добавлением сыворотки, инсулина, глюкозы) и коллаген в качестве субстрата. В данном варианте культивирования клетки адгезировались к подложке, покрытой коллагеном. На 7-е сутки определялся монослой, представленный как нейробластами, так и глиобластами. Нейробласты имели конусовидную, пирамидальную или полиморфную форму с пузыревидным светлым ядром, содержащим ядрышки. На 14-е сутки наблюдались начальные стадии формирования отростков в виде конуса с утолщениями на концах (рис. 3). Глиальные клетки отличались от нейрональных более выраженным сродством с красителями и имели небольшие размеры, темное, богатое хроматином ядро. Отростки глиальных клеток были тонкими и прямолинейными, без утолщений.

К 21-м суткам культивирования отростки нервных и глиальных клеток образовывали на поверхности субстрата сложные сплетения (рис. 4, 5). О зрелости нейрональных элементов свидетельствовал ряд морфологических критериев: рост ядра и перикариона, наличие нисслевского вещества, дифференцированных дендритов и аксона. Однако дальнейшей дифференцировки, синаптогенеза и миелинизации выявлено не было, что можно объяснить отсутствием в системе экзогенных факторов роста нервной ткани и гибели клеток к 28-му дню культивирования.

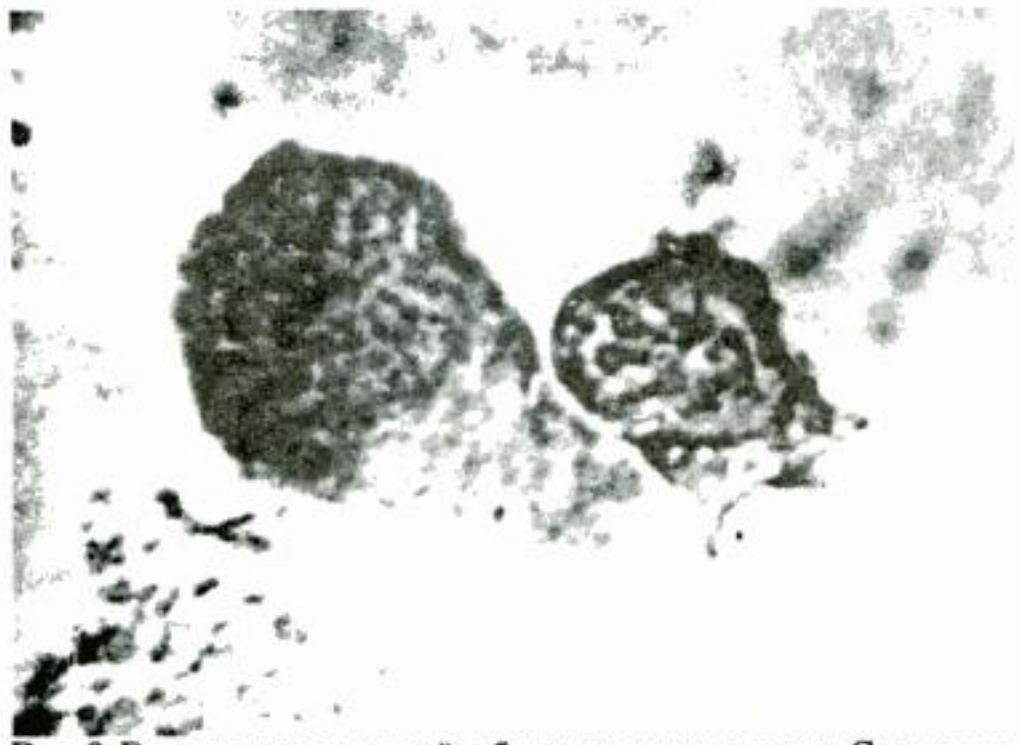


Рис. 3. Распластывание нейробластов на коллагене. Суспензионная культура. Э10–11, среда II, 14 сут культивирования

Fig. 3. Neuroblast spreading on collagen. Suspension culture E10–11, medium II, 14 days of culturing

extremities were observed (Fig. 3). Glial cells differed from neuronal ones by a more manifested affinity with dyes and had small sizes, dark and chromatin rich nucleus. Sprouts of glial cells were thin and linear, without thickenings.

By the 21th day of culturing sprouts of nerve and glial cells formed on the surface of substratum compound combinations (Figs. 4, 5). A number of morphological criteria testified to the maturity of neuronal elements: nucleus and perikaryon growth, the presence of nissle substance, differentiated dendrites and axons. But following differentiation, synaptogenesis and myelinization were not revealed, that may be explaned by the absence of exogenous factors of nerve tissue growth and cell death by the 28th day of culturing.

So, it has been established that among 3 tested variants of cultural media, the medium II was the most efficient. A necessary component of cultural medium is a serum, containing certain glycoproteins and proteins contributing to cell growth. The combination

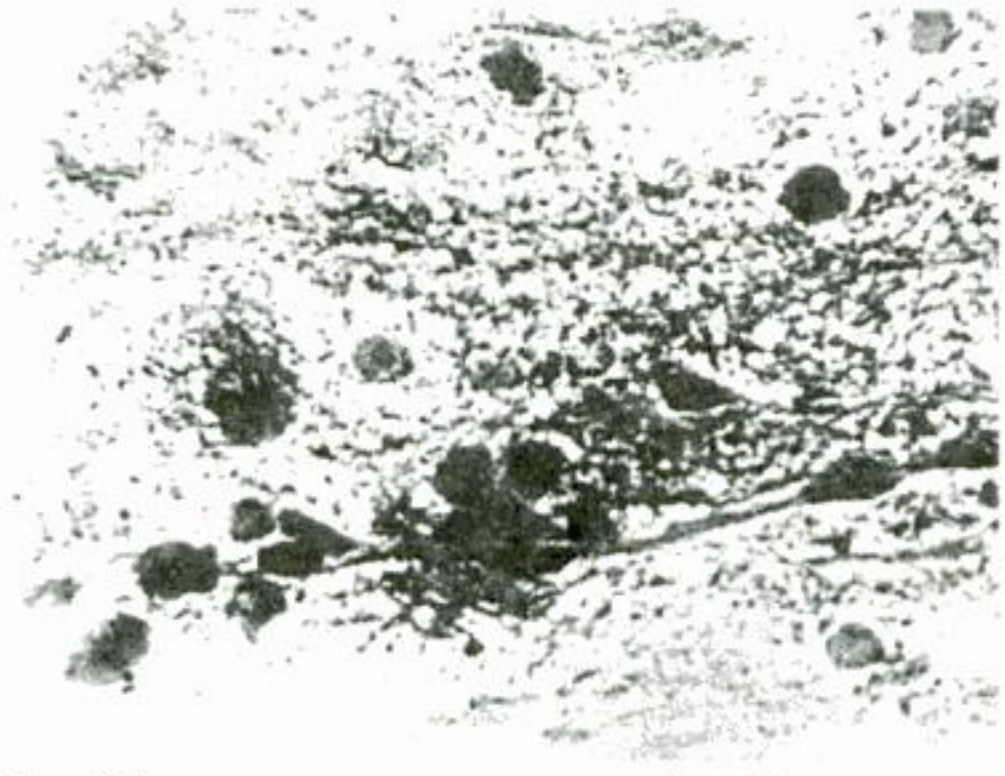


Рис. 4. Система межклеточных взаимодействий в суспензионной культуре. Коллаген. Э10–11, среда II, 21 сут культивирования

Fig. 4. System of itracellular interactions in suspension culture. Collagen, E10–11, medium II, 21 days of culturing

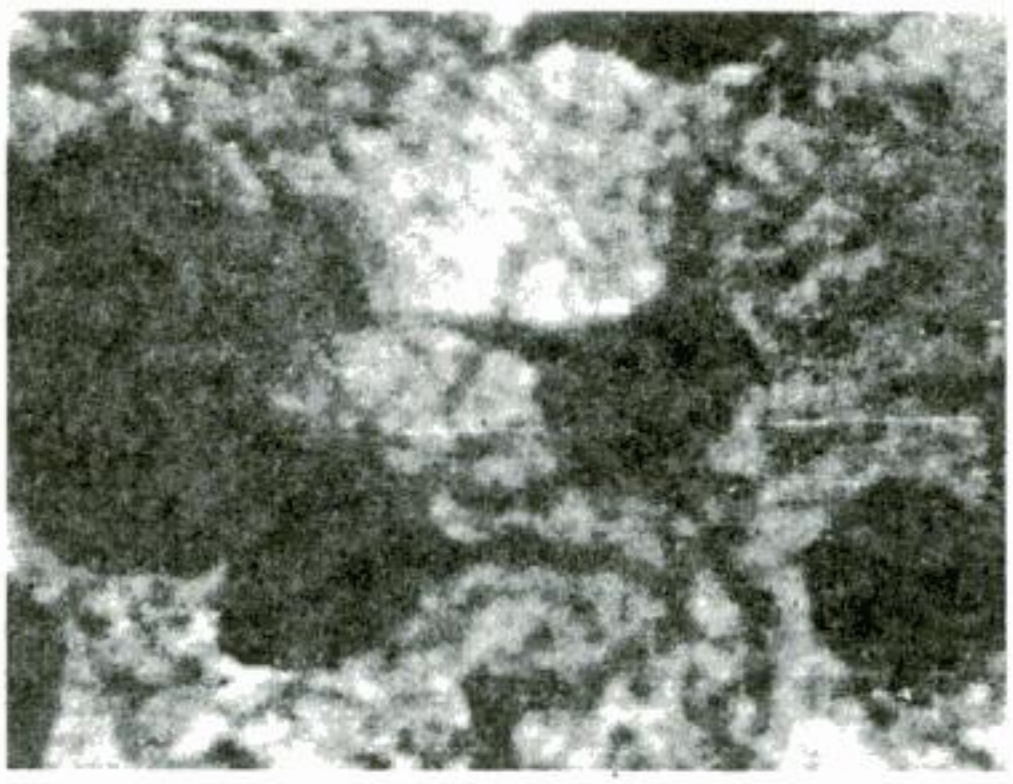


Рис. 5. Мультиполярный нейрон в зрелой суспензионной культуре. Коллаген. Э10–11, среда II, 21 сут культивирования

Fig. 5. Multipolar neuron in mature suspension culture, E10–11. Collagen, medium II, 21 days of culturing

Матеріал, захищений авторським правом

Итак, было установлено, что из опробированных 3-х вариантов питательных сред наиболее эффективной оказалась среда II. Необходимым компонентом питательной среды является сыворотка, содержащая определенные гликопротеины и белки, которые способствуют росту клеток. Сочетание метода механической дезинтеграции, питательной среды II и коллагена позволили клеткам переживать и дифференцироваться в культуре вплоть до 21-х суток культивирования. Это дает возможность культивировать ЭНК с целью тестирования их жизнеспособности и гистотипических потенций перед клиническим применением.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балабанов Ю. В., Павлов О. В., Бобрышев Ю. В.* Получение "чистых" культур нейронов головного мозга эмбрионов человека // Цитология.– 1992.– Т. 34, № 5.– С. 83–89.
2. *Востряков В. М., Буравлев В. М., Бурбаева Г. Ш., Турсунова Ю. Д.* Идентификация клеток различного генеза в культуре эмбрионального мозга человека с помощью моноклональных антител к глиальному фибриллярному кислому белку // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова.– 1989.– Т. 89, № 7.– С. 12.
3. *Нейроонтогенез* / К. Т. Будко, Н. Г. Гладкович, Е. В. Максимова и др..– М.: Наука, 1985.– С. 272.
4. *Пути* и способы создания бессывороточных сред для культивирования клеток млекопитающих.– М., 1985.– С. 234.
5. *Руководство* по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы.– М.: Наука, 1988.– С. 318.
6. *Чумасов Е. И., Чалисова Н. И.* Современные аспекты культивирования нервных тканей // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.– 1985.– Т. 89.– С. 87–93.
7. *Aizenmann Y., de Vellis J.* Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effect of transferrin insulin, insulin-like growth factor-1 and thyreiodic hormone on neuronal survival, growth and differentiation // Brain Res.– 1987.– V. 406.– P. 32–42.
8. *De Long G.R.* Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures // Develop. Biol.– 1970.– V. 22.– P. 563–583.
9. *Jean-Claude L., Langley K., Anglard P., et al.* Long-term culture of neurones from human cerebral cortex in serum-free medium // Neurosi. Lett.– 1983.– V. 41.– P. 313–319.
10. *Kawamoto J.C., Barret J.* Cryopreservation of Primary Neurons for Tissue Culture // Brain Res.– 1986.– V. 384.– P. 84–93.
11. *Moscona A.A.* Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates // Cell and tissue in culture / Ed. E. Wilmer.– N.Y.: Acad. press.– 1965.– V. 1.– P. 489–529.
12. *Ridley R.M., Baker H.F.* Can fetal neural transplants restore function in monkeys with lesion-induced behavioral deficits // Trends Neurosi.– 1991.– 14, № 8.– P. 366–370.

Поступила 24.03.98

of mechanical desintegration method, cultural medium II and collagen allowed to cells to survive and to be differentiated in the culture up to the 21th culturing day. That allows to cultivate ENC for testing their viability and histotypical potencies before clinical application.

REFERENCES:

1. *Balabanov Yu.V., Pavlov O.V., Bobryshev Yu.V.* Obtaining of "pure" cultures of human embryo brain neurons // Cytologiya.– 1992.– V. 34, № 5.– P. 83–89.
2. *Vostrikov V.M., Buravlev V.M., Burbayeva G.Sh., Tursunova Yu.D.* Cell identification of different genesis in culture of human enbryonic brain by means of monoclonal antibodies to a glial fibrillar acid protein // Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. Korsakova.– 1989.– V. 89, № 7.– P. 12.
3. *Neuroontogenesis* / Budko K.P., Gladkovich N.G., Maksimova E.V. et al.– M: Nauka, 1985.– P. 272.
4. *Ways* and methods of serum-free media creation for culturing of mammalia cells.– M.: 1985.– P. 234.
5. *Manual* on nerve tissue culturing. Methods. Techique. Problems.– M.: Nauka, 1988.– P. 318.
6. *Chumasov E.I., Chalisova N.I.* Modern aspects of nerve tissue culturing // Archives of anatomy, histology and embryology.– 1985.– V. 89.– P. 87–93.
7. *Aizenmann Y., de Vellis J.* Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effect of transferrin insulin, insulin-like growth factor-1 and thyreiodic hormone on neuronal survival, growth and differentiation // Brain Res.– 1987.– V. 406.– P. 32–42.
8. *De Long G.R.* Histogenesis of fetal mouse isocortex and hippocampus in reaggregating cell cultures // Develop. Biol.– 1970.– V. 22.– P. 563–583.
9. *Jean-Claude L., Langley K., Anglard P., et al.* Long-term culture of neurones from human cerebral cortex in serum-free medium // Neurosi. Lett.– 1983.– V. 41.– P. 313–319.
10. *Kawamoto J.C., Barret J.* Cryopreservation of Primary Neurons for Tissue Culture // Brain Res.– 1986.– V. 384.– P. 84–93.
11. *Moscona A.A.* Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates // Cell and tissue in culture / Ed. E. Wilmer.– N.Y.: Acad. press.– 1965.– V. 1.– P. 489–529.
12. *Ridley R.M., Baker H.F.* Can fetal neural transplants restore function in monkeys with lesion-induced behavioral deficits // Trends Neurosi.– 1991.– 14, № 8.– P. 366–370.

Accepted on 24.03.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.68: 616-089

UDC 611.68: 616-089

Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть III. Криоконсервирование

Т. А. КАЛИНИЧЕНКО, А. Н. ГОЛЬЦЕВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part III. Cryopreservation

T. A. KALINICHENKO, A. N. GOLTSEV

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

Статья завершает цикл авторских работ, посвященных анализу биологических свойств кордовой крови человека. В ней рассматривается проблема значимости модификации различных этапов технологического процесса консервирования материала (условий сбора, хранения перед консервированием, использование сепарационных процедур, программ криоконсервирования и др.) в обеспечении сохранности основных структурно-функциональных параметров мононуклеаров кордовой крови.

Стаття завершує цикл авторських робіт, присвячених аналізу біологічних властивостей кордової крові людини. У ній розглядається проблема значущості модифікації різних етапів технологічного процесу консервування матеріалу (умов збору, зберігання перед консервуванням, використання сепараційних процедур, програм кріоконсервування та ін.) у забезпеченні збереження основних структурно-функціональних параметрів мононуклеарів кордової крові.

The article completes the cycle of authors' works devoted to the analysis of human umbilical blood biological properties. The problem of the value of modification of various stages of technological process of material cryopreservation (conditions of collection, storage before cryopreservation, usage of special procedures, cryopreservation programs etc.) in providing the preservation of main structural and functional parameters of cord blood mononuclears are considered in it.

Преимущества применения гемопоэтических клеток (ГК) кордовой крови человека (ККЧ) в клинической практике (доступность, быстрота подбора трансплантата, возможность использования в качестве источника клеток для экспансии и генной терапии, сниженный риск развития болезни "трансплантат против хозяина" [27]) обусловили необходимость создания запасов этого источника гемопоэтической ткани и длительного ее хранения. Острота данной проблемы связана с особенностями получения ККЧ. Разрыв во времени между моментом ее заготовки и введением в организм реципиента определяет необходимость применения технологий, позволяющих длительно сохранять материал в биологически полноценном состоянии.

Криобиологические аспекты данной проблемы являются логическим продолжением многолетних фундаментальных исследований в области криоконсервирования гемопоэтических клеток костного мозга (КМ), эмбриональной печени, периферической крови. При долгосрочном их хранении учитываются опыт и достижения, полученные в процессе криоконсервирования других биологических объектов.

В настоящее время поиск эффективных методик консервирования ГК ККЧ ставит исследователей перед необходимостью оптимизации технологического процесса от момента сбора до подготовки материала к введению в организм реципиента после размораживания.

The application advantages of hemopoietic cell (HC) of human umbilical blood (HUB) in clinical practice (availability, short term of transplant selection, possibility of usage as a source of cells for expansion and gene therapy, reduced risk of the GVHD development [27]) substantiated the necessity of the creation of hemopoietic tissue source stocks as well as its prolonged storage. The actuality of given problem is related to the peculiarities of HUB obtaining. The time gap between the moment of its procurement and introduction into an organism of the recipient determines the necessity of the application of technologies, permitting to prolongly store the material in biologically valuable state. Cryobiological aspects of this problem are logic continuation of many years' fundamental investigations in the field of cryopreservation of hemopoietic cells from bone marrow (BM), embryonic liver, peripheric blood. During prolonged their storage the experience and achievements, obtained in the cryopreservation process of other biological objects, are taken into consideration. Today the search for efficient methods of cryopreservation of HUB HC forces the investigators to optimize technological process from the moment of collection to the preparation of the material to introduction into recipient's organism after freeze-thawing.

