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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

1
2001

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

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)
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. Mezrichka (Czechia)
H. T. Meryman (USA)
Yu. F. Pastukhov (Sankt-Petersburg)
E. N. Popov (Exec. Secretary, Kharkov)
A. W. Rowe (USA)
B. P. Sandomirsky (Kharkov)
S. A. Shalimov (Kiev)
A. S. Snurnikov (Kharkov)
S. Sumida (Japan)
A. A. Tsutsayeva (Kharkov)
T. N. Yurchenko (Kharkov)
L. Wang (Canada)
G. F. Zhegunov (Kharkov)

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: *61015, 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., 61015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

1
2001

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Бондаренко В. А., Коптелов В. А., Лежанин С. Н., Олейник О. А., Рамазанов В. В., Середа Т. П. Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды 3
Кулешова Л. Г., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений 8
Кравченко Л. П., Петренко А. Ю., Сомов А. Ю., Фуллер Б. Д. Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации 15
Родионова Н. Л., Белоус А. М., Рязанцев В. В., Петренко А. Ю. Изменение активности глутатионзависимых ферментов в ткани слизистой полости рта крыс при различных температурных воздействиях 20
Гордієнко Є. О., Гордієнко О. І., Васильченко Л. І., Коваленко І. Ф., Паніна Ю. Є. Проникність мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду в діапазоні позитивних температур 25
Гордиенко Н. А., Безуглый Н. Д., Медведовский А. В., Жерноклев Г. В., Янгс К. Р. Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определение их криорезистентности. III. Осмотический состав бластоцист свиньи 28
Бабийчук Л. А., Землянских Н. Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 35
Моисеева Н. Н., Мазур С. П., Оченашко О. В., Петренко А. Ю. Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии 42

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

Бондаренко Т. П., Луговой С. В. Влияние димексида на секретирующую способность тироцитов новорожденных поросят 48
Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Влияние условий хранения на свойства криоконсервированной и лиофилизированной культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12 52
Сандомирский Б. П., Гальченко С. Е., Гальченко Е. С. Влияние температуры и времени хранения на качество молозива коров 60

КРИОМЕДИЦИНА

Караченцев Ю. И., Лях И. А., Македонская В. А. Влияние аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы на гормональный и иммунный статус больных постоперационным гипотиреозом 65
Мошко Ю. А. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами 70
Питько В. А. Динамика биохимических показателей в плазме крови женщин с подострым сальпингоофоритом при трансплантации криоконсервированной хориальной ткани 76

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Мигунова Р. К., Тодрин А. Ф., Капрельянц А. С. Физико-математическая оценка времени замещения льда в замороженной ткани 80
Никишкова И. Н. Влияние предварительного общего умеренного охлаждения на динамику содержания биоэлементов в неокортексе и гиппокампе при обучении 3- и 6-месячных животных 82
Гулевский А. К., Грищенкова Е. А., Рязанцев В. В., Релина Л. И. Влияние холодовой акклимации на фосфолипидный состав личинок большого мучного хрущака *Tenebrio moltor* 84
Зинченко В. Д., Кадникова Н. Г., Ковальчук И. М., Грек А. М. Стерилизация оборудования для криобиологических технологий с помощью озона 86
Полевич В. В. Концепція розробки нового апарата для охолодження пива 88

This one
F4LY-HC5-BD8S

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 2000

Матеріал, захищений авторським правом

1
2001

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Bondarenko V. A., Koptelov V. A., Lezhanin S. N., Olejnik O. A., Ramazanov V. V., Sereda T. P. Dependence of Fluorescein Transport Intensity on Medium Temperature 3
Kuleshova L. G., Orlova N. G., Shpakova N. M. Antihemolytic and Transforming Activity of Amphiphilic Compounds 8
Kravchenko L. P., Peterenko A. Yu., Somov A. Yu., Fuller B. J. Respiratory Activity of Isolated Hepatocytes During Long-term Storage and Following Normothermic Incubation 15
Rodionova N. L., Belous A. M., Ryazantsev V. V., Petrenko A. Yu. Change in the Activity of Gluthathione-Dependent Enzymes in a Tissue of Mucous Membrane of Rat's Oral Cavity at Various Temperature Effects 20
Gordienko E. O., Gordienko O. I., Vasilchenko L. I., Kovalenko I. F., Panina Yu. E. Erythrocytes Membrane Permeability of Human Donor's and Cord Blood for 1,2-Propanediol and Dimethyl Sulfoxide Molecules within the Range of Positive Temperatures 25
Gordienko N. A., Bezugly N. D., Medvedovsky A. F., Zhernoklyov G. V., Youngs C. R. Some biophysical properties of sexual and embryonic porcine cells, its cryoresistance determination. III. Osmotic composition of pig blastocyst 28
Babijchuk L. A., Zemlyanskikh N. G. Optimization and Advantages of Washing-out Method for Erythrocytes Cryopreservation with Peo-1500 35
Moiseyeva N. N., Mazur S. P., Ochenashko O. V., Petrenko A. Yu. Influence of Transplantation of Cryopreserved Human Fetal Liver Cells on Regeneration and Functions of Rat Liver after Partial Hepatectomy 42

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Bondarenko T. P., Lugovoj S. V. Dimethyl Sulfoxide Effect on Thyrocyte Secreting Ability of Newborn Piglets 48
Tsutsayeva A. A., Ananyina A. E. Effect of Storage Conditions on the Properties of Cryopreserved and Lyophilized ***Streptomyces fradiae*** 25Ab12 Culture 52
Sandomirsky B. P., Galchenko S. E., Galchenko E. S. Effect of Temperature and Time of Storage on Bovine Colosrum Quality 60

CRYOMEDICINE

Karachentsev Yu. I., Lyakh I. A., Makedonskaya V. A. Allotransplantation Effect of Cryopreserved Thyroid Gland Tissue on Hormonal and Immune Status of Patients with Postoperative Hypothyrosis 65
Moshko Yu. A. Application of Cord Blood Cryopreserved Serum for Treating Women with Chronic Salpingo-Oophoritis 70
Pitko V. A. Dynamics of Biochemical Indices in Blood Plasm of Women with Subacute Salpingo-oophoritis during Transplantation of Cryopreserved Chorionic Tissue 76

BRIEF COMMUNICATIONS

Migunova R. K., Todrin A. F., Kaprelyants A. S. Physical and Mathematical Estimation of Time of Ice Substitution in a Frozen Tissue 80
Nikishkova I. N. Effect of Preliminary General Moderate Cooling on the Dynamics of Bioelements Content in Neocortex and Hyppocampus When Teaching 3- and 6-months' Animals 82
Gulevsky A. K., Grischenkova Ye. A., Ryasantsev V. V., Relina L. I. Influence of Cold Acclimation on Phospholipid Composition of Flour Beetle ***Tenebrio Molitor*** Larvae 84
Zinchenko V. D., Kadnikova N. G., Kovalchuk I. M., Grek A. M. Equipment Sterilization with Ozone for Cryobiological Technologies 86
Polevich V. V. Conception for Elaboration of New Device for Cooling of Beer 88

© 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", 2000

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

УДК 57.043: 612

UDC 57.043: 612

Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды

В. А. БОНДАРЕНКО, В. А. КОПТЕЛОВ, С. Н. ЛЕЖАНИН, О. А. ОЛЕЙНИК, В. В. РАМАЗАНОВ, Т. П. СЕРЕДА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Dependence of Fluorescein Transport Intensity on Medium Temperature

V. A. BONDARENKO, V. A. KOPTELOV, S. N. LEZHANIN, O. A. OLEJNIK, V. V. RAMAZANOV, T. P. SEREDA

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

Исследовано влияние температуры на вход в клетки различных типов (эритроциты и изолированные гепатоциты) флуоресцентного красителя флуоресцеина. Показана значительная зависимость интенсивности проникновения флуоресцеина сквозь плазматическую мембрану от температуры. Обнаружены качественные различия между процессом входа красителя в изолированных гепатоцитах и эритроцитах.