An initial stage of the material obtaining from a donor is very important for the procurement of qualitative sample from the point of view of its volume and composition. All existing methods of HUB collection

Матеріал, захищений авторським правом

Начальный этап получения материала от донора очень важен для заготовки качественного образца с точки зрения его объема и состава. Все существующие методы сбора ККЧ условно подразделяются на две группы получения: в "открытой" и "закрытой" системах [36]. При этом кровь либо свободно истекает из материнского конца пересеченной пупочной вены [21, 22], либо извлекается из него с помощью аспирационной иглы в замкнутую систему [25, 36, 38] в тот момент родового акта, когда плацента еще находится *in utero*. В обоих случаях за счет маточных сокращений можно получить от 80 до 160 мл крови. К образцу иногда добавляется кровь, полученная с помощью аспирационной иглы из наполненных сосудов фетальной поверхности родившейся плаценты [36]. В настоящее время отдается предпочтение использованию сбора в "закрытой" системе, так как очень важным его преимуществом является меньший риск микробного загрязнения и контаминации материнскими клетками [25, 36, 38]. Согласно [20] степень бактериального загрязнения при "открытом" сборе увеличивается в четыре раза. Усовершенствованные методы сбора ККЧ позволяют получить достаточно большой ее объем без ущерба для матери и новорожденного [34], при этом особое внимание уделяется времени пережатия пуповины и скорости взятия крови относительно этапов родового акта [23]. Наиболее раннее наложение клемм на пупочные сосуды [20, 27] позволяет получить большой объем крови и соответственно большее содержание в ней ядерных элементов. Однако Beguin Y. et al. [18] считают, что объем и качество образца, в частности содержание $CD34^+$-клеток, но не наличие гранулоцитарно-макрофагальных предшественников гемопоэза (КОЕ-ГМ) прямо зависит от веса новорожденного, а не от быстроты пережатия пуповины. Эти же авторы приводят интересные сведения о наличии зависимости между качеством образца и временем суток его получения. При подсчете коммитированных гемопоэтических предшественников (ГП) оказалось, что самые малые их количества были получены при родах между 6^{00} и 12^{00} часами, при этом зависимости между объемом крови и временем родов выявлено не было [18].

Экспериментальные данные и опыт клинического применения криоконсервированного КМ свидетельствуют о значении обеспечения защитного потенциала миелотрансплантата от условий его предобработки перед замораживанием [4, 6, 8]. Заслуживает особого внимания вопрос о допустимых сроках, а также условиях хранения образца перед последующим консервированием. Анализ различных режимов предобработки ККЧ перед замораживанием [15, 22, 25, 36, 38] показал, что жизнеспособность ГП ККЧ остается практически неизменной в течение 24-х часов с момента сбора при постоянной комнатной температуре. Так, Thierry D. et al. [38] на основании сравнительных исследований жизнеспособности предшественников гранулоцитарно-макрофагального (КОЕ-ГМ) и эритроцитарного (БОЕ-Э) звеньев гемопоэза в

are conditionally divided into two groups: obtaining in "open" and "closed" systems [36]. Thereat the blood either easily bleeds from the mother's end of intersected umbilical vein [21, 22] or is taken from it by means of aspirational needle into a closed system [25,36,38] in that moment of the labors act when placenta is still *in utero*. In both cases due to uterus contractions one can obtain from 80 to 160 ml of blood. Sometimes to the sample the blood obtained by means of aspirational needle from filled vessels of fetal surface of born placenta is added [36]. Today the preference is given to the usage of collection into a "closed" system, because its important advantages are lower risk of microbic contamination by mother's cells [25, 36, 38]. According to [20] the degree of bacterial contamination at "open" collection rises in four times. Improved methods of HUB collection allow to obtain its quite a large volume without any damage for a mother and new born [34], thereat a special attention is paid to the time of umbilical cord overpressing and the time of blood obtaining in respect to the stages of labors act [23]. The earliest terminal setting on umbilical vessels [20, 27] permits to take a big blood volume and correspondingly, a bigger content in it of nuclear elements. But Beguin Y. et al. consider that the volume and quality of the sample, in particular $CD34^+$-cells, but not the presence of granulocyte-nacrophage precursors of hemopoiesis (CFU-GM) directly depends on the weight of a new born, and not on the quickness of umbilical cord overpressing. The same authors report interesting data on the existence of the dependency between the sample quality and the time of a day of its obtaining. When calculating committed hemopoietic precursors (HP) their small amounts occured to be obtained during the labors between 6.00 a.m. and 12.00 p.m., in this case the dependencies between the blood volume and the labors time were not revealed [18].

Experimental data and experience of clinical application of cryopreserved BM testify to the value of providing the protective potential of myelotransplant on the conditions of pretreatment before freezing [4, 6, 8]. The question of admissible terms as well as conditions of the sample storage before subsequent cryopreservation is of a special attention. The analysis of different regimens of HUB pretreatment before freezing [15, 22, 25, 36, 38] demonstrated that HUB HP viability remains practically unchanged within the first 24 hrs from the moment of collection at constant room temperature. Thierry D. et al. [38] on the base of comparative studies of viability of precursors of granulocyte-macrophage (CFU-GM) and erythrocyte (BFU-E) links of hemopoiesis in HUB samples during 24 hrs and more from the moment of collection concluded: blood should be subjected to preservation not later than 24 hrs from the moment of procurement, that confirmed by a decrease in the growth of hemopoietic colonies at more prolonged storage down to 50% [28]. When determining optimal conditions of

Матеріал, захищений авторським правом

образцах ККЧ в течение суток и более от момента сбора сделали вывод: кровь следует подвергать консервации не позднее 24-х часов с момента сбора, что подтверждается снижением роста гемопоэтических колоний при более продолжительном хранении до 50% [28]. При определении оптимальных условий предобработки ККЧ Campos L. et al. [25] особое внимание уделили изучению как временных (до 48 ч), так и температурных (4 и 25 °С) параметров. При этом было отмечено значительное влияние на сохранность ядерных элементов, КОЕ-ГМ, КОЕ-ГЭММ, БОЕ-Э температуры хранения перед замораживанием. Авторы наблюдали отсутствие потери клеток-предшественников при хранении образцов до 48 ч при 25 °С, однако снижение температуры до 4 °С значительно изменяло качество образца. После 48 ч хранения в таком режиме потери составляли: для всех ядерных элементов — до 36%, для КОЕ-ГМ — до 66%, для БОЕ-Э и КОЕ-ГЭММ — до 56%. Broxmeyer H. E. et al. [22] не наблюдали значительного снижения количества кроветворных предшественников в образцах, хранившихся даже до 72-х часов как при температуре 25 °С, так и 4 °С. Однако оказалось, что зависимость качества образцов от условий предподготовки в значительной степени возрастает при их тестировании после замораживания и оттаивания. Так, по данным Campos L. et al. [25], в образцах ККЧ, хранившихся до замораживания 48 ч при 4 °С, после оттаивания была обнаружена почти полная гибель (до 90%) ГП, а хранение образцов на протяжении того же времени при 25 °С вызвало следующее снижение содержания предшественников: КОЕ-ГМ — до 36, БОЕ-Э — до 64, КОЕ-ГЭММ — до 72%. По результатам тестирования отмечалось незначительное (до 5%) снижение ГП в различных образцах ККЧ только при хранении до 24-х часов при 25 °С [25]. На примере этих данных прослеживается общая закономерность изменения чувствительности кроветворных предшественников из различных источников к действию факторов криоконсервирования при изменении условий предобработки клеток. Так, в [11] отмечается незначительное снижение колониеобразующей способности коммитированных костномозговых кроветворных предшественников различных линий при их хранении (22 и 4 °С) на протяжении 72-х часов. Однако дальнейшее криоконсервирование миелокариоцитов сопровождалось резким снижением колониеобразования. Уже на этапах гипотермического хранения КМ кроветворные клетки "сенсибилизируются" к отрицательному действию факторов криоконсервирования за счет альтерации их мембран в условиях гипоксии и аутолиза [33].

Итак, результаты исследований подтверждают, что условия хранения ККЧ перед замораживанием имеют особо важное значение для обеспечения сохранности качества клеток-предшественников кроветворения. Это обстоятельство учитывается при транспортировке образцов из пункта сбора к месту дальнейшей обработки.

HUB pretreatment Campos et al. [25] paid a special attention to the investigation of both time (upto 48 hrs) and temperature (4 and 25 °C) parameters. Thereat a significant effect of the storage temperature before freezing on the integrity of nuclear elements (CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E) was noted. The authors observed the absence of the loss of cells-precursors at the storage of samples upto 48hrs at the temperature of 25 °C, but a reduction of temperature down to 4#C considerably changed the sample quality. After 48 hrs' storage in such a regimen the losses made: for all nuclear elements — upto 36, for CFU-GM — upto 66, for BFU-E and CFU-GEMM — upto 56%. Broxmeyer H.E et al. [22] did not observe a significant decrease in a nuber of hemopoietic precursors in the samples, stored even upto 72 hrs both at the temperature of 25 and 4 °C. but the dependency of sample quality on the conditions of preliminary preparation occured to be increased in a considerable extent at their testing after freezing and thawing. According to the data of Campos L. et al. [25] in HUB samples stored bofore freezing during 48 hrs at 4 °C, after thawing almost complete death of HP (upto 90%) was found, and the storage of samples within the same time at 25 °C caused the following reduction on the content of precursors: CFU-GM — down to 36, BFU-E — down to 64, CFU-GEMM — down to 72%. On the results of testing a slight (to 5%) decrease in HP of various samples of HUB only during the storage upto 24 hrs at 25 °C was noted [25]. On the example of these data one can trace the regularity of the change in sensitivity of hemopoietic precursors from different sources to the effect of cryopreservation factors when changing the conditions of preliminary treatment of cells. In this way in [11] an insignificant decrease in colony-forming ability of committed bone marrow hemopoietic precursors of different lines at their storage (22 and 4 °C) within 72 hrs was observed. However further cryopreservation of myelokaryocytes was accompanied by a sharp reduction in the colony-formation. Even at the stages of BM hypothermic storage hemopoietic cells are "sensibilized" to negative effect of cryopreservation factors due to the alteration of their membranes under conditions of hypoxia and autolysis [33].

So the results of investigations confirm that the conditions of HUB storage before freezing are of very importance for providing the integrity of the quality of cells-precursors of hemopoiesis. This curcumstance is considered during sample transportation from the place of procurement to the place of further treatment.

It should be noted that a final result of providing the integrity of hemopoietic precursors is affected by a lot of manipulations, accomplished at the stages of complicated technological process of cryopreservation, especially separational procedures. Correct choice of the fractionation methods for the increase in HC concentration in this or that source of hemopoietic tissue requires the analysis of distribution of different kinds

Матеріал, захищений авторським правом

Следует отметить, что на конечный результат обеспечения сохранности кроветворных предшественников ККЧ оказывают влияние многие манипуляции, проводимые на этапах сложного технологического процесса криоконсервирования, особенно сепарационные процедуры. Правильный выбор методики фракционирования для повышения концентрации ГК в том или ином источнике кроветворной ткани требует анализа распределения различных видов этих клеток в зависимости от их плотности. Было установлено [15], что наиболее ранние клетки со свойствами "стволовых" обладают самой низкой плотностью (менее 1,063 г/мл), причем до 87% кроветворных предшественников ККЧ располагаются в слоях плотностью меньше 1,070 г/мл. Однако некоторая часть этих клеток все же находится в более плотных слоях. По мере созревания клеток плотность их повышается. Такая характеристика клеток ККЧ не противоречит данным, полученным для КМ, согласно которым миелобласт — наиболее легкая клетка, а зрелый нейтрофил — наиболее тяжелая [3]. Следовательно, как и при разработке методик фракционирования КМ, следует считать правомерным использование градиентов плотности веществ для выделения примитивных клеток-предшественников ККЧ в отдельную фракцию.

Однако первые результаты исследований, полученные в условиях, близких сепарации КМ, были неудовлетворительными [40]. Так, Broxmeyer H. E. et al. [22] наблюдали значительную потерю ГП ККЧ при фракционировании методом центрифугирования на градиенте плотности (ρ = 1,077 г/мл) фиколл/гипака. Thierry et al. [38] изучали различные технологии отделения мононуклеаров ККЧ: сепарацию центрифугированием на градиентах фиколла различной плотности; седиментацию с помощью раствора, содержащего 3% желатина (plasmagel); простое центрифугирование. Как показал анализ потерь КОЕ-ГМ, составляющих от 30 до 75%, ГП ККЧ весьма чувствительны к таким физическим воздействиям, как центрифугирование. Исследования Campos L. et al. [25] подтвердили данный вывод. При тестировании размороженных образцов низкоплотностной фракции мононуклеаров ККЧ, полученной в результате центрифугирования на градиенте фиколла (ρ = 1,077 г/мл), авторы наблюдали потерю КОЕ-ГМ до 10%, КОЕ-ГЭММ и БОЕ-Э — до 30–40%, а потери клеток-предшественников всех видов в размороженном цельном материале составляли до 10%. Все это вызвало опасения возможного снижения количества ККЧ при попытке повышения их концентрации методом центрифугирования в градиенте [22, 27]. Кроме того, выделение ГК в отдельную фракцию может снизить эффективность приживления образца за счет удаления акцессорно-регуляторных клеточных популяций, определяющих его функциональную полноценность [5]. Существует мнение, что если ККЧ собраны для трансплантации, то не следует разделять трансплантат на различные субпопуляции [38]. Такое видение проблемы привело

of these cells depending on their density. It has been established [15] that the earliest cells with the properties of "stem" ones possess the lowest density (less than 1,063 g/ml), where to 87% of hemopoietic precursors of HUB are located in the layers with the density less than 1,070 g/ml. However some part of these cells are still in more dense layers. With the maturation of cells their density increases. Such characteristics of the HUB cells are not in contradiction to the data obtained for BM, according to those myeloblast is more light cell, and mature neutrophil is the heaviest [3] one. So as during the development of the methods of BM fractionation one should consider the usage of the gradients of substance density rightful for the isolation of primitive cells-precursors of HUB into a separate fraction.

But the first results of studies obtained under conditions of close to BM separation were unsatisfactory [40]. In this way Broxmeyer H.E. et al. [22] observed a significant loss of HUB HP during the fractionation by centrifugation method at the density gradient of Ficoll-Hypaque (ρ = 1,077 g/ml). Thierry et al. [38] investigated different technologies of separation of HUB mononuclears: separation by means of centrifugation at the Ficoll gradients of various density; sedimentation by means of the solution, containing 3% gelatin (plasmagel); conventional centrifugation. As the analysis of CFU-GM losses, comprising from 30 to 75%, demonstrated, HUB HC are very sensitive to such physical effects as the centrifugation. Studies of Campos et al. [25] confirmed the present conclusion. When frozen-thawed samples of low density fraction of HUB mononuclears, obtained in the result of centrifugation at the gradient of Ficoll (ρ = 1,077 g/ml) were tested, the authors observed the CFU-GM loss — upto 10%, CFU-GEMM and BFU-E — upto 30–40%, and the losses of cells-precursors of all types in frozen-thawed whole material made upto 10%. All this excited apprehension of probable decrease in the HUB amount at the attempt of their concentration increase by the centrifugation in the gradient [22, 27]. Besides HC isolation into a separate fraction may reduce the efficiency of sample retention due to the removal of accessory recgulatory cellular populations, determining its functional integrity [5]. There is a notion, that if HUB is taken for transplantation, then the transplant should not be divided into different subpopulations [38]. Such consideration of the task resulted in the fact that today in many cases HUB is stored and used for transplantation as non-fractioned [18, 27, 28, 36].

But in spite of all negative causes of separational procedures application in the process of HUB preparation for freezing, the investigators have continued to search effective ways of its mononuclear frcation isolation. HUB clinical application as well as BM, foresees the removal from the transplant of erythrocytes, lysis products of (free hemoglobin, membranes) those cause the development of side effects in the

Матеріал, захищений авторським правом

к тому, что в настоящее время во многих случаях ККЧ хранится и используется для трансплантации в нефракционированном виде [18, 27, 28, 36].

Однако, несмотря на все отрицательные стороны применения сепарационных процедур в процессе подготовки ККЧ к замораживанию, исследователи продолжают поиск эффективных способов выделения ее мононуклеарной фракции. Клиническое применение ККЧ, как и КМ, предусматривает удаление из трансплантата эритроцитов, продукты лизиса которых (свободный гемоглобин, мембраны) вызывают развитие побочных эффектов в организме реципиента, что особенно актуально при несовместимости пар донор–реципиент по системе АВО [30, 35]. Кроме того, уменьшение объема образца более экономично при создании банков долгосрочного хранения ККЧ [17, 20, 27, 35]. Поиск оптимальных процедур сепарации ККЧ продиктован также необходимостью фундаментальных исследований в области изучения биологии ее клеток, разработки практических подходов к наращиванию ГК ККЧ в случаях применения пациентам с большим весом, а также для генной терапии [39].

Интересные результаты были получены при попытках модификации уже существующих методик фракционирования гемопоэтической ткани. Так, Charbord P., Newton I. et al. [26] доказали, что сепарация при условиях, оптимальных для КМ, для клеток ККЧ более эффективна при применении градиента перколла, чем фиколл/гипака. В последнем случае либо элиминируются акцессорно-регуляторные клеточные популяции (продуцирующие факторы роста), либо имеет место потеря функциональной активности клеток ККЧ. "Перколл-сепарация" ($\rho = 1{,}080$ г/мл), названная авторами "условиями для кордовой крови", обеспечивала более эффективнос выделение колониеобразующих клеток, чем при оптимальных условиях для КМ. При использовании перколл-сепарации как технологического процесса криоконсервирования был установлен факт отсутствия снижения количества клеток-предшественников в суспензии после замораживания-оттаивания [34].

Возможны также способы освобождения образцов от эритроцитов с помощью растворов желатина, гидроксиэтилкрахмала, но полученные результаты не всегда однозначны. Так, группа итальянских исследователей [19, 20] провела апробацию двух процедур сепарации ККЧ перед замораживанием ("фиколл/гипак"-метода, предложенного Harris D. et al. [29], и седиментации в присутствии 3%-го раствора желатина). Судя по результатам выделения как более поздних, так и самых ранних клеток-предшественников гемопоэза (КОЕ-ГМ, БОЕ-Э, КОЕ-ГЭММ, HPP-CFC), сохранность клеток колебалась в пределах 86–92% при использовании обоих методов в температурном режиме осаждения 4 °С. Как показали дальнейшие исследования размороженных фракционированных таким образом образцов, потери в них ГП при последующем замораживании материала под защитой 10%-го диметилсульфоксида (ДМСО) не наблюдались [20].

recipient's organism, that is especially actual during incompatibility of the donor-recipients pairs on the AB0 system [30, 35]. Besides, the decrease in the sample volume is more efficient during the creation of banks of prolonged HUB storage [17, 20, 27, 35]. The search for optimal procedures of HUB separation is substantiated by the necessity of fundamental researches in the field of study of its cell biolofy, development of practical approaches to the accumulation of HUB HC in the cases of application to patients with a large weight, as well as for gene therapy [39].

Interesting results were received during the attempts to modify already existing methods of hemopoietic tissue fractionation. In this way Charbord P., Newton I. et al. [26] proved that separation under conditions optimal for BM, for HUB cells is more effective during the application of Percoll gradient, than Ficoll/Hypaque. In latter case either accessory regulatory populations are eliminated (growth factor producing), or the loss of functional activity of HUB cells takes place. "Percoll-separation" ($\rho = 1{,}080$ g/ml), called by the authors as the "conditions for cord blood", provided more efficient isolation of colony-forming cells, than under optimal conditions for BM. When using Percoll-separation as a technological process of cryopreservation the fact of the absence of the reduction in the number of cells-precurors in suspension after freezing-thawing has been established [34].

The release ways of samples from erythrocytes by means of gelatin solutions, hydroxyethyl starch are also possible, but the results obtained are not always uniform. The group of Italian researchers [19, 20] conducted approbation of two procedures of HUB separation before freezing ("Ficoll/Hypaque" – proposed by Harris D. et al. [29] and sedimentation in the presence of 3% gelatin). Judging by the results of isolation of both later and the earliest cells-precursors of hemopoiesis (CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM, HPP-CFC), the integrity of cells varied within the limits of 86–92%, when using both methods in the temperature regimen of 4 °C. As demonstrated further infestigations of frozen-thawed, fractionated by this way samples, the losses of HPs in them during subsequent material freezing under the protection of 10% DMSO were not observed [20]. Moreover, "gelatin-sedimentation" in comparison with "phycoll-hypaque-procedure" took lesser time. Lee Y.H. et al. [31] consider "gelatin-sedimentation" as more effective for the isolation of mononuclear fraction of HUB. Perhaps, these data are not final when searching for the ways of optimization of the isolation methods for HUB HC. This way in [17] the results of the comparison of HUB separation feasibilities by means of various gradients of percoll density (1,069; 1,077; 1,084 g/ml), sedimentation through the poligelin layer (Emagel) and that one through poligelin in combination with the separation on the density gradient of phycoll-hypaque (1,077 g/ml). Both "poligelin-

Матеріал, захищений авторським правом

Более того, "желатин-седиментация" по сравнению с "фиколл/гипак-процедурой" занимала меньше времени. Lee Y. H. et al. [31] считают "желатин-седиментацию" более эффективной для выделения мононуклеарной фракции ККЧ. По-видимому, и эти данные не являются окончательными в поисках путей оптимизации способов выделения ГК ККЧ. Так, в [17] приведены результаты сравнения возможностей сепарации ККЧ с помощью различных градиентов плотности перколла (1,069, 1,077, 1,084 г/мл), седиментации через слой poligelin (Emagel) и седиментации через poligelin в комплексе с сепарацией на градиенте плотности фиколл/гипака (1,077 г/мл). Эффективными оказались как "poligelin-седиментация", так и двухступенчатое фракционирование. В этих случаях не наблюдались потери КОЕ-ГМ, КОЕ-ГЭММ, хотя сохранение содержания $CD34^+$-клеток было более полным при одиночной "poligelin-седиментации" (100% – одиночная, 85,3% – двухступенчатая). Несмотря на некоторую потерю $CD34^+$-клеток при двойном методе выделения, все же отдается предпочтение этому методу, так как при нем истощается большее количество эритроцитов и уменьшается конечный объем суспензии. При этом подчеркивается [19], что использованный раствор poligelin более практичен по сравнению с 3%-м раствором желатина, так как не нуждается в дополнительном приготовлении и стерилизации.

Для сепарации клеток ККЧ применяются и другие методы [27], в частности, выделение мононуклеаров с помощью гидроксиэтилкрахмала (до 98% кроветворных клеток-предшественников) [35]. При совместном использовании седиментации и центрифугирования (для концентрации лейкоцитов и удаления плазмы) большинство присутствующих в образце ГП может быть сконцентрировано в небольшом объеме – около 20 мл [35]. Предлагаются методы простого центрифугирования с использованием тройной системы стерильных мешков для разделения цельной ККЧ на три фракции ("buffy coat" –лимфоцитарный слой, эритроцитарный слой и плазма) [16]. Такой метод позволяет сконцентрировать в уменьшенном почти в два раза объеме все $CD34^+$-клетки, а также большинство (до 80%) клеток-предшественников (КОЕ-ГМ и БОЕ-Э) при соблюдении полной стерильности. Необходимо также упомянуть разработанную японскими учеными Yasutake M. et al. [42] фильтрационную систему, работа которой основана на принципе захвата ядерных клеток ККЧ, что позволяет упростить концентрацию ядерных клеток с эффективным удалением из образца эритроцитов и тромбоцитов.

Таким образом, анализ результатов приведенных исследований показывает, что сепарация ККЧ является важным этапом технологического процесса заготовки образцов для их клинической трансплантации. При этом существенное сокращение объема образца, позволяя избавиться от основной массы эритроцитов, не приводит к значительным

sedimentation" and "two-step frcationation" occurred to be effective. In these cases no loss of CFU-GM, CFU-GEMM was observed, but the preservation of CD-34#-cells content was more complete at a single "poligelin sedimentation" (100% – single, 85,3% – two step). Inspite of some loss of $CD34^+$-cells in double methcd of isolation the preference is still given to this method, because there bigger number of erythrocytes are exhausted and a final yolume of suspension reduces. Thereat it is underlined [19], that the poligelin solution used is efficient one in comparison with 3% gelatin solution, since it does not need as additional preparation and sterilization.

To separate HUB cells other methods are used [27], in particular, the isolation of mononuclears by means of hydroxyethyl starch (upto 98% of hemopoietic cells-precursors) [35]. At combined usage of sedimentation and centrifugation (for the concentration of leukocytes and plasm removal) the majority of HPs present in the sample can be concentrated in a small volume – 20 ml [35]. The methods of common centrifugation using triple system of sterile bags to separate the whole HUB into three fractions ("buffy coat" – lymphocytic layer, erythrocyte layer and plasm) are proposed [16]. Such a method permits to concentrate in a reduced about twice volume all $CD34^+$-cells-precursors (CFU-GM, BFU-E) when meeting the requirements of a complete sterility. It is necessary to note developed by Japanese researchers Yasutake M. et al. [42] the filtration system, based on the principle of HUB nuclear cells capturing with an effective removal of erythrocytes and platelets from the sample.

Thus the analysis of the results mentioned above demonstrates that HUB separation is an important stage of technological process of procurement of samples for their clinical transplantation. Thereat an essential reduction of the sample volume, allowing to get rid of main mass of erythrocytes, does not lead to significant HC losses. The solving of the task of "volumetric concentration of the sample" opens the perspective of an efficient usage of the areas for prolonged storage of HC and creation of large-scale banks of HUB [20, 27].

There are another approaches of the release of HUB samples from erythrocytes without their volume reduction. In this way Jansen K.C. et al. [30] reported about the results of the usage of the erythrocyte lysis method by ammonium chloride (NH_4Cl) solution with following cell washing-out by means of buffer solution and centrifugation, allowing to purify the sample from erythrocytes at the recovery of 80% nuclear cells and 95% $CD34^+$-cells. The reduction of posttransplantational responses to the introduction of erythrocyte lysis products in an organism is possible even after its thawing. Such a method used in the USA (The New York Blood Center) [41], foresees the dilution of frozen-thawed sample by an equal volume of dextran/albumin solution with subsequent centrifu-

Матеріал, захищений авторським правом

потерям ГК. Решение проблемы "объемной концентрации образца" открывает перспективу эффективного использования площадей для долгосрочного хранения ГК и создания крупномасштабных банков ККЧ [20, 27].

Существуют иные подходы к освобождению образцов ККЧ от эритроцитов без уменьшения их объема. Так, Jansen K. C. et al. [30] сообщили о результатах использования метода лизиса эритроцитов раствором хлорида аммония (NH_4Cl) с последующим отмыванием клеток с помощью буферного раствора и центрифугирования, позволяющего очистить образец от эритроцитов при восстановлении 80% ядерных клеток и 95% $CD34^+$-клеток. Уменьшить посттрансплантационные реакции, связанные с введением в организм продуктов лизиса эритроцитов, можно путем подготовки образца к трансплантации уже после его размораживания. Такая методика, применяемая в США (The New York Blood Center) [41], предусматривает разбавление размороженного образца равным объемом раствора декстран/альбумина с последующим центрифугированием суспензии клеток в мягком режиме, удалением супернатанта и ресуспендированием клеток в таком же растворе. При таких условиях потери клеток составляют не более 10% [41]. Кроме того, следует упомянуть экспериментальные подходы к выделению ГК ККЧ, характеризующиеся позитивной селекцией фракции $CD34^+$-клеток [27].

Проблема, связанная с обработкой ККЧ перед замораживанием, в настоящее время до конца не решена, исследователи продолжают работы в этом направлении [27]. Главной задачей их поиска является усовершенствование методик сепарации ККЧ, достижение эффекта как можно большего очищения образца от эритроцитов с одновременной минимизацией степени влияния сепарации на его качество как функционально эффективного трансплантата и решение вопросов, связанных с экономией площадей для хранения материала.

В отличие от предыдущих этапов технологического процесса криоконсервирования этап замораживания ККЧ не вызывает особых дискуссий у зарубежных исследователей. В качестве криопротектора обычно используется ДМСО в конечной концентрации 10% (об/об) [17, 18, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 34, 41]. Как известно, ограждающий эффект ДМСО при криоконсервировании обусловлен способностью быстро проникать в клетку, замедляя при этом процесс кристаллообразования, повышая способность растворов к переохлаждению, предупреждая возникновение на мембране повреждающих градиентов концентраций растворов [1, 10]. Как показал опыт замораживания ГК [10], раствор ДМСО в конечной концентрации около 10% обладает ярко выраженным криопротекторным действием. При этом в среде замораживания происходит мелкоячеистая кристаллизация, близкая по своей природе к аморфной [1]. Однако в [13] было отмечено, что рекомендуемая 10%-я концентрация ДМСО оказывает прямое цитотоксическое действие

gation of cell suspension in a soft regimen, removal of supernatant and cell resuspending in the same solution. Under these conditions cell losses make not more that 10% [41].

Besides, experimental approaches to HUB HC, characteristing by a positive selection, $CD34^+$-cells fractions [27] should be mentioned.

The problem related to HUB treatment before freezing today has not been solved yet, the researchers continue to work in this direction [27]. The main task of their search is to improve the methods of HUB separation, reaching the effect of the most purification of the sample from erythrocytes with simultaneous minimization of the degree of separation effect on its quality as functionally effective transplant and solving the tasks related to the saving of the areas for material storage.

In contrast to previous stages of technological process of cryopreservation the stage of HUB freezing doesn't cause special discussions in foreign investigators. DMSO in a final concentration of 10% is usually used as cryoprotectant [17, 18, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 34, 41]. As it is known preventive DMSO effect during cryopreservation is substantiated by the ability to penetrate rapidly into a cell, in this case the process of crystall formation is showed, and the ability of solutions to supercooling is increased, by this preventing the appearance of damaging gradients of solution concentration on membrane [1,10].

As the experiment of HC freezing demonstrated, [10] DMSO solution in a final concentration about 10% possesses vividly manifested cryoprotective effect. Thereat in freezing medium fine-cell crystallization, closed by its nature to amorphous [1], takes place. But in [13] it has been noted that recommended 10% concentration of DMSO causes a direct cytotoxic effect even at 10 min exposure, thereat at the temperature higher than 4 °C toxical effect of the smallest DMSO concentrations (about 1%) [21] is manifested. The results of many year's studies have shown that cytotoxic DMSO effect can be significantly decreased by a reduction of the temperature of biological object down to zero during the exposure with a decrease in the duration of contact with cryoprotectant [10]. In this connection after the addition to HOB cellular suspension of preserving medium, comprising 20% DMSO in the ratio of 1:1, the equilibration is recommended to be conducted at 0 °C (in ice) within 20–30 min. [21]. Besides to enchance the effect of cryoprotectant into the composition of cryopreservative the additives such as autoplasm [23], homoplasm [21], nutritive media [21], phosphate-buffer solutions [25], enzymes [21, 34] and components are introduced. For example, Newton I. et al. included DNA-ase I enzyme into the medium for HUB freezing, that improves cellular recovery when forming clots. The presense of this enzyme on the authors' opinion contributed to the keeping of hugh functional integrity of cells-precursors after freeze-thawing [34].

Матеріал, захищений авторським правом

вие даже при десятиминутной экспозиции, причем при температуре выше 4 °С проявляется токсический эффект самых малых концентраций ДМСО (около 1%) [21]. Результаты многолетних исследований показали, что цитотоксическое действие ДМСО может быть значительно уменьшено понижением температуры биологического объекта до нулевой во время экспозиции с уменьшением продолжительности контакта с криопротектором [10]. В связи с этим после добавления к суспензии ККЧ консервирующей среды, содержащей 20% ДМСО в соотношении 1:1, эквилибрацию рекомендовано проводить при 0 °С (на льду) 20–30 мин [21]. Кроме того, для усиления действия криопротектора в состав криоконсерванта вводят такие добавки, как аутоплазма [23], гомоплазма [21], питательные среды [21], фосфатно-буферные растворы [25], энзимы [21, 34] и другие компоненты. Так, например, Newton I. et al. включили в состав среды для замораживания ККЧ энзим ДНК-азу I, улучшающий клеточное восстановление при образовании сгустков. Присутствие этого энзима, по мнению авторов, способствовало поддержанию высокой функциональной полноценности клеток-предшественников после замораживания-оттаивания [34].

Контроль скорости замораживания позволяет регулировать степень дегидратации в цикле криоконсервации [1, 7]. Термодинамические процессы, протекающие в данной суспензии клеток при контролированном замораживании главным образом зависят от вида и концентрации криозащитного вещества. Следовательно, при выборе оптимальных режимов замораживания внимание должно быть сконцентрировано непосредственно на условиях консервирования. При замораживании ГК с ограждающими веществами интрацеллюлярного действия необходимо более медленное охлаждение, чем при использовании непроникающих в клетку криопротекторов [14]. Так как программы замораживания ГК ККЧ отрабатывались для криоконсервирующих сред, включающих в качестве криопротектора ДМСО, можно говорить о наличии определенных закономерностей при варьировании другими параметрами замораживания, в частности скоростью охлаждения. Общепринятой для ГК ККЧ, как и КМ, является скорость охлаждения на первом этапе в пределах от 1 °С/мин до 3 °С/мин [21, 23, 26]. С такой скоростью образцы ККЧ замораживаются от 0 °С до –80 °С, а затем погружаются в жидкий азот. Иногда используется трехэтапное замораживание, когда скорость охлаждения на первом этапе (от 0 °С до –40 °С) составляет 1 °С/мин, на втором этапе (до –120 °С) – 5 °С/мин, а затем образцы погружаются в жидкий азот [25]. Замораживание по такой программе позволяет снизить на первом этапе отрицательное влияние гипертонических растворов, а на втором – кристаллов льда, так как такая скорость способствует образованию мелкокристаллических структур [10]. Контроль режимов охлаждения на первых этапах реализуется программными замораживателями [23, 25], а также с помощью охлаждающей метаноловой ванны, по-

The control of freezing rate permits to regulate the dehydration extent in cryopreservation cycle [1, 7]. Thermodynamic process, proceeding in given cell suspension at controlled freezing, depend generally on the type and concentration of cryoprotective substance. So, when selecting optimal regimens of freezing, the attention should be concentrated directly on the cryopreservation conditions. During HC freezing with preventive substances of intracellular effect lower freezing than during the application of non-penetrating into a cell cryoprotectants [14] is necessary. Since freezing programs of HUB HC were elaborated for cryopreserving media, including DMSO as cryoprotectant, one can say about the presense of certain regularities during the variation of other freezing parameters, in particular cooling rate. Common for HUB HC, as for BM is cooling rate at the first stage within the limits from 1 °C/min to 3 °C/min [21, 23, 26]. With this rate HUB samples are frozen from 0 °C down to –80 °C, and then submerged into a liquid nitrogen. Sometimes three-step freezing are used, when cooling rate at the first stage (from 0 °C down to –40 °C) makes 1 °C/min, at the second one (down to –120 °C) – 5 °C/min, and then the samples are put into a liquid nitrogen [25].

Freezing according to such a program allows to reduce negative effect of hypertonic solutions at the first stage, at the second – ice crystals, since such a rate contributes to the formation of fine-crystalline strucures [10]. The control of cooling regimens at the first stages is realized by means of programmable freezers [23, 25], as well as by cooling methanol bath, placed into mechanical refrigerator with the temperature of –80 °C, where cooling takes place with the rate of 1–3 °C/min [21]. After 2 hrs of this cooling the temperature of samples makes –80 °C and they may be transferred directly into a liquid nitrogen. Such way of cooling is convenient when small volumes are frozen for large-scale banks, because the control of cooling rate is not necessary. Frozen HUB is stored eigther in a liquid phase of nitrogen (–196 °C), or in its vapors (–165 °C) [21, 23, 25, 28]. But the preference is given to the storage in a liquid phase, since thereat the possibility of negative effect on samples of temperature overfalls when the cover of the vessel is opened [36].

HUB samples are thawed within 60 sec. on a water bath at the temperature of 37–41 °C. It is known that such a regimen provides the best integrity for HC [11, 14]. Suspension of frozen-thawed cells is rapidly placed on an ice [21]. In some cases to exclude an additional loss of hemopoietic cells-precursors, frozen-thawed HUB is slowly introduced into an organism of the recipient without any additional effects on the removal of cryoprotectant and products of erythrocyte hemolysis [23, 28]. Therefore warming procedure should be completed by a special preparation of thawed HUB for the introduction into a recipient's organism to preserve morphofunctional properties of

Матеріал, захищений авторським правом

мещенной в механический рефрижератор (с температурой –80 °С), в котором происходит охлаждение со скоростью 1–3 °С/мин [21]. После двух часов такого охлаждения температура образцов составляет –80 °С и они могут быть перенесены прямо в жидкий азот. Такой способ охлаждения удобен при замораживании малых объемов для крупномасштабных банков, так как не требует контроля за скоростью охлаждения. Замороженная ККЧ хранится либо в жидкой фазе азота (–196 °С), либо в его парах (–165 °С)[21, 23, 25, 28]. Однако предпочтение отдается хранению в жидкой фазе, так как при этом исключается возможность отрицательного воздействия на образцы перепадов температур при открытии крышки чана [36].

Образцы ККЧ размораживаются в течение 60 с на водяной бане при температуре 37–41 °С. Известно, что такой режим обеспечивает наибольшую сохранность ГК [11, 14]. Суспензия размороженных клеток быстро помещается на лед [21]. В некоторых случаях для исключения дополнительной потери кроветворных клеток-предшественников размороженная ККЧ немедленно вводится в организм реципиента без каких-либо дополнительных действий по удалению криопротектора и продуктов гемолиза эритроцитов [23, 28]. Тем не менее процедуру отогрева желательно дополнить специальной подготовкой размороженной ККЧ к введению в организм реципиента для сохранения морфофункциональных свойств клеток [2], а также для снижения токсического эффекта ДМСО на клетку [21] и организм в целом [1]. Токсический эффект гипертонического раствора эндоцеллюлярного криопротектора после размораживания можно снизить уменьшением его концентрации в клеточной суспензии до незначительных величин [35] либо отмыванием клеток [9, 10, 21]. Охлажденная суспензия размороженных клеток постепенно разводится в два раза средой для отмывания, для чего используют смесь аутосыворотки с RPMI-1640, смесь фетальной телячьей сыворотки с RPMI-1640 [21], раствор декстран/альбумина [41], изотонический раствор [35]). При необходимости эта процедура может быть дополнена одним или двумя циклами мягкого (200–250*g*, 4–10 °С, 10 мин) центрифугирования для концентрации клеток, удаления супернатанта и ресуспендирования клеток в 2–5 мл той же среды [21, 41]. Однако в процессе удаления криопротектора дополнительно повреждаются мембраны клеток и внутриклеточных структур [1], кроме того, усложняется технологический процесс криоконсервирования. Оба эти обстоятельства определяют необходимость разрабатывать технологические процессы без удаления эндоцеллюлярного криопротектора, а также включения в состав криоконсервирующих сред биологически активных соединений: энзимов, сахаров, низкомолекулярных декстранов, цитрата и др. [1, 2, 21].

Завершающим этапом всего технологического процесса замораживания ККЧ является оценка эффективности хранения ее мононуклеарных элементов. Для подтверждения сохранности клеток ККЧ

cells [2] as well as to reduce toxic DMSO effect on a cell [21] and on the organism in a whole [1]. Toxical effect of hypertonic solution of endocellular cryoprotectant after freeze-thawing may be reduced by a decrease in its concentration in a cellular suspension down to insignificant values [35] or by cell washing-out [9, 21]. Cooled suspension of frozen-thawed cells is gradually diluted twice by the medium for washing-out, for this aim the mixture of autoserum with RPMI-1640, mixture of fetal calf serum with RPMI-1640 [21], solution of dextran/albumin [41], isotonic solution [35] are used. When it is necessary this procedure can be completed by one or two cycles of soft (200–250*g*, 4–10 °C, 10 min) centrifugation for cell concentration, supernatant removal and cell resuspending in 2–5 ml of the same medium [21, 41]. But in the process of cryoprotectant removal the membranes of cells and intracellular strucures [1] damaged in addition, besides technological process of cryopreservation gets complicated. Both these circumstances determine the necessity of developing technological processes without the removal of endocellular cryoprotectants, as well as inclusion in the composition of cryopreserving media of biologically active compounds: enzymes, sugars, low molecular dextrans, citrates etc. [1, 2, 21].