Досліджено вплив температури на вхід до клітин різних типів (ізольованих гепатоцитів та еритроцитів) флуоресцентної сполуки — флуоресцеїну. Показана значна залежність інтенсивності проникнення флуоресцеїна крізь плазматичну мембрану від температури. Виявлено якісні відмінності між процесом входу барвника в ізольованих гепатоцитах та еритроцитах.

The influence of temperature on the uptake of fluorescent dye — fluorescein in the cells of different types (erythrocytes and isolated hepatocytes) was investigated. A significant dependence of the intensity of fluorescein penetration through a plasm membrane on temperature was demonstrated. The qualitative differences between dye uptake process in isolated hepatocytes and erythrocytes were found.

В последнее время возрастает интерес к изучению транспорта органических анионов сквозь плазматическую мембрану [3, 6]. Одним из наиболее подходящих для этого объектов является флуоресцентный краситель — флуоресцеин с высоким квантовым выходом, что позволяет с большой точностью регистрировать его ничтожные (доли микромоля) концентрации.

Производные флуоресцеина находят применение в самых различных областях биологии. Флуоресцеиндиацетат — эфир, легко проникающий в клетку сквозь фосфолипидный бислой, внутри клетки гидролизуется эстеразами до свободного флуоресцеина, имеющего худшую проницаемость, что позволяет использовать его как маркер целостности плазматической мембраны. Наличие флуоресцеина в клетках можно регистрировать с помощью люминесцентного микроскопа [11] или флуоресцентного спектрофотометра [10]. Способность флуоресцеина и его производных образовывать подобные эфиры, а также присутствие в молекуле карбоксильной группы, конформация которой определяет наличие и интенсивность флуоресценции молекулы [2], позволяет использовать производное флуоресцеина (BCECF-AM) для измерения внутриклеточного *pH*. Другое производное флуо-

Recently there is an increase in the interest for studying the transport of organic anions through a plasm membrane [3, 6]. Fluorescent dye — fluorescein with a high quantum release is one of the most convenient ones for this object, that allows to record with a high accuracy its insignificant (micromole fractions) concentrations.

Fluorescein derivatives find their application in various fields of biology. Fluorescein diacetate is the ether, easily penetrating into a cell through a phospholipid bilayer, that is hydrolyzed by esterases inside of a cell up to free fluorescein, which has a worse permeability, that permits to use it as a marker of plasmatic membrane integrity. The fluorescein presence in cells can be registered by means of luminescent microscope [11] or fluorescent spectrophotometer [10]. The capability of fluorescein and its derivatives to form the similar ethers, as well as the presence in a molecule of carboxyl group, which conformation determines the presence and the intensity of the molecule fluorescence [2], allows to use the fluorescein derivative (BCECF-AM) for intracellular *pH* measuring. Another fluorescein derivative (FITC) is applied for labelling proteins, for example antibodies.

Physical and chemical properties of fluorescein allow to use it as a substrate for organic anion trans-

Матеріал, захищений авторським правом

ресцеина (FITC) применяется для мечения белков, например антител.

Физико-химические свойства флуоресцеина позволяют использовать его как субстрат для транспортной системы органических анионов, которая сильно развита в печени и транспортных эпителиях. Важной функцией печени является удаление из организма различных производных метаболизма, лекарств, токсинов и других ксенобиотиков путем экскреции их конъюгатов в желчь. Для этой цели в мембранах гепатоцитов имеются специфические белки – Oatp [7] и Mrp2 [9]. Оба этих транспортера обладают широкой субстратной специфичностью и имеют максимальное сродство к отрицательно заряженным молекулам с молекулярной массой больше 250 дальтон [8]. Тот факт, что молекула флуоресцеина соответствует этим критериям, позволяет предположить, что транспорт этого вещества осуществляется с помощью одного или обоих вышеуказанных белков. Все это дает возможность рассматривать транспорт флуоресцеина как структурно-функциональный показатель состояния клетки в различных экспериментальных условиях.

Однако предположение об участии Oatp и Mrp2 в транспорте флуоресцеина может оказаться целиком или частично ошибочным. Так, Персидским и Бэйли [10] был показан транспорт флуоресцеина в миелокариоцитах, не несущих функции секреции органических анионов. Ввиду этого необходимо исследовать данный процесс применительно к другим подобным объектам, например эритроцитам.