The estimation of the storage efficiency of its mononuclear elements is a final stage of all technological process of HUB freezing. To confirm HUB cells integrity the methods traditionally used with this aim for hemopoietic tissue are applied. It should be noted that at all stages of cryopreservation technological process the counting of nuclear cells in the whole, mononuclears, determination of their viability (test with trypane blue), comparative qualitative estimation of $CD34^+$-cells, as well as testing of samples by means of culturing of hemopoietic cells-precursors *in vitro* [1, 7, 21, 23, 25, 27, 34] are conducted. However because HC counting in HUB is not always easy, the majority of investigators as the criterion for the estimation of cryopreservation efficiency use the tests for counting the number either nuclear cells, or mononuclears. On their base the doses of introduced after thawing of the material per kg of recipient's mass are calculated [27].

Nowadays there is the experience of more than 500 transplantations of HUB HC from non-relative donors [27]. Thereat in low temperature banks of prolonged storage of hemopoietic tissue thousands of ready for the application HUB specimens are preserved [27]. Increasing demand for this material causes the necessity of the widening of its stocks, rising of the requirments to HUB banks, as well as the consideration of tasks related not only the storage, but also HUB transplantation in a whole.

Thus the organization of large scale banks to satisfy the requirements of the recipients of this tissue, not having compatible donors-relatives according to the HLA system, is tightly connected to the optimi-

Матеріал, захищений авторським правом

применяются методы, традиционно используемые с этой целью для гемопоэтической ткани. Необходимо отметить, что на всех этапах технологического процесса криоконсервирования проводятся подсчет ядерных клеток в целом, мононуклеаров, определение их жизнеспособности (тест с трипановым синим), сравнительная количественная оценка содержания $CD34^+$-клеток, а также тестирование образцов с помощью культивирования гемопоэтических клеток-предшественников *in vitro* [1, 17, 21, 23, 25, 27, 34]. Однако так как подсчет ГК в ККЧ не всегда прост, большинство исследователей критерием оценки эффективности криоконсервирования используют тесты подсчета количества либо ядерных клеток, либо мононуклеаров. На их основании рассчитываются дозы вводимого после оттаивания материала на килограмм массы реципиента [27].

В настоящее время имеется опыт более 500 трансплантаций ГК ККЧ от неродственных доноров [27]. При этом в низкотемпературных банках долгосрочного хранения гемопоэтической ткани сохраняются тысячи готовых к использованию экземпляров ККЧ [27]. Возрастающий спрос на этот материал вызывает необходимость расширить его запасы, повысить требования, предъявляемые к банкам ККЧ, а также комплексно рассмотреть вопросы, связанные не только с хранением, но и трансплантацией ККЧ.

Таким образом, организация крупномасштабных банков для удовлетворения потребностей реципиентов этой ткани, не имеющих совместимых по системе HLA доноров-родственников, неразрывно связана с оптимизацией всех звеньев технологического процесса ее криоконсервирования. Несмотря на десятилетний опыт создания запасов ККЧ, остается много нерешенных проблем. Наиболее важными проблемами являются: усовершенствование условий предподготовки, методов фракционирования, составов криоконсервирующих сред, способов и условий эквилибрации клеток с криоконсервирующими растворами, оптимизация скоростей замораживания, способов восстановления морфофункциональных свойств размороженных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М., Грищенко В. И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
2. *Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– 197 с.
3. *Гаврилов О. К., Козинец Г. И., Черняк Н. Б.* Клетки костного мозга и периферической крови.– М.: Медицина, 1985.– 288 с.
4. *Гольцев А. Н.* Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис... д-ра мед. наук.– Харьков, 1988.– 35 с.
5. *Гольцев А. Н., Калиниченко Т. А.* Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть I. Характеристика гемопоэтического потенциала // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 1.– С. 3–24.
6. *Гольцев А.Н., Цуцаева А.А., Дубрава Т.Г.* Сравнительное изучение криочувствительности КОЕс и КОЕк, находя-

zation of all links of technological process ot its cryopreservation. Despite ten years' experience of the creation of HUB stocks there are still a lot of unsolved problems. The most important tasks are: the improvement of prelimanary preparation conditions, fractionation methods, compositions of preserving media, ways and conditions of cell equilibration with preserving solutions, optimization of freezing rates, ways of the recovery of morphofunctional properties of frozen-thawed cells.

REFERENCES

1. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 430 p.
2. *Belous A.M., Shrago M.I., Pushkar N.S.* Cryopreservatives.– Kiev: Naukova Dumka, 1979.– 197 p.
3. *Gavrilov O.K., Kozinets G.I., Chernyak N.B.* Cells of bone marrow and peripheric blood.– Moscow: Meditsina, 1985.– 288 p.
4. *Goltsev A.N.* The effect of cryopreservation factors on immune biological properties of bone marrow hemopoietic cell: Author's abstract of MD thesis.– Kharkov, 1988.– 35 p.
5. *Goltsev A.N., Kalinichenko T.A.* Human umbilical cord blood as a source of hemopoietic cells for clinical application. Part I. Characteristics of hemopoietic potential // Problemy kriobiologii.– 1998.– № 1.– P. 3–24.
6. *Goltsev A.N., Tsutsayeva A.A., Dubrava T.G.* A comparative study of cryosensitivity of CFUs and CFUc, being in different state // Criobiologiya.– 1987.– № 1.– P. 11–17.
7. *Gordiyenko E.A., Osetsky A.I., Rozanov L.F.* Scientific substantiation of the ways of low temperature preservation of cellular suspensions // Problemy kriobiologii.– 1997.– № 1–2.– P. 67–71.
8. *Dubrava T.G.* The efficiency of cryopreservation of hemopoietic cells depending on an initial properties: Author's abstract of PhD (biology) thesis.– Kharkov, 1986.– 14 p.
9. *Cryopreservation* of cellular suspensions / A.A. Tsutsayeva, V.A. Agranenko, L.I. Fedorova et al.; Ed. by A.A. Tsutsayeva.– Kiev: Naukova Dumka, 1983.– 240 p.
10. *Mikhailov V.G.* Bone marrow preservation.– Moscow: Meditsina, 1979.– 144 p.
11. *Low* temperature preservation of bone marrow/ N.S. Pushkar, A.M. Belous, A.A. Tsutsayeva et al.– Kiev: Naukova Dumka, 1976.– 288 p.
12. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* Cryopreservatives.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 203 p.
13. *Terentyeva E.I., Kisilev A.E., Fedotenkov A.G.* Electronic microscopic study of bone marrow cells in the process of freezing // Problemy gematologii.– 1968.– № 2.– P. 12–16.
14. *Fedotenkov A.G.* Hemopoietic tissue cryopreservation.– Moscow: CR&DIH and PB of the Ministry of Health Care of the USSR, 1980.– 15 p.
15. *Yurasov S.V., Vladimirskaya E.B., Mur S.* The analysis of distribution of hemopoietic stem cells in mononuclear fraction of human umbilical cord blood // Gematologiya i transfusiologiya.– 1996.– 41, № 2.– P. 13–16.
16. *Ademokun A. J., Chapman C., Dunn J. et al.* Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking // Blood.– 1996.– 88, № 11 (suppl. 1). P. 409a.
17. *Almici C., Carlo-Stella C., Wagner J. E., Rezzoli V.* Density separation and cryopreservation of umbilicai cord blood cells: evaluation of recovery in short- and long-term cultures // Acta Haematologica.– 1996.– 95, № 3–4.– P. 171–175.
18. *Beguin Y., Cornu G., Brichard B. et al.* Belgian cord blood benking project: hematological results and practical issues // Blood.– 1995.– 86, № 10 (suppl. 1).– P. 116a.
19. *Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al.* A comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood // J. Hematother.– 1995.– 4.– P. 29–36.

Матеріал, захищений авторським правом

щихся в различном состоянии // Криобиология.– 1987.– № 1.– С. 11–17.
7. *Гордиенко Е.А., Осецкий А.И., Розанов Л.Ф.* Научное обоснование способов низкотемпературного консервирования клеточных суспензий // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 1–2.– С. 67–71.
8. *Дубрава Т.Г.* Эффективность криоконсервирования кроветворных клеток в зависимости от исходных свойств: Автореф. дис....канд. биол. наук.– Харьков, 1986.– 14 с.
9. *Криоконсервирование* клеточных суспензий / А.А.Цуцаева, В.А.Аграненко, Л.И.Федорова и др.; Под общ. ред. А.А.Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
10. *Михайлов В. Г.* Консервация костного мозга.– М.: Медицина, 1979.– 144 с.
11. *Низкотемпературное* консервирование костного мозга / Н.С.Пушкарь, А.М.Белоус, А.А.Цуцаева и др.– Киев: Наук. думка, 1976.– 288 с.
12. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 203 с.
13. *Терентьева Э. И., Киселев А. Е., Федотенков А. Г.* Электронно-микроскопическое изучение клеток костного мозга в процессе замораживания // Пробл. гематологии.– 1968.– № 2.– С. 12–16.
14. *Федотенков А. Г.* Криоконсервирование кроветворной ткани.– М.: ЦНИИГиПК МЗ СССР, 1980.– 15 с.
15. *Юрасов С В., Владимирская Е.Б., Мур С.* Анализ распределения гемопоэтических стволовых клеток в мононуклеарной фракции пуповинной крови человека // Гематология и трансфузиология.– 1996.– 41, № 2.– С. 13–16.
16. *Ademokun A. J., Chapman C., Dunn J. et al.* Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking // Blood.– 1996.– 88, № 11 (suppl. 1). P. 409a.
17. *Almici C., Carlo-Stella C., Wagner J. E., Rezzoli V.* Density separation and cryopreservation of umbilicai cord blood cells: evaluation of recovery in short- and long-term cultures // Acta Haematologica.– 1996.– 95, № 3–4.– P. 171–175.
18. *Beguin Y., Cornu G., Brichard B. et al.* Belgian cord blood benking project: hematological results and practical issues // Blood.– 1995.– 86, № 10 (suppl. 1).– P. 116a.
19. *Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al.* A comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood // J. Hematother.– 1995.– 4.– P. 29–36.
20. *Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al.* Collection, separation, cryopreservation, and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood for transplantation // Blood.– 1994.– 84, № 10 (suppl. 1).– P. 100a.
21. *Boyse E. A., Broxmeyer H. E., Doyglas G. W.* Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood // US Patent 5, 004, 681. April 2, 1991.
22. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential sourse of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.–1989.– 86.– P. 3828–3832.
23. *Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S. et al.* Growth characteristics and expansion of umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1992.– 89.– P. 4109–4113.
24. *Cairo M. S., Wagner J. E.* Placental and/ or umbilical cord blood: an alternative sourse of hematopoietic stem cells for transplantation // Blood.– 1997.– 90, № 12.– P. 4665–4678.
25. *Campos L., Roubi N., Guyotat D.* Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– 32, № 6.– P. 511–515.
26. *Charbord P., Newton I., Schaal J. P., Herve P.* The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells // Fetal Liver Transplantation.– 1992.– Suppl.– P. 109–110.
27. *Gluckman E.* Sources of haemopoietic stem cells for allogeneic transplantation // Blood and Marrow Transplantation (The EBMT Handbook). Editors: J. Apperley, E. Gluckman, A. Gratwohl, Associate Editor: C. Graddock. ESH. EBMT.– 1998.– P. 88–96.
20. *Bertolini F., Lazzari L., Lauri E. et al.* Collection, separation, cryopreservation, and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood for transplantation // Blood.– 1994.– 84, № 10 (suppl. 1).– P. 100a.
21. *Boyse E. A., Broxmeyer H. E., Doyglas G. W.* Preservation of fetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood // US Patent 5, 004, 681. April 2, 1991.
22. *Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoc G. et al.* Human umbilical cord blood as a potential sourse of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.–1989.– 86.– P. 3828–3832.
23. *Broxmeyer H. E., Hangoc G., Cooper S. et al.* Growth characteristics and expansion of umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults // Proc Natl. Acad. Sci. USA.– 1992.– 89.– P. 4109–4113.
24. *Cairo M. S., Wagner J. E.* Placental and/ or umbilical cord blood: an alternative sourse of hematopoietic stem cells for transplantation // Blood.– 1997.– 90, № 12.– P. 4665–4678.
25. *Campos L., Roubi N., Guyotat D.* Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells // Cryobiology.– 1995.– 32, № 6.– P. 511–515.
26. *Charbord P., Newton I., Schaal J. P., Herve P.* The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells // Fetal Liver Transplantation.– 1992.– Suppl.– P. 109–110.
27. *Gluckman E.* Sources of haemopoietic stem cells for allogeneic transplantation // Blood and Marrow Transplantation (The EBMT Handbook). Editors: J. Apperley, E. Gluckman, A. Gratwohl, Associate Editor: C. Graddock. ESH. EBMT.– 1998.– P. 88–96.
28. *Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al.* Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // Fetal Liver Transplantation.– 1992.– Suppl.– P. 114–117.
29. *Harris D. T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al.* Collection, separation, and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplant.– 1994.– 13.–P. 135–143.
30. *Jansen K. C., Hashmi R., Hashmi N. et al.* Red blood cells reduction of cord blood cells using ammonium chloride lysis procedure // Blood.– 1995.– 86, № 10 (suppl. 1).– P. 356a.
31. *Lee Y. H., Park J. S., Choi A. H. et al.* Cord blood processing by gelatin sedimentation provides better yields of prodenitor cells than by conventional or modified Ficoll-Hypaque metod // Blood.– 1997.– 90, № 10 (suppl. 1).– P. 213a.
32. *Lu L., Li Z.-H., Broxmeyer H. E.* Recovery and characterization of $CD34^+$ cord blood cells after cryopreservation // In Vivo.– 1996.– 10, № 2.– P. 229–232.
33. *Mugishima H., Ferasaki P., Susochi A.* Bone marrow from cadaver donors for transplantation // Blood.– 1985.– 65, № 2.– P. 392–396.
34. *Newton I., Charbord P., Schaal J. P., Herve P.* Cord blood banking: density separation and cryopreservation of cord blood progenitors // Exp. Hematol.– 1993.– 21, № 5.– P. 671–674.
35. *Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R. E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/ umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– 92, № 22.– P. 10119–10122.
36. *Rubinstein P., Rosenfield R. E., Adamson J. W., Stevens C. E.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– 81, № 7.– P. 1679–1690.
37. *Takahashi M., Singer J.W.* Effects of marrow storage at 40 °C on the subsequent generation of long-term marrow cultures // Exp. Hematol.– 1985.– 13, № 7.– P. 691–695.
38. *Thierry D., Hervatin F., Traineau R. et al.* Hematopoietic progenitors cells in cord blood // Fetal Liver Transplantation.– Suppl.– 1992.– P. 101–104.
39. *Vormoor J., Lapidot T., Pflumio F. et al.* Immature human cord blood progenitor engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice // Blood.– 1994.– 83, № 9.– P. 2489–2497.

Матеріал, захищений авторським правом

28. *Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al.* Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // Fetal Liver Transplantation.– 1992.– Suppl.– P. 114–117.
29. *Harris D. T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al.* Collection, separation, and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplant.– 1994.– 13.–P. 135–143.
30. *Jansen K. C., Hashmi R., Hashmi N. et al.* Red blood cells reduction of cord blood cells using ammonium chloride lysis procedure // Blood.– 1995.– 86, № 10 (suppl. 1).– P. 356a.
31. *Lee Y. H., Park J. S., Choi A. H. et al.* Cord blood processing by gelatin sedimentation provides better yields of prodenitor cells than by conventional or modified Ficoll-Hypaque metod // Blood.– 1997.– 90, № 10 (suppl. 1).– P. 213a.
32. *Lu L., Li Z.-H., Broxmeyer H. E.* Recovery and characterization of $CD34^+$ cord blood cells after cryopreservation // In Vivo.– 1996.– 10, № 2.– P. 229–232.
33. *Mugishima H., Ferasaki P., Susochi A.* Bone marrow from cadaver donors for transplantation // Blood.– 1985.– 65, № 2.– P. 392–396.
34. *Newton I., Charbord P., Schaal J. P., Herve P.* Cord blood banking: density separation and cryopreservation of cord blood progenitors // Exp. Hematol.– 1993.– 21, № 5.– P. 671–674.
35. *Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R. E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/ umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– 92, № 22.– P. 10119–10122.
36. *Rubinstein P., Rosenfield R. E., Adamson J. W., Stevens C. E.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– 81, № 7.– P. 1679–1690.
37. *Takahashi M., Singer J.W.* Effects of marrow storage at 40 °C on the subsequent generation of long-term marrow cultures // Exp. Hematol.– 1985.– 13, № 7.– P. 691–695.
38. *Thierry D., Hervatin F., Traineau R. et al.* Hematopoietic progenitors cells in cord blood // Fetal Liver Transplantation.– Suppl.– 1992.– P. 101–104.
39. *Vormoor J., Lapidot T., Pflumio F. et al.* Immature human cord blood progenitor engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice // Blood.– 1994.– 83, № 9.– P. 2489–2497.
40. *Wagner J. E., Kernan N. A., Steinbuch M. et al.* Allogeneic sibling umbilical–cord–blood transplantation in forty– four children with malignant and non-malignant disease // Lancet.– 1995.– 346.– P. 214–219.
41. *Wagner J. E., Rosenthal J., Sweetman R. et al.* Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of ingraftment and acute graft-versus-host-disease // Blood.– 1996.– 88, № 3.– P. 795–802.
42. *Yasutake M., Maruyama M., Serizawa R. et al.* A new method for hematopoietic progenitor cell preparation: cord blood stem cell collection filter // Blood.– 1997.– 90, № 10 (suppl. 1).– P. 339b.

Accepted on 14.12.98

28. *Gluckman E., Devergie A., Thierry D. et al.* Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking // Fetal Liver Transplantation.– 1992.– Suppl.– P. 114–117.
29. *Harris D. T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al.* Collection, separation, and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplant.– 1994.– 13.–P. 135–143.
30. *Jansen K. C., Hashmi R., Hashmi N. et al.* Red blood cells reduction of cord blood cells using ammonium chloride lysis procedure // Blood.– 1995.– 86, № 10 (suppl. 1).– P. 356a.
31. *Lee Y. H., Park J. S., Choi A. H. et al.* Cord blood processing by gelatin sedimentation provides better yields of prodenitor cells than by conventional or modified Ficoll-Hypaque metod // Blood.– 1997.– 90, № 10 (suppl. 1).– P. 213a.
32. *Lu L., Li Z.-H., Broxmeyer H. E.* Recovery and characterization of $CD34^+$ cord blood cells after cryopreservation // In Vivo.– 1996.– 10, № 2.– P. 229–232.
33. *Mugishima H., Ferasaki P., Susochi A.* Bone marrow from cadaver donors for transplantation // Blood.– 1985.– 65, № 2.– P. 392–396.
34. *Newton I., Charbord P., Schaal J. P., Herve P.* Cord blood banking: density separation and cryopreservation of cord blood progenitors // Exp. Hematol.– 1993.– 21, № 5.– P. 671–674.
35. *Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R. E. et al.* Processing and cryopreservation of placental/ umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1995.– 92, № 22.– P. 10119–10122.
36. *Rubinstein P., Rosenfield R. E., Adamson J. W., Stevens C. E.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution // Blood.– 1993.– 81, № 7.– P. 1679–1690.
37. *Takahashi M., Singer J.W.* Effects of marrow storage at 40 °C on the subsequent generation of long-term marrow cultures // Exp. Hematol.– 1985.– 13, № 7.– P. 691–695.
38. *Thierry D., Hervatin F., Traineau R. et al.* Hematopoietic progenitors cells in cord blood // Fetal Liver Transplantation.– Suppl.– 1992.– P. 101–104.
39. *Vormoor J., Lapidot T., Pflumio F. et al.* Immature human cord blood progenitor engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice // Blood.– 1994.– 83, № 9.– P. 2489–2497.
40. *Wagner J. E., Kernan N. A., Steinbuch M. et al.* Allogeneic sibling umbilical–cord–blood transplantation in forty– four children with malignant and non-malignant disease // Lancet.– 1995.– 346.– P. 214–219.
41. *Wagner J. E., Rosenthal J., Sweetman R. et al.* Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of ingraftment and acute graft-versus-host-disease // Blood.– 1996.– 88, № 3.– P. 795–802.
42. *Yasutake M., Maruyama M., Serizawa R. et al.* A new method for hematopoietic progenitor cell preparation: cord blood stem cell collection filter // Blood.– 1997.– 90, № 10 (suppl. 1).– P. 339b.

Поступила 14.12.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 581.1.083: 57.043 UDC 581.1.083: 57.043

Оптимизация метода криоконсервирования меристемы картофеля

Т. Ф. СТРИБУЛЬ, С. Т. ОЛЕЙНИК, А. Н. НОВИКОВ, А. И. ГРИГОРАЩЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Optimization of the method of potato meristem cryopreservation

T. F. STRIBUL, S. T. OLEJNIK, A. N. NOVIKOV, A. I. GRIGORASCHENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Проведен анализ опыта криоконсервирования меристемальной ткани высших растений. Выполнена работа по усовершенствованию методики подготовки и проведения замораживания меристем картофеля до –40 и –196 °С. Оценена жизнеспособность криоконсервируемого материала после двух-трехнедельного культивирования. Средний процент выживаемости деконсервированных меристем картофеля составил 30%.

Проведено аналіз досліду кріоконсервування меристемальної тканини вищих рослин. Виконана робота щодо вдосконалення методики підготовки і проведення заморожування меристем картоплі до –40 і –196 °С. Оцінена життєздатність матеріалу, який кріоконсервується, після двох-трьохтижневого культивування. Середній відсоток виживаності деконсервованих меристем картоплі становив 30%.

The analysis of the experience of cryopreservation of meristem tissue of higher plants was performed. The work on improvement of the method of preparation and conducting of potato meristem freezing down to –40 and –196 °C was accomplished. The viability of cryopreserved material after two-three weeks' culturing was estimated. An average percentage of survival of frozen-thawed potato meristem made 30%.

Перспективность разработки технологий криоконсервирования меристемной ткани обусловлена как возможностью сохранения генофонда вегетативно размножающихся растений, так и использованием меристем для размножения растений, свободных от патогенов и с большим коэффициентом воспроизводимости [3].

Анализ литературных и патентных источников позволяет выделить следующую специфику криоконсервирования меристем:

1. Этап подготовки меристем к криоконсервированию, включающий:

предварительное культивирование выделенных меристем в течение 1–7 сут [4, 5];

закаливание меристем при пониженной температуре в течение нескольких суток [11];

экспозицию в растворе криопротекторов, иногда с пониженной концентрацией, 1- 2 сут [9].

2. Необходимость длительного времени (12–48 ч) экспозиции меристем в растворе криопротектора, перспективность помещения меристем в растворы с постепенно возрастающей концентрацией криопротектора.

3. Применение в качестве криопротектора чаще всего диметилсульфоксида (ДМСО) [9], иногда в композиции с сахарозой [6].

4. Использование медленного режима замораживания как более перспективного [9, 12] со ско-

The perspectiveness of the development of cryopreservation technology of meristem tissue is substantiated both by the possibility of preservation of gene fond of negatively reproducting plants and also the application of meristems for reproducting the plants free of pathogens and with a large coefficient of reproduction [3]. The analysis of literature and patent sources on cryopreservation of meristems allows to determine the following specificity:

1. Stage of meristem preparation to cryopreservation, including:

— preliminary culturing of isolated meristems during 1–7 days [4, 5];
— meristem hardening at lowered temperature within several days [12];
— exposition in cryoprotectant solution, sometimes with lower concentration during 1–2 days [9].

2. The necessity of prolonged time (12-48hrs) of meristem exposition in the cryoprotectant solution, perspectiveness of meristem removal into the solutions with gradually increasing cryoprotectant concentration.

3. In the majority of cases the application of dimethyl sulphoxide (DMSO) as a cryoprotectant, sometimes in the combination with succrose [6].

4. The usage of slow freezing regimen as more perspective [9, 11, 13] with cooling rates about

Матеріал, захищений авторським правом

ростями охлаждения примерно 1 °С/мин и менее до –40 °С (приемлем и быстрый) [6]. При медленных режимах замораживания необходимо снять переохлаждение [10, 12, 13].

С учетом вышеизложенного проведены исследования по оптимизации метода криоконсервирования меристемы картофеля.

Учитывая необходимость снижения осмотических нагрузок, трудоемкость манипуляций переноса меристем в различные растворы, внесения и извлечения их из контейнеров, предложен следующий процесс ввода и вывода из меристем криозащитной среды: меристемы укладывают на смоченную питательной средой подложку из фильтровальной бумаги, которую переносят на пористую стеклянную пластину, погруженную примерно до половины высоты в раствор криозащитной среды, находящейся в бюксе. При этом достигается медленное насыщение меристем криопротектором за счет его диффузии через пористую стеклянную пластину и подложку фильтровальной бумаги. Такой метод ввода криопротектора позволяет устранить трудоемкие операции ступенчатой экспозиции меристем в растворах с возрастающей его концентрацией.

Отмывку деконсервированных меристем от защитной среды выполняли по следующей методике: извлеченную из контейнера подложку с меристемами переносили на пористую пластину, погруженную на половину высоты в питательную среду, находящуюся в бюксе. Среда периодически об.новлялась.

Модель замораживателя для низких скоростей охлаждения разработана и изготовлена на основе широкогорлого сосуда Дьюара. В верхней части сосуда над уровнем азота расположен медный цилиндр с гнездами для полиэтиленовых контейнеров. По внешней стороне цилиндра смонтирован автоматический электронагреватель. Возможность реализации скоростей охлаждения замораживателя находится в пределах диапазона 0,05–2 °С/мин. В процессе охлаждения допустимо изменение скорости охлаждения и стабилизации температуры в любой температурной зоне.

Криобиологическим системам при охлаждении присущи различные величины переохлаждения. Это приводит к вариациям условий льдообразования и, следовательно, затрудняет реализацию заданного режима охлаждения биообъекта.

Наиболее перспективными методами уменьшения переохлаждения являются инициирование льдообразования препаратом AgI с повышенной льдообразующей активностью, а также инициирование с теплоотводящими металлическими стержнями, впаянными в дно контейнера [2]. Распределение контейнеров в замораживателе позволяет свободным концам теплопроводящих стержней находиться в зоне более низких температур (порядка –40 ÷ –80 °С). Эти методы обеспечивают инициирование льдообразования в среде контейнера автоматически при температуре, близкой к температуре плавления среды. Сравнительная оценка этих методов по эффективности

1 °C/min and less down to –40 °C (available and rapid) [6]. Under slow freezing regimens it is necessary to take away supercooling [10, 13, 14].

Taking into consideration mentioned above the investigations on the optimization of the method of potato meristem cryopreservation were conducted.

Taking into account the reduction of osmotic loadings, labor-intensiveness of manipulations for meristem removal into various solutions, their administration and removal from the containers the following process of introduction and removal of cryoprotective medium from meristems is proposed: meristems are placed on moistened by nutritive medium undercover from filter paper, which is transferred onto porous glass plate, submerged approximately upto the half of its hight in the solution of cryoprotective medium, being in weighing bottle. Thereat slow saturation of meristems by cryoprotectant due to its diffusion through porous glass plate and enbedding of filter paper is achieved. Such a mthod of cryoprotectant introduction permits to avoid labur-intensive operations of stage exposition of meristems in the solutions with increasing its concentration. Washing-out of frozen-thawed meristems from protective medium was accomplished by following methods: removed from the container undercover with meristems was put on porous plate, submerged upto the half of its height into nutritive medium, being in weighing bottle. The medium was periodically renewed.

The freezer model for low cooling rates was developed and produced on the base of wide-neck Dewar vessel. In upper part of the vessel above the nitrogen level there is a copper cylinder with holes for polyethylene containers. On outer side of cylinder an automatic electroheater was assembled. The possibility of realization of freezer's rates is within the range of 0,05–3 °C/min. In cooling process the change of cooling rate and temperature stabilization in any temperature zone. Cryobiological systems have different cooling values during cooling. This leads to the variation of ice-formation conditions and as a result makes the realization of given regimen of bioobject cooling difficult.

The most perspective methods of the reduction of supercooling is the initiation of ice-formation by AgI preparation with an increased ice-forming activity as well as initiation with heat-abstracting metal rods, soldered into the container bottom [2]. Distribution of containers in a freezer allows the ends of heat-conducting rods to be in the zone of lower temperatures about –40 ÷ –80 °C. These methods provide the initiation of ice-formation in the container's medium automatically at the temperature close to medium melting one. Comparative estimation of these methods on the efficiency of supercooling reduction in 0.2 ml of the medium of Murashige and Skoog, containing 5% DMSO, is presented below. Without the initiation of ice-formation (control) supecooling makes 5.0–7.5,

Матеріал, захищений авторським правом

уменьшения переохлаждения в 0,2 мл среды Murashige и Skoog, содержащей 5%-й ДМСО, приведена ниже. Без инициирования льдообразования (контроль) переохлаждение составляет 5,0–7,5, при использовании йодного серебра – 1,0–1,5, теплоотводящего алюминиевого стержня – 0,05 °С.

Следовательно, для большего снятия переохлаждения в исследуемой среде более приемлем метод с использованием теплоотводящего алюминиевого стержня.

Для оценки возможности успешного криоконсервирования по медленным программам охлаждения эксперименты проводились на меристеме картофеля сорта Синеглазка, полученной методом клонального размножения. Меристемы выделяли в стерильных условиях, по 5–10 шт помещали на подложку из фильтровальной бумаги, соответствующей по размерам используемому контейнеру, переносили на пористую стеклянную пластинку, находящуюся в бюксе с питательной средой Murashige и Skoog. Через 24 ч культивирования при температуре 22–24 °С и освещенности 2 000 лк меристемы с признаками повреждения отбраковывали, подложку фильтровальной бумаги с меристемами переносили на другую пористую стеклянную пластинку, находящуюся в бюксе с 5%-м ДМСО на той же питательной среде. Время экспозиции в защитной среде 24 ч при той же температуре и освещенности.

После экспозиции меристемы на подложке переносили в полиэтиленовые контейнеры, используемые при медленных режимах охлаждения. Для надежности жидкостного контакта подложки и алюминиевого теплопроводящего стержня в контейнер предварительно заливали 0,5 мл защитной среды.

Замораживание меристем картофеля по медленным программам охлаждения проведено в 3-х сериях экспериментов. Средняя скорость охлаждения от 1 до –40 °С составляла: в первой серии 0,50, во второй – 0,35, в третьей – 0,40 °С/мин. Меристемы охлаждали до –40 °С по многоэтапным программам, приближающимся к экспоненциальным зависимостям [1]. Затем контейнеры или размораживали, или погружали в жидкий азот и хранили в нем около суток, отогревали на водяной бане с температурой 26 °С в течение 2 мин.

Деконсервированные меристемы на подложке переносили для отмывки от защитной среды на пористую стеклянную пластинку, погруженную в раствор Murashige и Skoog. В первых двух сериях опытов отмывка была однократной в течение 3 ч, в последней – трехкратной (19 ч).

Отмытые меристемы культивировались по принятой методике. Жизнеспособность меристем оценивали визуально по сохранению или восстановлению зеленого цвета и по их росту. Данные о жизнеспособности меристем после двух-трехнедельного культивирования приведены в таблице.

when using iod silver – 1,0–1,5, heat-abstracting aluminium rod – 0,05 °C. So to more efficient supercooling elimination in the medium under study the method with the application of aluminum heat-abstracting rod is the most acceptable.

To evaluate the possibility of successful cryopreservation by slow cooling programs the experiments were conducted in potato meristem of *Hybrid of Solanum demissum* grade, obtained by the method of clonal reproduction. Meristems were isolated under sterile conditions by 5–10 pieces were put on the undercover from filter paper, corresponding on the size to the container used, then transferred on porous glass plate, being in the wieghing bottle with nutritive medium of Murashige and Skoog. In 24 hrs of culturing at the temperature of 22–24 °C and the illumination degree of 2 000 lux the meristems with the signs of damaged were removed, the undercover of filter paper with meristems was transferred on another porous glass plate, being in the weighing bottle with 10% DMSO of the same nutritive medium. Exposition time in protective medium was 24 hrs at the same tempearture and illumination degree. After exposition meristems on undercover were placed into polyethylene containers, used at slow cooling regimens. For reliable liquid contact of undercover and aluminium heat-conducting rod 0.5 ml of protective medium was preliminarily poured into the container. Potato meristem freezing according to slow cooling programs was carried out in three series of experiments. An average cooling rate from 1 down to –40 °C made 0,50 in the first series; in the second – 0.35; in the third – 0.40 °C/min. The meristems were cooled down to –40 °C by multistage programs, approaching to exponential dependences [1]. Then the containers were either thawed, or submerged into a liquid nitrogen and stored there within 24 hrs, thawing was done in a water bath with the temperature of 36 °C during 2 min. Frozen-thawed meristems on undercover were transferred for washing-out from protective medium on porous plate, submerged into Murashighe and Skkog solution. In the first two series of experiments the washing-out was single during 3 hrs, and in the last – thrice-repeated during 19 hrs. Washed-out meristems were cultured according to common methods. Viability of meristems was visually estimated on the preservation or recovery of green color and on their growth. The data on meristem viability after two-three weeks' culturing are presented in the table. In the development of frozen-thawed meristems in comparison with the control the delay for 1–2 weeks was observed [7, 8]. The results of experiments testify to the fact that used by us apparatuses and technology of cryopreservation permit to obtain good results on viability of frozen-thawed meristems (at the level of ones described in the literature). The differences of results of experimental 1–2 series can hardly be explained by only the variation of cryopreservation regi-

Матеріал, захищений авторським правом

Жизнеспособность деконсервированных меристем при культивировании
Viability of frozen-thawed meristems during culturing

Серия опытов Experimental series	Конечная температура охлаждения, °С Final cooling temperature, °С	Жизнеспособность деконсервированных меристем, % Viability of frozen-thawed meristems,%
1	−40	18
	−196	8
2	−40	31
	−196	26
3	−196	67

В развитии деконсервированных меристем по сравнению с контролем наблюдалось запаздывание в 1–2 недели [7, 8]. Результаты опытов свидетельствуют, что использованные нами аппараты и технология криоконсервирования позволяют получить хорошие результаты жизнеспособности деконсервированных меристем (на уровне описанных в литературе).

Различие результатов 1–3 серий опытов вряд ли можно объяснить только вариацией режимных параметров криоконсервирования. По-видимому, проявляется и качество исходного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Новиков А. Н., Ткаченко С. И., Стрибуль Т. Ф. и др.* О возможности использования экспоненциальных режимов охлаждения при криоконсервировании биологических объектов // Биофизика.– 1985.– XXX, Вып. 6.– С. 1042–1045.
2. *Олейник С. Т.* Инициирование фазового перехода вода–лед в биологических системах при низкотемпературном консервировании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1987.– 19 с.
3. *Попов А. С.* Криогенное хранение культур клеток растений // Культура клеток растений.– М.: Наука, 1981.– С. 150–162.
4. *Anderson J.* Cryopreservation of apical meristems and cells of carnation // Cryobiology.– 1979.– 16.– P. 583.
5. *Bajaj Y.* Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at –196 °C // Crop Improv.– 1977.– 4.– P. 48.
6. *Bajaj Y.* Technology and prospects of cryopreservation of germoplasms // Euphytica.– 1981.– 30.– P. 141.
7. *Grout B., Henshow G.* Structural observations on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen // Am. Bot.– 1980.– 46.– P. 243.
8. *Haskins R., Kartha K.* Freeze-preservation of pea meristems: cell survival // Can J. Bot.– 1980.– 58.– P. 833.
9. *Kartha K., Leung N., Gamborg O.* Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration // Plant Sci. Let.– 1979.– 15.– P. 7.
10. *Kartha K., Leung N., Pahl K.* Cryopreservation of strawberry merostems and mass propagation of plant cells // J. Amer. Soc. Hortic. Sci.– 1990.– 105.– P. 481.
11. *Sebert M., Wtherbee P.* Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment // Plant Physiol.– 1977.– 59.– P. 1043.
12. *Torwill L.* Solanum etuberosum: a model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing Solanum species // Plant Sci. Let.– 1981.– 20.– P. 315.
13. *Uemura M., Sakai A.* Survival of carnation (Dianthus caryophylus L.) shoot apices frozen to temperature of liquid nitrogen // Plant Cell Physiol.– 1980.– 21.– P. 85.

Поступила 25.06.98

men parameters. Probably in this case the quality of initial material reveals.

REFERENCES

1. *Novikov A.N., Tkachenko S.I., Stribul T.F. et al.* On the possibility of application of exponential cooling regimens during cryopreservation of biological objects // Biofizika.– 1985.– XXX, issue 6.– P. 1042–1045.
2. *Olejnik S.T.* Initiating of "water–ice" phase transition in biological systems at low temperature preservation: Author's abstract of thesis for the PhD (biology) obtaining.– Kharkov, 1987.– 19 p.
3. *Popov A.S.* Cryogenic storage of plant cell cultures // Plant Cell Cultures.– M.: Nauka, 1981.– P. 150–162.
4. *Anderson J.* Cryopreservation of apical meristems and cells of carnation // Cryobiology.– 1979.– 16.– P. 583.
5. *Bajaj Y.* Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at –196 °C // Crop Improv.– 1977.– 4.– P. 48.
6. *Bajaj Y.* Technology and prospects of cryopreservation of germoplasms // Euphytica.– 1981.– 30.– P. 141.
7. *Grout B., Henshow G.* Structural observations on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen // Am. Bot.– 1980.– 46.– P. 243.
8. *Haskins R., Kartha K.* Freeze-preservation of pea meristems: cell survival // Can J. Bot.– 1980.– 58.– P. 833.
9. *Kartha K., Leung N., Gamborg O.* Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration // Plant Sci. Let.– 1979.– 15.– P. 7.
10. *Kartha K., Leung N., Pahl K.* Cryopreservation of strawberry merostems and mass propagation of plant cells // J. Amer. Soc. Hortic. Sci.– 1990.– 105.– P. 481.
11. *Sebert M., Wtherbee P.* Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment // Plant Physiol.– 1977.– 59.– P. 1043.
12. *Torwill L.* Solanum etuberosum: a model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing Solanum species // Plant Sci. Let.– 1981.– 20.– P. 315.
13. *Uemura M., Sakai A.* Survival of carnation (Dianthus caryophylus L.) shoot apices frozen to temperature of liquid nitrogen // Plant Cell Physiol.– 1980.– 21.– P. 85.

Accepted in 25.06.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.168.1-06-002.3+616.94-08: 612.43/47+612.017 UDC 616-089.168.1-06-002.3+616.94-08: 612.43/47+612.017

Применение криоконсервированных клеток тимуса у больных сепсисом

С. Д. ШАПОВАЛ

Запорожский институт усовершенствования врачей

Thymus cryopreserved cell application in septic patients

S. D. SHAPOVAL

Institute of Doctor's Advanced Training, Zaporozhie

Изучена динамика основных показателей нейроэндокринной системы при сепсисе у 28 больных с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей. Отмечено достоверно увеличение кортизола, инсулина, тиреотропного гормона гипофиза, трийодтиронина и тироксина как до, так и после оперативного вмешательства. Для коррекции нарушений рекомендуется использовать криоконсервированные клетки тимуса, подключение которых было эффективным в 85,7% наблюдений.