Одной из важнейших областей криобиологии является изучение влияния гипотермии на биологические объекты. Так, гипотермическое хранение пока что единственный метод хранения органов. В связи с этим необходимо изучить процессы, происходящие в них, на разных моделях (например, срезы ткани, изолированные и культивируемые гепатоциты) в условиях различной степени гипотермии.

Цель работы – исследовать зависимость проницаемости для флуоресцеина плазматических мембран эритроцитов человека и изолированных гепатоцитов крыс от температуры.

В работе использовали эритроциты, полученные из донорской крови II группы.

Изолированные гепатоциты выделяли ферментативным способом (с помощью коллагеназы), описанном в [5]. В эксперименте использовали крыс линии Вистар обоего пола 6–12 мес. Животное наркотизировали тиопенталом натрия, после чего вскрывали брюшную полость. В воротную вену вставляли канюлю диаметром 1 мм и закрепляли лигатурой, надсекали нижнюю полую вену и перфузировали в течение 10–15 мин при температуре 37 °С буферным раствором следующего состава (ммоль): NaCl – 160, KCl – 3,15, Na_2HPO_4 – 6,7, HEPES – 0,33; *pH* – 7,65. После этого печень удаляли из брюшной полости, зажимом передавливали верхнюю полую вену и рециркуляторно перport system, that is well developed in a liver and transport epithelia. One of the important liver functions is the removal from an organism of different derivatives of metabolism, medicines, toxins and other xenobiotics by means of their conjugates excretion in a bile. For this purpose in the membranes of hepatocytes there are Oatp [7] and Mrp2 [9] specific proteins. Both these transporters possess a wide substrate specificity and have a minimum affinity to negatively charged molecules with a higher than 250 Da molecular mass [8]. The fact that fluorescein molecule corresponds to these criteria allows to suppose, that this substance transport is realized by means of one or both the mentioned above proteins. All this gives the possibility to consider the fluorescein transport as a structural and functional index of a cell state under various experimental conditions.

However the supposition about Mrp2 and Oatp participation in fluorescein transport can occur to be completely or partially erroneous. So Persidsky and Baillie [10] demonstrated fluorescein transport in myelokariocytes, that had not the function of organic anion secretion. Due to this fact it is indispensable to investigate this process in respect to other similar objects, for example erythrocytes.

One of the most important fields of cryobiology is the study of hypothermia effect on biological objects. So, hypothermic storage is the unique method of organs' preservation. In this connection it is expedient to study the processes, occurring in them, in various models (for examples, tissue slices, isolated and cultured hepatocytes) under hypothermia conditions of different degree.

The aim of this work was to investigate the permeability dependence for fluorescein of plasmatic membranes of human erythrocytes and rat's isolated hepatocytes on the temperature.

The erythrocytes, obtained from a donor blood of the IInd group, were used in the work.

Isolated hepatocytes were obtained using an enzymatic way (by means of collagenase), described in the [5]. Wistar line rats of both sexes of 6–12 months were used in the experiment. An animal was narcotized by sodium thiopental, then an abdominal cavity was opened. A 1 mm diameter cannula was placed into a portal vein and fixed by ligature, vena cava inferior was cut and perfused within 15–20 min at the temperature of 37 °C by buffer solution of following composition (mM): NaCl – 160, KCl – 3.15, Na_2HPO_4 – 6.7, HEPES – 0.33; *pH* – 7.65. Then liver was removed from abdominal cavity, a vena cava superior was pinched by a clamp and recirculatorilly perfused during 15–20 min by the same solution, containing additionally 0.075% of $CaCl_2$ and 0.05% of collagenase.

Liver dispersion was carried-out by means of forcing through nylon in cooled Hanks solution. After being filtrated the tubes with cellular suspension were thawed at the temperature of 0 °C during 20 min.

Матеріал, захищений авторським правом

фузировали в течение 15–20 мин тем же раствором, содержащим дополнительно 0,075% $CaCl_2$ и 0,05% коллагеназы.