Вивчена динаміка основних показників нейроендокринної системи при сепсисі у 28 хворих з гнійно-запальними процесами м'яких тканин. Відмічено достовірне збільшення кортизолу, інсуліну, тиреотропного гормону гіпофіза, трийодтироніну і тироксину як до, так і після оперативного втручання. Для корекції порушень рекомендується використовувати кріоконсервовані клітини тимуса, підключення яких було ефективним у 85,7% спостережень.

The dynamics of main indices of neuro-endocrinic system in 28 septic patients with pyo-inflammatory processes of soft tissues has been studied. Statistical and significant increase of cortisone, insulin, thyreotropic hypophysis hormone, triiodthyronine and thyroxin both before and after surgical intervention. For the impairment correction is recommended to use cryopreserved thymus cells, the involvity of those was effective in 85,7% of cases.

Частота септических осложнений имеет тенденцию к росту [3, 5], а показатель летальности остается крайне высоким [4, 7].

Использование криоконсервированных биосорбентов является перспективным направлением для устранения эндотоксикоза при сепсисе и направленной коррекции нарушений нейроэндокринной, антиоксидантной систем и иммунного статуса организма [1, 2].

Цель исследования — изучение основных показателей нейроэндокринной системы у септических больных с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей до и после хирургического лечения и коррекция выявленных нарушений с помощью экстракорпорального подключения колонки с криоконсервированными гепатоцитами и препаратами тимуса на 3–5-е сутки после операции.

В работе использованы клетки печени и тимуса новорожденных поросят, полученные и криоконсервированные в Украинском центре биологической медицины (г. Харьков) под руководством докт. биол. наук Н. П. Субботы [6].

Обследовано в динамике 28 больных сепсисом в возрасте от 16 до 76 лет (19 мужчин, 9 женщин). Причиной гнойной хирургической инфекции у обследуемых больных были обширные флегмоны мягких тканей. Состояние гормонального гомеостаза больных сепсисом исследовали радиоиммунными методами. Состояние гипофизарно-тиреоидной системы оценивали по результатам исследования тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4). Для этих исследований использовали наборы фирмы BYK-MALLING-

Frequency of septic complications has a tendency to an increase [3, 5], but lethality index has remained extremely high [4, 7].

Application of cryopreserved biosorbents is a perspective way for endotoxicosis removal at sepsis and for directed correction of neuro-endocrinic, antioxidant system and organism immune status damages [1, 2].

The study of the main neuro-endocrinic system indices in septic patients with pyo-inflammatory processes of soft tissues before and after surgical treatment and the correction of revealed damages by means of extracorporal connection of column with cryopreserved hepatocytes and thymus preparations to the 3-5th day after the operation was the aim of the investigation.

Liver and thymus cells of new-born piglets, obtained and cryopreserved in the Ukrainian Center of Biological Medicine (Kharkov) under the leadership of Dr. of Biol.sci. N. P. Subbota [6] were used in the work.

28 septic patients in the age from 16 to 76 years (19 men, 9 women) were examined in dynamics. The cause of purulent surgical infection in monitored patients were extensive phlegmons of the soft tissues. Hormonal homeostasis state in septic patients was studied by means of radio-immune methods. Hypophysial-thyroid system state was estimated by the investigation results of thyrotropic hypophysis hormone (THH), triiodthyronine (T_3), thyroxin (T_4). Standard sets of reagents of BYK-MALLING-RODT firm, Germany (THH) and ХОП ИБОК firm, Belarus (T_3, T_4) were used for the investigations. Hydrocor-

Матеріал, захищений авторським правом

Динамика показателей нейроэндокринной системы после применения криоконсервированных клеток тимуса ($M \pm m$)
Indices dynamics of neuroendocrinal system after the application of cryopreserved thymus cells ($M \pm m$)

Показатель Indices	Контрольная группа Control group	Сроки исследования Examination terms			
		до лечения before treatment	после лечения, сут after treatment, days		
		При поступлении At admission	1	2	5***
ТТГ, мкмЕ/л ТНН, μU/l	1,8 ± 0,28	2,09 ± 0,13*	2,03 ± 0,18**	1,96 ± 0,26**	1,88 ± 0,23**
T_3, нмоль/л T_3, nMol/l	1,72 ± 0,21	2,12 ± 0,21*	2,08 ± 0,23**	1,97 ± 0,12**	1,82 ± 0,18**
T_4, нмоль/л T_4, nMol/l	110,0 ± 11,2	152,4 ± 11,9*	129,7 ± 16,3**	127,4 ± 14,8**	118,3 ± 13,2**
Кортизол, нмоль/л Hydrocortisone, nMol/l	528,0 ± 28,6	857,2 ± 28,3*	616,4 ± 42,3**	593,7 ± 36,3**	594,2 ± 34,4**
Инсулин, мкед/мл Insulin, μU/ml	8,5 ± 0,7	26,3 ± 2,8*	36,2 ± 4,2**	23,6 ± 3,1*	14,3 ± 2,3**

Примечания. * — $P < 0,05$ с соответствующими показателями у здоровых лиц; ** — $P < 0,05$ у больных, не получавших клетки тимуса; *** — $P < 0,05$ у больных с положительной динамикой течения процесса.

Notes: * — $P < 0.05$ with the corresponding indices in health people; ** — $P < 0.05$ in patients, not treated with thymus cells; *** — $P < 0.05$ in patients with positive dynamics of process course.

RODT, Германия (ТТГ) и фирмы ХОП ИБОХ, Белоруссия (T_3, T_4). Кортизол и инсулин определяли радиоиммунными методами с помощью стандартных наборов реактивов производства фирм ХОП ИБОХ АН Белоруссии. Для измерения радиоактивности использовали сканирующий гамма-счетчик производства фирмы LKB (Швеция).

Исследования проведены до и после хирургического лечения. Полученные результаты представлены в таблице. Анализ результатов применения криоконсервированных клеток тимуса в комплексе детоксикационных мероприятий у больных с выраженными симптомами эндогенной интоксикации выявил их определенное модулирующее действие на процессы нарушенной нейроэндокринной регуляции в организме. Снижение уровня инсулина, ТТГ, T_3, T_4 свидетельствует о повышении энергообеспечения тканей, что определяется общим лечебным эффектом интенсивной терапии, особенно в более отдаленные сроки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Береснев А. В., Гринченко С. В., Сипливый В. А. и др.* Применение криоконсервированных ксеноспленоцитов в комплексном лечении больных с сепсисом // Гнойно-септические осложнения в неотложной хирургии: Тез. докл. науч.-практ. конф. хирургов Украины.- Харьков, 1995.– С. 193–195.
2. *Велигоцький О. М., Раківненко В. Х., Шестірко Л. І.* Застосування перфузату фрагментів тканини кріоконсервованої ксеноселезінки у хворих на перитоніт // Клин. вопр. хирургии: Сб. тез. докл. науч.-практ. конф.– Харьков, 1994.– С. 62–64.
3. *Малиновский Н. Н., Решетников Е. А., Шипилов Г. Ф., Цибин В. И.* Диагностика и лечение сепсиса // Хирургия.– 1992.– № 7.– С. 3–8.
4. *Одинец Ю. В.* Сепсис // Врачебная практика.– 1997.– № 5.– С. 17–25.
5. *Саенко В. Ф.* Сепсис // Сепсис и антибактериальная терапия: Сб. статей и рефератов.– Киев, 1997.– С. 4–6.
6. *Суббота Н. П.* Опыт приоритетных разработок института в области получения и криоконсервирования аллогепатоцитов // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 1–2.– С. 48–54.
7. *Bone R. C.* The pathogenesis of sepsis // Ann. Int. Med.– 1991.– Vol. 115.– P. 457–469.

Поступила 15.01.99

tisone and insulin were determined by the radio-immune methods by means of standard reagent collections produced by ХОП ИБОК of Belarus Academy of Sciences. To measure of radioactivity the scanning gamma-counter produced by LKB firm (Sweden) was used in the work.

The investigations were carried-out before and after surgical treatment. Obtained results have been shown in the Table. The analysis of results of cryopreserved thymus cell application in combination of antiintoxication measures in patients with endogenic expressed symptoms of intoxication, revealed their certain modulating effect on damaged neuro-endocrinic regulation processes in the organism. The decrease of insulin, THH, T3, T4 level testifies to the increase of tissue energy-supply, that is determined by general medical intensive therapy effect, especially, in more distant terms.

REFERENCES

1. *Beresnev A.V., Grinchenko S.V., Siplivy V.A. et al.* Cryopreserved xenosplenocyte application in septic patient complex therapy // Pyo-septic complications in urgent surgery: Abstr. of Sci. Pract. Conf. Reports of Ukrainian surgeons.– Kharkov, 1995.– P. 193-195.
2. *Veligotsky O.M., Rakivnenko V.Kh., Shestirko L.I.* Application of fragment tissue cryopreserved xenospleen perfusate in patients with peritonitis // Klin. Vopr. Khirurgii: Coll. of Report Abstr. of Sci. and Pract. Conf.– Kharkov, 1994.– P. 62–64.
3. *Malinovsky N.N., Reshetnikov E.A., Shipilov G.F., Tsybin V.I.* Sepsis diagnostics and treatment // Khirurgiya.– 1992.– № 7.– P. 3–8.
4. *Odinets Yu.V.* Sepsis // Vrachebnaya Praktika.– 1997.– № 5.– P. 17–25.
5. *Sayenko V.F.* Sepsis // Sepsis and antibacterial therapy: Coll. of articles and abstracts.– Kiev, 1997.– P. 4–6.
6. *Subbota N.P.* The experience of the Institute priority developments in the field of allohepatocyte obtaining and cryopreservation // Problemy Kriobiologii.– 1997.– № 2.– P. 48–54.
7. *Bone R.C.* The pathogenesis of sepsis // Ann. Int. Med.– 1991.– Vol. 115.– P. 457–469.

Accepted in 15.01.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.013: 57.043 UDC 611.013: 57.043

Гормональный спектр криоэкстрактов тотального эмбрионального препарата и плаценты разных сроков гестации

Н. П. СУББОТА, П. П. ПАШИНСКИЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В. А. ПИТЬКО
Харьковский медицинский университет

Cryoextraction hormonal spectrum of total embryonic preparation and placenta of different gestation terms

N. P. SUBBOTA, P. P. PASHINSKY
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

V. A. PITKO
Kharkov Medical University

Поиск новых эффективных лекарственных соединений, обладающих биостимулирующим эффектом, — одна из задач современной фармакологии. Учение В. П. Филатова о биогенных стимуляторах и тканевой терапии [5] является базисом при разработке новых биостимуляторов, получаемых из эмбриональных тканей человека в результате абортов ранних сроков.

Криобиологи, занимающиеся исследованием криорезистентности эмбриональных тканей, разработали ряд методических рекомендаций, касающихся не только консервирования эмбриональных тканей и клеток при субнулевых температурах, но и использования низких температур как фактора, экстрагирующего биологически активные соединения из эмбриональных тканей [1].

Нами изучены некоторые биологические свойства криоэкстрактов, полученных по ранее разработанному методу [4]. Цель данного исследования — изучение содержания гормонов пролактина, эстрадиола, прогестерона и хорионического гонадотропина в криоэкстрактах из эмбриональных тканей ранних сроков гестации плода (8–12 недель) и криоэкстракте плаценты, приготовленных по методу Н. П. Субботы, В. И. Грищенко и др. [3] в сравнительном аспекте. Пролактин и хорионический гонадотропин определяли методом иммуноферментного анализа, а концентрацию эстрадиола и прогестерона — радиоиммунологическим методом. В таблице приведено содержание гормонов в препаратах криоэкстрактов из эмбриональных тканей и плаценты.

Содержание гормонов в криоэкстрактах из эмбриональных тканей ($n = 7$)

Вид препарата	Хорионический гонадотропин, МЕ/л	Пролактин, МЕ/л	Прогестерон, нмоль/л	Эстрадиол, нмоль/л
КП	$105{,}00 \pm 6{,}8^{*}$	$122{,}5 \pm 6{,}2$	$1{,}05 \pm 0{,}04^{*}$	$11{,}4 \pm 1{,}06^{*}$
КХ	$57{,}50 \pm 3{,}2^{**}$	$120{,}9 \pm 6{,}0^{**}$	$83{,}5 \pm 4{,}0$	$6{,}5 \pm 0{,}32^{**}$
ТЭП	$96{,}05 \pm 4{,}6$	$1\,100{,}0 \pm 12{,}4$	$91{,}0 \pm 4{,}6$	$39{,}5 \pm 0{,}44$

Примечания. * — $p < 0{,}05$ между ЭП и КХ; ** — $p < 0{,}05$ между КХ и ТЭП. КП — криоэкстракт плаценты; КХ — криоэкстракт хориона; ТЭП — тотальный эмбриональный препарат.

Как следует из таблицы, лишь по показателям пролактина препараты плаценты и хориона сопоставимы, содержание прогес-

The search of new efficient medicinal compounds with biostimulating effect is one of the tasks of modern pharmacology. The V. P. Filatov's doctrine on biogenic stimulators and tissue therapy is the basis when developing new biostimulators obtained from human embryonic tissues at early term abortion.

Cryobiologists studying the cryoresistance of embryonic tissue have developed some methodical recommendations concerning not only the cryopreservation of embryonic tissues and cells at subzero temperatures, but the usage of low temperatures as a factor of extracting biologically active compounds from embryonic tissues [1].

We have studied some biological properties of cryoextractions obtained by means of the methods developed before [4]. The study of hormone content such as prolactin, estradiol, progesterone and chorionic gonadotrophin in cryoextractions from embryonic tissues of fetal gestation early terms (8–12 weeks) and placenta cryoextraction prepared by the method of N. P. Subbota, V. I. Grischenko et al. [3] in comparative aspect is the aim of given investigation.

Prolactin and chorionic gonadotrophin were determined by means of immunoenzymatic analysis, but estradiol and progesterone concentration — by means of radioimmunologic method. Hormone content in preparations of cryoextractions from embryonic tissues and placenta is shown in the table.

Hormone content in cryoextractions from embryonic tissues ($n = 7$)

Type of the preparation	Chorionic gonadotrophin, IU/l	Prolactin, IU/l	Progesterone, nmol/l	Estradiol, nmol/l
PC	$105{,}00 \pm 6{,}8^{*}$	$122{,}5 \pm 6{,}2$	$1{,}05 \pm 0{,}04^{*}$	$11{,}4 \pm 1{,}06^{*}$
CC	$57{,}50 \pm 3{,}2^{**}$	$120{,}9 \pm 6{,}0^{**}$	$83{,}5 \pm 4{,}0$	$6{,}5 \pm 0{,}32^{**}$
TEP	$96{,}05 \pm 4{,}6$	$1\,100{,}0 \pm 12{,}4$	$91{,}0 \pm 4{,}6$	$39{,}5 \pm 0{,}44$

Notes: * — $p < 0.05$ between EP and CC; ** — $p < 0.05$ between CC and TEP.

As it is seen from the table, placenta and chorion preparations were compared only by prolactin indices, progesterone content in PC is in 8 times lesser than in chorion preparation, indices of chorion gonadotrophin in placenta cryoextraction were in 2 times higher than in the preparation of chorion cryoextraction.

Матеріал, захищений авторським правом

терона в КП в 8 раз меньше, чем в препарате хориона, эстрадиола и хорионического гонадотропина в криоэкстракте плаценты в 2 раза выше, чем в препарате криоэкстракта хориона.

В ТЭП величины прогестерона практически не отличались от таковых для хориона, а показатели хорионического гонадотропина сопоставимы с величинами, полученными для КП. Как и для препарата плаценты, содержание эстрадиола в ТЭП было в 2 раза выше, чем в препарате плаценты, и в 4 раза выше, чем в криоэкстракте хориона. Основное различие препаратов плаценты и ТЭП в показателях пролактина; содержание пролактина в ТЭП на порядок выше, чем в препаратах плаценты.

Различное содержание исследованных гормонов в эмбриональных препаратах предполагает и их различное действие на метаболические процессы при введении в организм. Например, их действие в качестве индукторов биосинтеза ряда ферментных белков будет различно, так как эстрадиол, тестостерон и прогестерон индуцируют биосинтез лактатдегидрогеназы, а кортикостероиды и эстрогены стимулируют активность нуклеаз [2]. Исходя только из этого примера можно предположить различный механизм биологического действия препаратов как при одноразовом введении в организм, так и при сочетании со специфическими лекарственными средствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Грищенко В. И., Суббота Н. П., Галоян А. Р и др.* Получение, хранение и применение криоэкстрактов фетальных тканей человека: Метод. рекомендации. - Харьков, 1996.– 6 с.
2. *Пучковская Н. А., Гончаренко С. Н., Гончарук А. Н. и др.* // Тканевая терапия.– Киев: Здоров'я, 1975.– С. 25–28.
3. *Суббота Н. П., Грищенко В. И., Козюменский В. Ф. и др.* Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.– Харьков, 1997.– 8 с.
4. *Суббота Н. П., Пашинский П. П., Розанова Е. Д.* Биологические свойства криоэкстрактов эмбриональных тканей // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 3.– С. 35–42.
5. *Филатов В. П.* Основные теоретические вопросы тканевой терапии // Тканевая терапия.– Киев: АН УССР, 1953.– С. 5–21.

Поступило 14.12.98

In TEP progesterone values did not practicaliy differ from the same for chorion, but indices of chorionic gonadotrophin were compared with the values obtained for PC. As for placenta preparation, estradiol content in TEP was twice higher than in placenta preparation, and in 4 times higher than in chorion cryoextraction. A principal difference of placenta preparations and TEP was in prolactin indices; prolactin content in TEP was one order higher than in placenta preparations.

A different content of studied hormones in embryonic preparations means their different effect on metabolic processes during the introduction in the organism. For example, their effect as biosynthesis inductors of some enzymatic proteins will be different, because estradiol, testosterone and progesterone induce the lactate dehydrogenase biosynthesis, but corticosteroids and estrogens stimulate the activity of nucleases [2]. Proceeding only from this example one can suppose a different mechanism of biological effect of preparations both at a single injection in an organism, and at the combination with specific medicinal preparations.

REFERENCES

1. *Grischenko V.I., Subbota N.P., Galoyan A.R. et al.* Obtaining, storage and application of human fetal tissue cryoextractions. Method. recommendations.– Kharkov, 1996.– P. 6.
2. *Puchkovskaya N.A., Goncharenko S.N., Goncharuk A.N. et al.* Tissue therapy.– Kiev, Zdorov'ya, 1975.– P. 25–28.
3. *Subbota N.P., Grischenko V.I., Kozyumensky V.F. et al.* Obtaining, storage and application of chorion fragments, suspensions and cryoextraction. Method. recommendations.– Kharkov, 1997.– P. 8.
4. *Subbota N.P., Pashinsky P.P., Rozanova E.D.* Biological properties of embryonic tissue cryoextractions // Probl. Kriobiologii.– 1998.– № 3.– P. 35–42.
5. *Filatov V.P.* Principal theoretical questions of tissue therapy // Tissue therapy.– Kiev: National Academy of UkrSSR, 1953.– P. 5–21

Accepted in 14.12.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.831–005–08: 615.849.112

UDC 616.831–005–08: 615.849.112

Сравнительная эффективность низкоинтенсивной СВЧ- и КВЧ-терапии больных начальной цереброваскулярной патологией

В. А. МАЛАХОВ, Г. И. ДОРОШЕНКО, Е. В. КОЧУЕВА
Харьковский институт усовершенствования врачей

A comparative efficiency of low-intensive SHF- and EHF-therapy in patients with initial stages of cerebrovascular pathology

V. A. MALAKHOV, G. I. DOROSHENKO, E. V. KOCHUYEVA
Kharkov Institute of Doctor's Advanced Training

Исследования последних лет показали высокую терапевтическую эффективность применения электромагнитного поля (ЭМП) низкой интенсивности микроволнового диапазона при лечении широкого спектра заболеваний [1, 2]. Однако однозначное мнение относительно механизмов влияния ЭМП на организм человека отсутствует. Остается открытым и вопрос о наиболее оптимальных, с точки зрения терапии, параметрах воздействующего электромагнитного сигнала.