Диспергирование печени осуществляли продавливанием сквозь нейлон в охлажденном растворе Хенкса. После фильтрования пробирки с клеточной суспензией отстаивали при температуре 0 °С в течение 20 мин.

Затем суспензию центрифугировали в течение 3 мин при 50*g*, надосадок удаляли и дважды центрифугировали при тех же условиях в течение 1 мин для очистки суспензии. Экспресс-оценку клеточной суспензии проводили с помощью трипанового синего [4]. Жизнеспособность выделенных клеток составляла 85–90%, количество $(250–350)\cdot10^6$ клеток на 5–7 г сырого веса печени.

Для эритроцитов использовали изоосмотическую среду, содержащую 150 ммоль NaCl. Эритроциты инкубировали в данной среде в течение 1, 2, 5, 10 и 15 мин при температурах 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35, 37 и 40 °С с флуоресцеином (20 мкмоль). Осадок эритроцитов, нагруженных флуоресцеином, лизировали дистиллятом на льду в течение 5 мин, гемоглобин осаждали на льду 5 мин трихлоруксусной кислотой в конечной концентрации 3,3%, центрифугировали, *pH* надосадочной жидкости доводили до 12 и измеряли интенсивность флуоресценции (см. ниже).

Среду инкубации для изолированных гепатоцитов готовили следующим образом: к 3 мл раствора Хенкса добавляли маточный раствор флуоресцеина до конечной концентрации 100 мкмоль, после чего пробирки со средой помещали в баню с соответствующей температурой (0, 25 и 37 °С) и выдерживали 10 мин. Затем в пробирки добавляли клетки из расчета $0,75\cdot10^6$ клеток на 1 мл среды, после чего пробы инкубировали в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 и 20 мин. По истечении времени инкубации пробы отмывали тремя объемами холодного раствора Хенкса, заливали 3 мл этого же раствора, добавляли 100 мкмоль 20%-го раствора Тритона X-100 и инкубировали 20 мин до полного разрушения клеток. Флуоресценцию измеряли при помощи флуоресцентного спектрофотометра "Hitachi MPF-2a" при длине волны возбуждения 486 нм, максимуме длины волны эмиссии 517 нм [1].

На рис. 1 и 2 представлены зависимости входа флуоресцеина в эритроциты от температуры среды инкубации. Начиная с 15 °С, проницаемость мембраны для флуоресцеина резко возрастает с увеличением температуры. Кривые имеют характер, близкий к экспоненциальному, однако после достижения максимума, приблизительно к 10-й минуте, наблюдается тенденция к снижению количества флуоресцеина, аккумулировавшегося в клетках. На рис. 3 показаны аналогичные зависимости для изолированных гепатоцитов. Характер кривых сходен с таковым для эритроцитов. С ростом температуры интенсивность входа вещества

Then the suspension was centrifuged within 3 min at 50*g*, the supernatant was removed and twice centrifuged under the same conditions during 1 min for the suspension clearing. The express-evaluation of cell suspension was accomplished by means of trypane blue [4]. The viability of isolated cells made 85–90%, the number $(250–350)\cdot10^6$ per 5–7 g of liver raw weigh.

An isoosmotic medium, containing 150 mM of NaCl was used for erythrocytes. Erythrocytes were incubated in the given medium during 1, 2, 5, 10 and 15 min at the temperatures of 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 35, 37 and 40 °C with fluorescein (20 μM). The sediment of fuorescein-loaded erythrocytes was lysed by a distillate on ice during 5 min, haemoglobin was precipitated on the ice within 5 min by means of trichloroacetic acid under final concentration of 3.3%, centrifuged, pH of supernatant fluid was approached to 12 and the fluorescence intensity was measured (see below).