Цель настоящего исследования — изучение сравнительной эффективности применения ЭМП низкой интенсивности КВЧ- и СВЧ-диапазонов при лечении больных начальными формами сосудистых заболеваний головного мозга (НФСЗГМ).

Под наблюдением находился 81 больной НФСЗГМ, к которым, по критериям Е. В. Шмидта [4], относятся начальная дисциркуляторная энцефалопатия и начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга. Возраст больных от 37 до 53 лет. Больные были разделены на две группы. Больным 1-й группы ($n = 38$) проводили КВЧ-терапию на заднешейную область электромагнитным сигналом частотой 53,5 ГГц и плотностью потока мощности (ППМ) 100 мкВт/см^2 по 15 мин ежедневно. Курс лечения — 10–12 сеансов. Больным 2-й группы ($n = 43$) проводили СВЧ-терапию электромагнитным сигналом, сформированным на основе импульсной модуляции несущей частоты, лежащей в пределах 1,2–1,3 ГГц, периодической последовательностью прямоугольных импульсов, частота следования которых меняется по пилообразному закону в пределах от 1 до 300 кГц. ППМ составляла 10 мкВт/см^2. Пластину антенны располагали на расстоянии 1 м сзади от сидящего больного. Длительность сеанса 15 мин ежедневно. Курс лечения — 10 сеансов.

Для контроля эффективности проводимой терапии у всех больных до и после курса лечения изучали динамику неврологических показателей, данные электроэнцефалографии (ЭЭГ), реоэнцефалографии (РЭГ), ультразвуковой допплерографии (УЗДГ). Статистическую обработку полученных данных проводили по критериям Фишера–Стьюдента. Клиническая эффективность применения терапии составила в 1-й группе больных 79, во 2-й — 81,4%. В обеих группах после лечения выявлена положительная динамика неврологических показателей в виде регресса головных болей, улучшения памяти, внимания, уменьшения выраженности мозжечково-атактического синдрома.

На ЭЭГ положительная динамика выражалась в виде нарастания спектральной мощности альфа-ритма, усиления его периодичности. На РЭГ отмечалось увеличение пульсового кровенаполнения сосудов головного мозга за счет снижения их периферического сопротивления. Данные УЗДГ свидетельствовали о пользе нормализации средней линейной скорости кровотока по магистральным сосудам головного мозга.

Статистически достоверных различий клинической эффективности КВЧ- и СВЧ-терапии нами выявлено не было. Выраженный и стойкий терапевтический эффект вышеуказанных

Recently investigations showed a high therapeutical efficiency of electromagnetic field (EMF) application with low-intensive SHF- range at wide spectrum of disease treatment [1, 2]. But there is no a simple view about the EMF mechanism effect onto human organism. The question about the most optimal parameters of effecting electro-magnetic signal from the "therapy point of view", remains open.

The aim of this investigation is the study of comparative efficiency of the EMF low intensity with super high frequencies (SHF) and extreme high frequencies (EHF) ranges during the treatment of patients with initial stages of cerebrovascular diseases of brain (ISVDB).

81 patients with the ISVDB were under the observation; the initial discirculator encephalopathy (IDE) and initial manifestations of brain blood supply insufficiency are considered to these forms by Shmidt E. V. criteria [4].

Patient's age was from 37 till 53 years. Patients were divided into two groups. EHF-therapy was conducted to the 1st group of patients ($n = 38$) during 15 min every day onto the postcervical area by the electro-magnetic signal with 53.5 GHz frequency and with capacity of 100 μW/cm^2 stream density (CSD). Treatment course was 10–12 sessions. SHF- therapy with electro-magnetic signal, developed on the base of carrying frequency impulse modulation, lying within the limits of 1.2–1.3 GHz with the periodical sequence of rectangle impulses, movement frequency in which changes by the saw-like law within the limits from 1 to 300 kHz, was conducted to the IInd group ($n = 43$) of patients. CSD made 10 μW/cm^2. An antenne plate was placed behind the sitting patient on the distance of 1 m. The session duration was 15 min. Treatment course was 10 seances every day.

For the efficiency control of conducted therapy the dynamics of neurological indices, electroencephalography data (EEG), rheoencephalography (REG), UV dopplerography (UVDG) were studied in all patients before and after the treatment course. Statistical proceeding of obtained data was carried out by means of Fisher–Student's criteria. Clinical efficiency of therapy application makes 79% in the first patient's group and 84% — in the second. A positive dynamics of neurological indices as headache regress, memory and attention improvement, expression decrease of cerebellum-atactic syndrome were revealed in both groups after the treatment.

A positive dynamics in EEG manifested in the increase in alpha-rhythm spectral capacity and in its periodicity intensification. An increase of pulse of brain vessels due to its peripheric resistance decrease was observed in REG. UVDG data testified to the use of the middle linear blood flow rate normalization by main brain vasculars.

Statistically true differences of SHF- and EHF-therapy clinical efficiency were not revealed by us.

An expressed and stable therapeutical effect of the given treatment methods allows to recommend their application in SVDB patient's complex therapy.

Матеріал, захищений авторським правом

методов лечения позволяет рекомендовать их использование в комплексной терапии больных ПФСЗГМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арзуманов Ю. Л., Бецкий О. В., Девятков Н Д., Лебедева Н. Н.* Применение ММ-волн в клинической медицине (последние достижения) // Материалы 11 российского симпозиума с международным участием "Миллиметровые волны в медицине и биологии".– М., 1997.– С. 3–9.
2. *Девятков Н. Д.* Особенности медико-биологического применения миллиметровых волн.– М., 1994.– 252 с.
3. Малахов В. А. Начальные формы цереброваскулярной патологии.– Харьков: Основа, 1997.– 188 с.
4. Шмидт Е. В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова.– 1985.– № 9.– С. 1281–1291.

Поступило 24.03.98

REFERENCES

1. *Arzumanov Yu.L., Betsky O.V., Devyatkov N.D., Lebedeva N.N.* MM-wave application in clinical medicine (last achievements) // Materials of the 11th Russian symposium with international participation.– Millimeter waves in medicine and biology.– M., 1997.– P. 3–9.
2. *Devyatkov N.D.* Peculiarities of medical and biological MM-wave application.– M., 1994.– 252 p.
3. *Malakhov V.A.* An initial stages of cerebrovascular pathology.– Kharkov: Osnova, 1997.– 188 p.
4. *Shmidt E.V.* Classification of vascular brain and spinal cord damages // Korsakov Journ. nevrologii i psihiatrii.– 1985.– № 9.– P. 1281–1291.

Accepted in 24.03.98

УДК 615.361.621.9.014.413: 612.613.1

UDC 615.361.621.9.014.413: 612.613.1

Влияние нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека на оплодотворяющую способность спермиев и развитие эмбрионов человека *in vitro*

В. И. ГРИЩЕНКО, А. Г. ГЕРОДЕС, М. П. ПЕТРУШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The effect of native and cryopreserved human follicular fluid on fertilizing ability of spermatozoa and human embryo development *in vitro*

V. I. GRISCHENKO, A. G. GERODES, M. P. PETRUSHKO

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

Широкое использование вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия требует постоянного их совершенствования. Одним из важных этапов в технологии экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является выделение фракции спермиев с быстрым прогрессивным движением. Известно, что биологические жидкости улучшают функциональные свойства спермиев [3, 4].

Цель данной работы — определение оплодотворяющей способности спермиев, подвижная фракция которых была выделена из эякулята с использованием нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека, а также сравнительный анализ фертилизации, дробления и частоты наступления беременности после оплодотворения ооцитов этими спермиями и культивируемых в присутствии клеток фолликулярной жидкости.

Фракцию спермиев с быстрым прогрессивным движением выделяли из эякулята методом всплывания. Фолликулярную жидкость получали от женщин, участвующих в программе ЭКО Харьковского Центра репродукции человека. Образцы жидкости после выделения ооцитов центрифугировали, выдерживали в парах жидкого азота в течение 20 мин, а затем погружали в жидкий азот. Размораживали на водяной бане при температуре 37 °С. Ооциты оплодотворяли активно-подвижной фракцией спермиев, выделенной из эякулята с помощью среды Menezo (1-я группа, контрольная), 50% нативной фолликулярной жидкости человека и среды Menezo (2-я группа), 50% криоконсервированной фолликулярной жидкости человека и среды

A wide application of auxiliary reproductive technologies in the treatment of infertility requires constant their improvement. One of important stages in the technology of *in vitro* fertilization (IVF) is the isolation of the spermatozoa fraction with a rapid progressive movement. It is known that biological liquids improve functional properties of spermatozoa [3, 4]. The aim of given work is to determine fertilizing ability of spermatozoa, motile fraction of those was isolated from the ejaculate by using native and cryopreserved human follicular fluid as well as comparatively to analyze fertlization, division and frequency of pregnancy onset after the fertlization of oocytes by these spermatozoa.

The fraction of spermatozoa with a rapid progressive movement was isolated from ejaculate by the swim-up method. Follicular fluid was obtained from women participating in the IVF program of Kharkov Center of Human Reproduction. The samples of liquids after oocyte isolation were centrifuged, exposed in the vapors of a liquid nitrogen during 20 min and then were submerged into a liquid nitrogen. Thawed on a water bath at the temperature of 37 °C. Oocytes were fertilized by an active motile fraction of spermatozoa, isolated from the ejaculate by means of Menezo medium (the first control group), 50% of native human follicular fluid and Menezo medium (the second group), 50% of cryopreserved human follicular fluid and Menezo medium (the third group), at a rate of 100 000 spermatozoa per oocyte. The rate of division and the quality of embryos were controlled in 48-96 hrs after oocyte aspiration by means of inverted microscope. The quallity of embryos was estimated on the scale proposed by Erenus [2].

Матеріал, захищений авторським правом

Menezo (3-я группа), из расчета 100 000 сперматозоидов на ооцит. Темпы дробления и качество эмбрионов контролировали через 48–96 ч после аспирации ооцитов под инвертированным микроскопом. Качество эмбрионов оценивали по шкале, предложенной Erenus [2].

Было исследовано 40 эякулятов, показатели спермограммы которых соответствовали нормоспермии по классификации ВОЗ [1]; 93 яйцеклетки, полученные при аспирации фолликулов от 40 женщин, были оплодотворены активно-подвижной фракцией спермиев, выделенных в трех исследуемых группах. Причем, спермиями, выделенными в 1-й группе, было оплодотворено 43 яйцеклетки, во 2-й – 30 клеток и в 3-й – 20 ооцитов. Было обнаружено, что после добавления фолликулярной жидкости человека и при часовой инкубации изменялись кинетические параметры спермиев. Так, при использовании среды Menezo выделялось 65,9% активно-подвижных спермиев. Добавление в среду капацитации фолликулярной жидкости увеличивало число таких спермиев до 74,8%. Действие фолликулярной жидкости, перенесшей глубокое охлаждение, было сравнимо с влиянием на кинетические характеристики спермиев нативной фолликулярной жидкости (77,8%).

Частота оплодотворения практически не отличалась: 74,4% – контроль, 63,3 – во 2-й группе и 60 – в 3-й. Однако дальнейшая оценка морфофункциональных характеристик эмбрионов позволила установить, что эмбрионы, полученные после оплодотворения ооцитов активно-подвижной фракцией спермиев, выделенных в нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости, обладали быстрыми темпами дробления: стадии 8 бластомеров достигли 94,7 и 95% соответственно, стадии бластоцисты – 20 и 23% эмбрионов, что значительно выше, чем в контроле (6,25%). В контрольной группе лишь 28,1% эмбрионов характеризовались отсутствием фрагментации (Grade 1), тогда как во второй и третьей группе число таких эмбрионов составило 68,4 и 70% соответственно. Частота наступления беременности также была выше в исследуемых группах.

Оплодотворение ооцитов спермиями, выделенными в 50% нативной или 50% криоконсервированной фолликулярной жидкости не повлияло на частоту фертилизации, однако заметно снизило число эмбрионов с признаками фрагментации и повысило частоту беременности. Фолликулярная жидкость человека повышала оплодотворяющую способность спермиев.

Таким образом, использование фолликулярной жидкости человека в методиках выделения активно-подвижной фракции спермиев может сыграть определенную роль в повышении результативности и эффективности программ ЭКО.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Руководство* ВОЗ по стандартизированному обследованию и диагностике бесплодных супружеских пар.– М.: МедПресс, 1997.– 90 с.
2. *Erenus M.* The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after *in vitro* fertilization // Fertil. and Steril.– 1991.– 56, № 4.– P. 707–710.
3. *Fabbri R., Porcu E., Lenzi A. et al.* Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence of sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction // Fertil. Steril.– 1998.– 69, № 1.– P. 112–117.
4. *Siegel M.S., Paulson R.J. Graczykowski J.W.* The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa // Human Reprod.– 1990.– 5, № 8.– P. 975–980.

Поступило 16.09.98

40 ejaculates have been investigated, the spermogram indices of them corresponded to normospermia on the WHO classification [1]; 93 oocytes, obtained by aspiration of follicles from 40 women were fertilized by active motile fraction of spermatozoa, isolated in three groups under study. Thereat 43 oocytes were fertilized by spermatozoa isolated in the 1st group, 30 oocytes – in the 2nd group and 20 oocytes – in the 3rd group. It has been found that after human follicular fluid addition and at 1hr incubation kinetic parameters of spermatozoa changed. When using Menezo medium 63.9% of active motile spermatozoa were isolated. The addition of follicular fluid into the capacitation medium increased the number of such spermatozoa up to 74.8%. The effect of follicular fluid, subjected to a deep cooling, was compared with the influence of native follicular fluid (77.8%) on kinetic characteristics of spermatozoa.

The frequency of fertlization did not practically differ: 74.4% – control, 63.3 – in the second group and 60 – in the third. Hence further estimation of morphofunctional characteristics of embryos allowed to establish that the embryos obtained after oocyte fertilization by active motile fraction of spermatozoa isolated from native and cryopreserved human follicular fluid, possessed rapid rates of division: 94.7 and 95% reached the stage of 8 blastomere, correspondingly, blastocyst stage – 20 and 23% of embryos, that significantly higher than in the control (6.25%). In the control group only 28.1% of embryos were characterized by the absence of fragmentation (Grade 1), meanwhile in the second and third groups the number of such embryos made 68.4 and 70%, correspondingly. The frequency of pregnancy onset was also higher in the groups studied.

The fertilization of oocytes by spermatozoa isolated in 50% native or 50% cryopreserved follicular fluid did not affect the fertilization frequency, but considerably decreased the number of embryos with the signs of fragmentation and increased the frequency of pregnancies. Human follicular fluid increased fertilizing ability of spermatozoa.

Thus the application of human follicular fluid in the methods of isolation of an active motile fraction of spermatozoa may play a certain role in the enhancement of the efficiency of IVF programs.

REFERENCES

1. *WHO manual* on standartized monitoring and diagnostics of infertile married couples.– Moscow: MedPress, 1997.– 90 p.
2. *Erenus M.* The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after *in vitro* fertilization // Fertil. and Steril.– 1991.– 56, № 4.– P. 707–710.
3. *Fabbri R., Porcu E., Lenzi A. et al.* Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence of sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction // Fertil. Steril.– 1998.– 69, № 1.– P. 112–117.
4. *Siegel M.S., Paulson R.J. Graczykowski J.W.* The influence of human follicular fluid on the acrosome reaction, fertilizing capacity and proteinase activity of human spermatozoa // Human Reprod.– 1990.– 5, № 8.– P. 975–980.

Accepted in 16.09.98

Матеріал, захищений авторським правом

Международное рабочее совещание "Криолабильность и криоустойчивость биологических объектов"

С 9 по 12 марта 1999 г. в Харькове (Украина) состоялось рабочее совещание "Криолабильность и криоустойчивость биологических объектов" под эгидой Национальной Академии наук Украины, Национальной комиссии Украины в делах ЮНЕСКО на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины при участии международной кафедры ЮНЕСКО по криобиологии.

В работе совещания приняли участие более ста специалистов в области криобиологии и криомедицины, в том числе такие видные ученые, как К. Грин и Б. Фуллер (Великобритания), С. Сумида (Япония), П. Мержичка (Чехия), В. И. Грищенко, Е. А. Гордиенко, Т. Н. Юрченко, А. А. Цуцаева, А. Ю. Петренко, А. Н. Гольцев, Т. П. Бондаренко (Украина). Рабочий язык совещания — английский.

С основными сообщениями по теме совещания выступили:

К. Грин	Значение белков теплового шока для консервации органов при низкотемпературном консервировании.
Б. Фуллер	Влияние гипотермии на сохранение печени. Роль фруктозы в поддержании энергетического метаболизма.
С. Сумида	Жизнь и смерть биологических клеток в кристаллах льда.
П. Мержичка	Криоконсервирование гемопоэтических клеток-предшественников для аутологической и аллогенной трансплантации.
В. И. Грищенко	Особенности криоконсервирования репродуктивных клеток.
Е. А. Гордиенко	Физико-математические подходы к криобиологии.
Т. Н. Юрченко	Украинский банк криоконсервирования разных биологических объектов.
А. А. Цуцаева	Проблемы глубокого холодового анабиоза.
А. Ю. Петренко	Биоэнергетика в криобиологии.
А. Н. Гольцев	Использование криоконсервирования как метода селекции регуляторных клеток гемопоэтических тканей.
Т. П. Бондаренко	Проблемы криоконсервирования адренокортикальных тканей и их применение в медицине.

Были также заслушаны краткие сообщения:

International workshop "Cryolability and Cryostability of biological objects"

On March 9–12, 1999 in Kharkov city (Ukraine) the workshop "Cryolability and Cryostability of biological objects" under aegis of the National Academy of Sciences of the Ukraine, National Committee in UNESCO Affairs at the base of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine together with the international UNESCO chair on cryobiology was held.

About 100 scientists in the field of cryobiology and cryomedicine, including such outstanding scientists in cryobiology and cryomedicine field as C. Green, B. Fuller (Great Britain), S. Sumida (Japan), P. Mericka (Czech Republic), V. I. Grischenko, E. A. Gordienko, T. N. Yurchenko, A. A. Tsutsayeva, A. Yu. Petrenko, A. N. Goltsev, T. P. Bondarenko (Ukraine) took part in the workshop. The workshop language was English.