The incubation medium for isolated hepatocytes was prepared by such a way: to 3 ml of Hanks solution we added the stock solution of fluorescein up to a final concentration of 100 μM, after that the glasses with the medium were placed in a bath with the corresponding temperature (0, 25 and 37 °C) and kept during 10 min. Then the cells were added in to the glasses at a rate of $0.75\cdot10^6$ of cells per 1 ml of medium, after that the trials were incubated during 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 and 20 min. After the incubation time ceasing the trials were washed-out by three volumes of cold Hanks solution, one filled in 3 ml of the same solution, added 100 μM of a 20% Triton X-100 solution and incubated 20 min till a complete cell destruction. Fluorescence was measured with "Hitachi MPF-2a" spectrophotometer at the excitation wave-

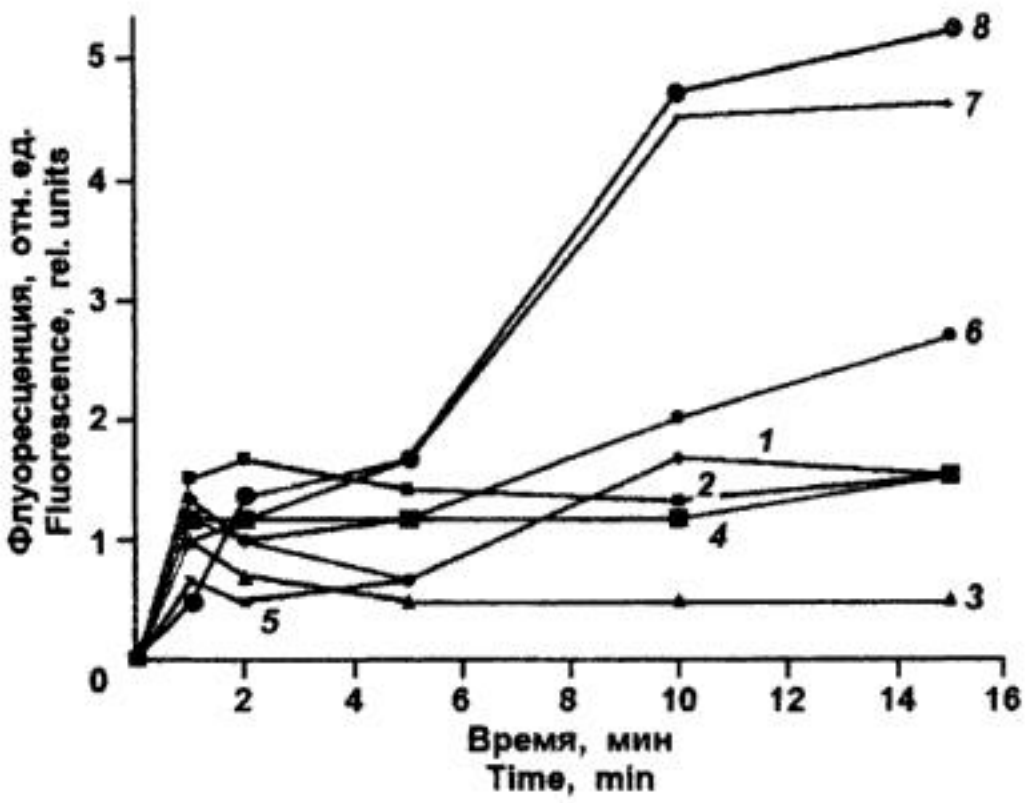


Рис. 1. Зависимость входа флуоресцеина в эритроциты человека от температуры среды инкубации, °С: *1* – 0; *2* – 3; *3* – 6; *4* – 9; *5* – 12; *6* – 15; *7* – 18; *8* – 21.

Fig. 1. Dependence of fluorescein uptake into human erythrocytes on the temperature of incubation medium, °C: *1* – 0; *2* – 3; *3* – 6; *4* – 9; *5* – 12; *6* – 15; *7* – 18; *8* – 21.

Матеріал, захищений авторським правом

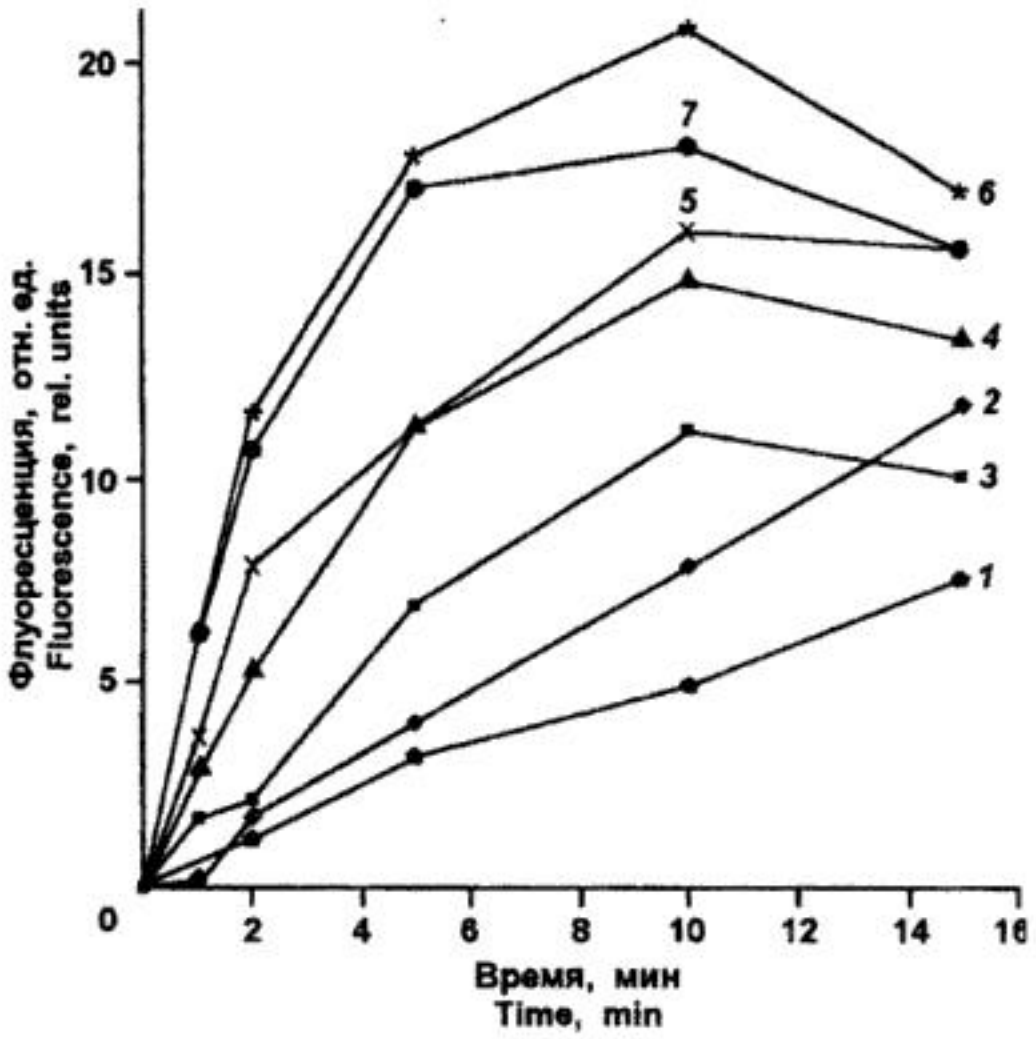


Рис. 2. Зависимость входа флуоресцеина в эритроциты человека от температуры среды инкубации, °С: *1* – 24; *2* – 27; *3* – 30; *4* – 33; *5* – 36; *6* – 39; *7* – 42.

Fig. 2. Dependence of fluorescein uptake into human erythrocytes on the temperature of incubation medium: *1* – 24; *2* – 27; *3* – 30; *4* – 33; *5* – 36; *6* – 39; *7* – 42.

резко возрастает, однако снижения количества флуоресцеина после достижения максимума не наблюдается.

Сопоставляя результаты, полученные на различных типах клеток, можно сделать некоторые обобщения. Повышение скорости входа флуоресцеина с ростом температуры характерно для обоих исследуемых типов клеток. При физиологической температуре максимум достигается одинаково в обоих случаях к 10-й минуте инкубации. Чрезвычайно сильное различие между скоростью входа флуоресцеина при 0 и 37 °С позволяет сделать вывод, что флуоресцеин проникает в клетки с помощью канала либо переносчика. Гипотеза об активном транспорте, высказанная в [10], маловероятна ввиду способности флуоресцеина как проникать внутрь клетки, так и выходить из нее, причем с сопоставимой скоростью.