Main reports on the workshop topic were made by:

Colin Green	The Role of Heat Shock Proteins and Chaperons in Organ Preservation at Low Temperature
Barry Fuller	Hypothermic Storage of Liver for Clinical Transplantation
Sajio Sumida	Life and Death of Biological Cells in Ice Crystals
Pavel Merichka	Cryopreservation of Hematopoietic Progenitor Cells for Autologous and Allogenic Transplantation
V.I. Grischenko	The Peculiarities of Reproductive Cells Cryopreservation
E. A. Gordienko	Physical and Mathematical Approaches in Cryobiology
T.N. Yurchenko	Ukrainian Bank of Cryopreservation of Different Biological Objects
A A. Tsutsayeva	Problems of Deep Cold Anabiosis
A.Yu. Petrenko	Bioenergetics in Cryobiology
A.N. Goltsev	Usage of Cryopreservation as the Method of Slecetion of Regulatory Cells of Hemopoietic Tissues
T.P. Bondarenko	Promblems of Cryopreservation of Adrenocortical Tissues and Their Appication in Medicine

Brief communications were also reported:

A.V. Zinchenko	On Some Mechanisms of Biological Object Damages during Cryopreservation
T.S. Dyubko	The Role of Cytochrome P-450 in the Response of Lipid Bilayer to Freezing and Cryopotectant Effect
Yu.E. Panina	Hypothermal Hemolysis of Erythrocytes

Матеріал, захищений авторським правом

А. В. Зинченко	О некоторых механизмах повреждения биологических объектов при криоконсервировании.
Т. С. Дюбко	Роль цитохрома Р-450 в реакции липидного бислоя на действие замораживания криопротекторов.
Ю. Е. Панина	Гипотермический гемолиз эритроцитов.
Л. И. Релина	Новый белок у личинок *Tenebrio molitor*, который появляется в условиях холодовой акклимации.
Н. Н. Чуб	Гипотермическое сохранение спермиев человека.
Е. И. Смольянинова	Структурно-морфологические реакции эмбрионов мышей в растворах криопротекторов.
О. С. Прокопюк	Обоснование создания ряда биоактивных тканевых препаратов из фетоплацентарного комплекса людей и их применение в медицине.
Н. В. Репин	Исследование морфологических характеристик стойкости клеток крови к некоторым воздействиям. Роль слабых связей в поддержании мембранного гомеостаза.
Н. М. Шпакова	Коррекция процесса формирования трансмембранных пор в мембранах эритроцитов с помощью амфифильных соединений.
О. В. Кудокоцева	Проблемы криоконсервирования кроветворных клеток.
Л. П. Кравченко	Влияние гипотермических температур на метаболические свойства клеток печени.
Л. Н. Тынынька	Сохранение фрагментов селезенки и печени свиней в зависимости от режимов криоконсервирования.

В рамках рабочего совещания был заслушан и обсужден план работы кафедры ЮНЕСКО на 1999 год.

В заключение было принято следующее решение:

1. Тема рабочего совещания "Криолабильность и криоустойчивость биологических объектов" является актуальной в решении криобиологических проблем, требует продолжения исследований и обсуждения в дальнейшем полученных результатов.

2. Отметить высокий уровень знаний в области криобиологии молодых ученых ИПКиК НАН

L.I. Relina	New Protein in *Tenebrio molitor* larvae, revealing under the conditions of cold acclimation
N.N. Chub	Application of Sperm Concentrates Stored Under Hypothermia Conditions
E.I. Smolyaniova	Structural and Morphological Reactions of Mice Embryos in Cryoprotectant Solutions
O.S. Prokopyuk	Fundamental Sunstantiation of Creation of Some Bioactive Tissue Preparations from Human Placetal Complex and Their Application in Medicine
N.V. Repin	Investigation of Morphological Characteristics of Blood Cell Resistance to Some Effects. The Role of Weak Bonds in Membrane Homeostasis Supporting
N.M. Shpakova	Correction of the Process of Transmembrane Pores in Erythrocyte Membranes by Means of Amphiphilic Compounds
O.V. Kudokotseva	Problems of Hemopoietic Cells Cryopreservation
L.P. Kravchenko	Hypothermic Temperatures Effect on Metabolic Peculiarities of Liver Cells
L.N. Tynynyka	Porcine Spleen and Liver Fragments Preservation Depending on the Cryopreservation Regimen

Within the workshop frames the plan of UNESCO Chair work for 1999 was reported and discussed.

The following decision was approved:

1. The topic of the "Cryolability and Cryostability of biological objects" workshop has remained an actual one when solving cryobiological problems and can be the object of further discussion.

2. To underline, that many young scientists have participated in the workshop and demonstrated a high level of knowledge in the cryobiology field.

3. To approve the plan of the UNESCO Chair on Cryobiology, presented to the workshop for the discussion.

4. To attach a great importance to the activity of international Chair on Cryobiology under UNESCO aegis at the base of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine and its opportunity to attract young scientists in this new field of knowledge from different countries for the cooperation, the application of cryobiological achi- evements in different spheres of human activity with the aim to improve the well-being of people and further widening of scientific investigations.

5. The involvement of British Council at Kharkov State University is considered as expedient for the

Матеріал, захищений авторським правом

Украины, принявших активное участие в работе совещания.

3. Одобрить план работы кафедры криобиологии ЮНЕСКО, который был представлен рабочему совещанию в рамках обсуждения.

4. Отметить целесообразность деятельности международной кафедры криобиологии под эгидой ЮНЕСКО на базе Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины и ее возможности привлечения к работе в этой новой области знаний молодых ученых из разных стран, применения достижений криобиологии в различных сферах деятельности человека в целях улучшения благосостояния людей и дальнейшего расширения научных исследований.

5. Считать целесообразным подключение Британского Совета при Харьковском государственном университете для совершенствования знаний английского языка аспирантов кафедры ЮНЕСКО на базе ИПКиК НАН Украины.

6. Просить К. Грина и В. И. Грищенко информировать 36-е заседание Международного общества по криобиологии в 1999 году и заседание Европейского общества низкотемпературной биологии о рабочем совещании, которое состоялось в Харькове, а также информировать ЮНЕСКО о состоявшемся рабочем совещании и о заседании кафедры криобиологии.

Участники рабочего совещания выражают признательность ЮНЕСКО, Национальной комиссии Украины в делах ЮНЕСКО, Национальной Академии наук Украины за поддержку и содействие в проведении рабочего совещания.

improvement of knowledge in English of the post-graduate students of the UNESCO Chair at the base of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

6. To ask Dr. C.Green and V.I. Grischenko to inform the 36th Annual Meeting of Society for Cryobiology 1999 and Meeting of European Society for Low Temperature Biology about the workshop, was held in Kharkov, as well as to inform UNESCO concerning this workshop and the meeting of Cryobiology Chair, on a successful beginning of its work.

Participants of the workshop are grateful to UNESCO, National Committee in UNESCO Affairs, the National Academy of Sciences of the Ukraine for the support and assistance in this workshop performance.

Матеріал, захищений авторським правом

БЕЛОУС Аполлон Максимович
BELOUS Apollon Maximovich



4 января 1999 года скончался **Аполлон Максимович Белоус** — выдающийся ученый-биохимик, один из основателей отечественной криобиологии, член-корреспондент Национальной Академии наук Украины, профессор, доктор медицинских наук, лауреат именных премий им. А. В. Палладина и А. А. Богомольца.

А. М. Белоус родился 27 января 1929 г. в г. Каменец-Подольском Хмельницкой области в семье служащего. Закончил с отличием школу, медицинский техникум, Киевский медицинский институт. Будучи студентом 6-го курса, стал работать в клинике проф. Федоровского, осуществлял самостоятельные операции. В 1955 г. окончил институт и был направлен в г. Алчевск Луганской области, где работал хирургом в больнице. После окончания курсов усовершенствования при Харьковском научно-исследовательском институте ортопедии и травматологии директор института член-корреспондент АМН СССР, проф. Новаченко предложил молодому хирургу поступить в аспирантуру.

Талантливый, увлекающийся, необыкновенно работоспособный человек, Аполлон Максимович в 1963 г. защитил кандидатскую, а в 1969 г. докторскую диссертации. С его именем связано развитие теоретических исследований в области регенерации поврежденных тканей человека, им была создана новая школа ученых-исследователей в Украине, которые работали над проблемой ускорения и оптимизации процессов заживления переломов и ран с помощью экзогенных биополимеров.

Высокий профессионализм позволил А. М. Белоусу стать одним из организаторов нового направления в науке — криобиологии и криомедицины. Начиная с 1971 г., он был зав. отделом криобиохи-

On January 4th, 1999 deceased **Apollon Maximovich Belous** — outstanding scientist-biochemist, one of the founders of cryobiology in our country, the corresponding member of the National Academy of Sciences of the Ukraine, professor, MD, the winner of the A. V. Palladin's and A. A. Bogomolets' Prizes.

A. M. Belous was born on January 27th, 1929 in the city of Kamenets-Podolsky, Khmelnitsky region in the employee's family. He finished school with honours, graduated from medical secondary school, Kiev Medical Institute. Being the 6th year student, he began to work in the Prof. Fedorovsky hospital, where he performed independent perations. In 1955 he graduated from the Institute and was directed to work in Alchevsk city, Lugansk region, where he worked as a surgeon in the hospital. After finishing the advanced courses at Kharkov Scientific and Research Institute of Orthopedics and Traumatology, the director of the Institute, corresponding member of AMS of the USSR, Prof. Novachenko proposed a young surgeon to enter the post-graduate course.

Talented, keen, very hardworking person, in 1963 Apollon Maximovich defended the candidate's thesis degree, and in 1969 — thesis for a doctor's degree. The development of theoretical investigations in the field of human damaged tissue regeneration is related with his name, a new school of the researches dealing with the problem of acceleration and optimization of fracture and wound healing processes by means of exogenous biopolymers was created by him in the Ukraine.

Due to high professional skills Belous A. M. became one of the organizers of a new direction in science — cryobiology and cryomedicine. Since 1971 he was the head of Cryobiochemistry Department and then Chief scientific worker of the Institute for Prob-

Матеріал, захищений авторським правом

мии, а затем главным научным сотрудником Института проблем криобиологии и криомедицины. На протяжении всех этих лет он работал над проблемами криоповреждения и криозащиты биологического материала. Большой цикл исследований по структурно-функциональному состоянию клеток и тканей в условиях действия низких температур позволил А. М. Белоусу выявить закономерности поведения живого, усовершенствовать технологии криоконсервирования биоматериала, который применяется в медицинской практике.

А. М. Белоус опубликовал более 300 работ, был соавтором 15 монографий, 18 изобретений, которые отличались высоким профессионализмом, стимулировали развитие отечественной биохимии и биофизики клетки. Под его руководством защищено 8 докторских и 31 кандидатская диссертация. Им создана школа талантливых ученых, которые возглавляют кафедры в Харьковском медицинском и Харьковском государственном университетах, 4 отдела в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

За достижения в области фундаментальной криобиологии А. М. Белоус награжден медалью "За доблестный труд", Почетными грамотами Верховного Совета УССР и Президиума АН УССР, получил Государственную премию по науке и технике Украины.

Научная общественность, друзья, коллеги, ученики, родные и близкие глубоко скорбят в связи с безвременным уходом из жизни Аполлона Максимовича. Светлая память о добром, отзывчивом человеке и Учителе сохранится в сердцах тех, кто был с ним рядом при жизни.

lems of Cryobiology and Cryomedicine. During all this time he worked on the problems of cryodamage and cryoprotection of biological material. A lot of investigations on structural and functional state of cells and tissues under conditions of low temperature effect allowed to Belous A. M. to reveal the regularities of living beings behaviour, to improve technologies of biomaterial cryopreservation, used in medical practice.

A. M. Belous was the author of more than 300 works, was co-author of 15 monographs, 18 inventions, distinguishing by a high level of professional skills and stimulating the development of national cell biochemistry and biophysics. Under his leadership 8 theses of doctor's degree and 31 of candidate's degree ones were defended. He established the school of talented scientists heading the chairs in Kharkov Medical and Kharkov State Universities, 4 departments in the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

For the achievements in the field of fundamental cryobiology A. M. Belous was awarded with the Medal for Labour Valour and State Prize on Science and Techincs of the Ukraine.

Scientific community, friends, colleagues, disciples, relatives deeply grieve over a premature death of Apollon Maximovich. May his memory live long and let this memory about kind, sympathetic person and Master live in the hearts of those who were close to him during his life.

Матеріал, захищений авторським правом

К сведению авторов журнала "Проблемы криобиологии"

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением (для авторов из Украины). Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 с. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к рисункам. Объем краткого сообщения – 3 с. Оба экземпляра подписывают авторы с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов и даты.

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом 210×297 мм. Левое поле страницы — не менее 3, правое — 1, верхнее и нижнее — по 2 см. Абзацный отступ равен 5 знакам. В левом верхнем углу проставляется УДК, затем название статьи, инициалы и фамилия автора (авторов), название учреждения.

Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. **Текст статьи** необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку: ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word (версии 1, 2, 6), и не использовать программы типа ChiWriter.

В тексте обязательна расшифровка аббревиатур-терминов; ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово "Таблица" с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи. На полях проставляют номера таблиц и рисунков против тех мест текста, где они должны быть заверстаны.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно; индексы и показатели степени печатаются или вписываются ниже или выше строки и размечаются дужками: верхние индексы и показатели степени — ∪, нижние — ∩. Штрихи должны отличаться от единицы, *a* от α, *l* от *e* и *i*, *h* от *n*, *I* прописное от *J*. В формулах и обозначениях следует разметить сходные по написанию прописные и строчные буквы, подчеркнув прописную букву двумя черточками снизу, а строчную — двумя черточками сверху. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также пуль, sin, cos, exp и т.д. размечаются на прямое начертание квадратной скобкой снизу. Греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения). Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге или в виде фотографий. Компоновка рисунков должна учитывать их размещение в пределах одной или двух колонок текста: ширина рисунка, предназначенного для одной колонки, не должна превышать 8 см, а общая высота рисунков, объединенных одной подрисуночной подписью (рис. 1, *а, б, в*), — 18 см. Соответственно максимальные размеры рисунка, предназначенного для размещения в двух колонках, составляют 16×18 см. Не перегружайте рисунки второстепенными деталями, наносите только необходимые условные обозначения, расшифровка которых дается в подписи к рисунку или в тексте. На обороте рисунка указываются его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Для сканирования без угловых искажений оси графиков на рисунках должны быть параллельны краю листа. Представленные фотоснимки должны быть четкими, контрастными, с указанием верхнего края.

При подготовке иллюстраций на компьютере используйте лазерный принтер, желательно представить в редакцию графические файлы рисунков. Допустимо применение расширений PCX, TIF, GEM, MAC, HPG, CGM, PIC; предпочтительнее использовать PCX и TIF, так как рисунки обрабатываются в графическом редакторе PhotoFinish.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий — год издания, том, номер, номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц. Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНИТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Объем списка литературы не должен превышать 5% общего объема рукописи.

Реферат к статье подается на русском и английском языках (авторы из Украины представляют также реферат на украинском языке) объемом до 0,3 с.

Редакция отсылает автору одну корректуру. Допустимы лишь те исправления, которые приводят верстку в соответствие с исходным текстом статьи. Внесение существенных изменений затрудняет работу издательства и приводит к задержке публикации статьи. Корректуру с указанием даты и подписью автора(ов) следует выслать в редакцию в течение суток с момента получения.

Материалы направлять по адресу: 310015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, редакция журнала "Проблемы криобиологии".

Матеріал, захищений авторським правом

Криоконсервированные биопрепараты на основе фетальных и эмбриональных клеток и тканей

Клеточная и тканевая терапия — метод эффективного лечебного воздействия на патологические процессы в организме.

Эмбриональные, фетальные и плацентарные клетки и ткани обладают рядом преимуществ перед традиционной тканевой терапией, поскольку методы криоконсервирования, разработанные в институте, позволяют сохранить жизнеспособность биологического материала. Хранение трансплантатов при низких температурах (–196 °С) осуществляется в криобанке с постоянным наличием материала для удовлетворения запросов клиник различного профиля. Весь биологический материал проходит проверку на бактериальную чистоту, инфицированность вирусами гепатита В и С, приобретенного иммунодефицита, краснухи, цитомегаловирусом и сифилисом, что подтверждается паспортом препарата, который прилагается к каждому имплантату и гарантирует безопасность реципиента.

Клиническое использование криоконсервированного материала подтвердило его высокую эффективность в различных областях медицины: акушерстве и гинекологии, отоларингологии, стоматологии, клинике внутренних болезней, геронтологии и гериатрии, андрологии, офтальмологии, а также в лечении хронических стрессов и коррекции иммунного статуса пациента.

Институт предлагает следующий перечень биопрепаратов для пользователей:

- ❄ Фрагменты криоконсервированной плацентарной ткани (для имплантации)
- ❄ Криоконсервированный экстракт плаценты
- ❄ Фрагменты криоконсервированного фетального тимуса (для имплантации)
- ❄ Амниотическая оболочка как покрытие
- ❄ Тестисы плода (для имплантации)
- ❄ Овариальная ткань (для имплантации)
- ❄ Фрагменты костной ткани плода — плоские и трубчатые
- ❄ Фрагменты селезенки плода (для имплантации)
- ❄ Суспензия клеток нервной ткани плода (для инъекций)
- ❄ Гемопоэтические клетки эмбриональной печени
- ❄ Эмбриональные нервные клетки
- ❄ Криоэкстракт хориона

За справками обращаться по адресу:
310015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23
Контактные телефоны: 72-10-39, 72-10-34
Факс: (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Cryopreserved Biopreparations on the Base of Fetal and Embryonic Cells and Tissues

Cellular and tissue therapy is the method of efficient treating effect on pathological processes in an organism.

Embryonic, fetal and placental cells and tissues possess some advantages in comparison with traditional tissue therapy, since the cryopreservation methods developed by us allow to preserve the viability of biological material. Transplant storage at low temperatures (–196 °C) is accomplished in the cryobank with a constant material availability for satisfaction of the requests of clinics of different profile. All biological material is checked for bacterial purity, the infectioning by syphilis, hepatitis viruses of B, C, and HIV, cytomegalovirus, virus of Rubella, that is testified by the preparation passport for each implant, and guarantees the safety for a recipient.

Clinical application cryopeserved material confirmed its high efficiency in various fields of medicine — obstetrics and gynaecology, otorhinolaryngology, dentistry, clinic of inner diseases, gerontology and geriatrics, andrology, ophtalmology as well as in treatment of chronic stresses and correction of immune status of patient.

The Institute proposes the following list of biopreparations for customers.

- ❄ Fragment of cryopreserved placental tissues (for implantation).
- ❄ Cryopreserved placental extraction.
- ❄ Fragments of cryopeserved fetal thymus (for implantation).
- ❄ Amniotic membrane as a covering material.
- ❄ Fetal testes (for implantation).
- ❄ Ovarian tissue (for implantation).
- ❄ Fragments of bone fetal tissues - flat and tubular.
- ❄ Fragments of fetus spleen (for implantation).
- ❄ Cell suspension of fetus nerve tissue (for injection).
- ❄ Hemopoietic cells of embryonic liver.
- ❄ Embryonic nerve cells.
- ❄ Chorion cryoextraction.

Contact address: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, 310015, Ukraine.
Contact phones: (0572) 721039, 721034
FAX: (0572) 720084
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

SUBSCRIPTION RENEWAL FOR 1999

You are invited to renew/start subsription for 1999. Please return your renewal instructions as soon as possible to

Subscription orders should be addressed to
Editor-in-Chief V. I. Grischenko Institute for Problems of Cryobioilogy and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
23, Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax. (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

For individual subscribers:

Please renew/start a new subscription for 1999 at the individual rate of U.S.$ 40.00 (postage included)

I am enclosing a cheque for $40.00 and cerify that subscription is for my personal use only.
Signature _____

Date _____
A remittance must accompany all orders for individual subscriptions

For institutional subscribers:

Please renew/start a new subscription for 1999 at the individual rate of U.S.$ 150.00 (postage included)

We enclose our cheque for $150.00

Cheques should be made out to INSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOILOGY AND CRYOMEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE and addressed to

a/c 4070104/001, EXIMBANK UKRAINE, Branch in Kharkov, 310005 Kharkov, Ukraine

Name and mailing address _____

_____

_____

_____

Матеріал, захищений авторським правом

Оригинал-макет подготовлен в редакции журнала
"Проблемы криобиологии"

Make-up page made in Editorial Staff
of "Problems of Cryobiology" journal

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
И. Г. Пятигорская

Scientific Editor *V. I. Lougovoy*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подп. в печ. 15. 03. 99. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 9,0. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1

1999

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

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 of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in 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., 310015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

Матеріал захищений авторським правом