Наиболее труднообъяснимым является факт уменьшения аккумуляции флуоресцеина после достижения максимума для эритроцитов. Имеются данные для культивируемых гепатоцитов крыс с подобным явлением. Однако в этом случае снижение количества аккумулированного флуоресцеина наблюдается спустя длительное время после достижения максимума (порядка 60 мин). Кроме того, условия указанного эксперимента позволяют обнаружить, что флуоресцеин не покинул клетки, а просто "исчез", что скорее всего объясняется его деградацией под действием, возможно, микросомальной системы окисления гепатоцитов. К сожалению, для эритроцитов такое объяснение неприменимо ввиду малого промежутка между выходом

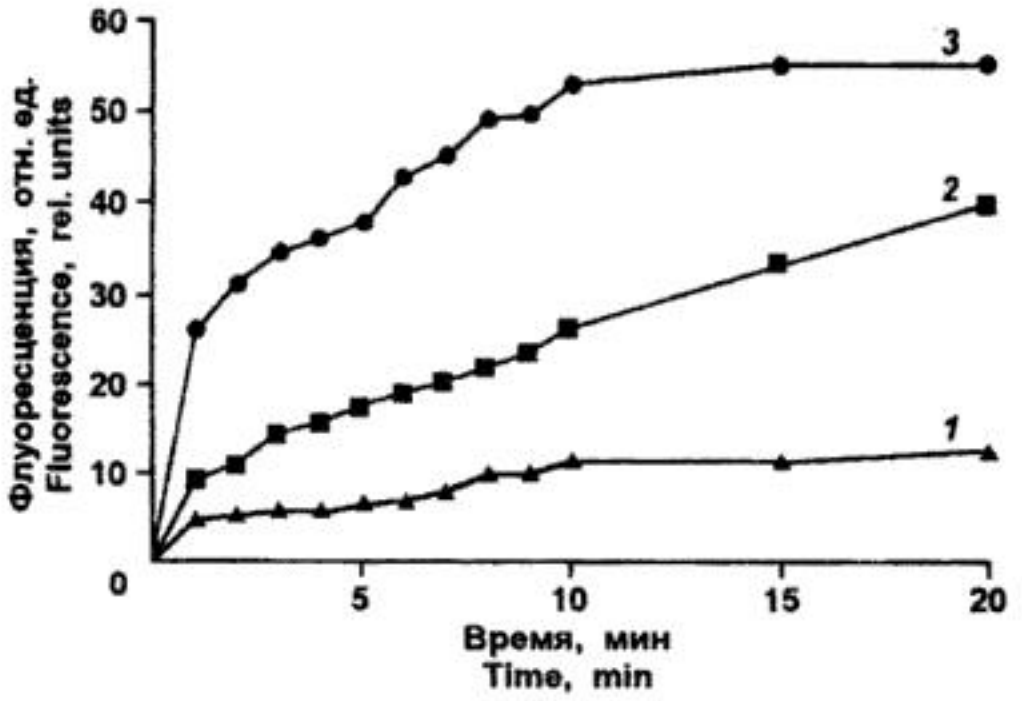


Рис. 3. Зависимость входа флуоресцеина в изолированные гепатоциты крыс от температуры среды инкубации, °С: *1* – 0; *2* – 20; *3* – 37.

Fig. 3. Dependence of fluorescein uptake into rats' isolated hepatocytes on the temperature of incubation medium: *1* – 0; *2* – 20; *3* – 37.

length of 486 nm, the maximum of emission wavelength was 517 nm [1].

The dependencies of fluorescein uptake into erythrocytes on the temperature of incubation medium are presented in Figs. 1 and 2. Beginning from 15 °C the membrane permeability for fluorescein sharply increases with temperature augmentation. The curves have the character close to an exponential one, however after reaching the maximum, approximately by the 10th minute, the tendency to a decrease in fluorescein number, being accumulated in cells, is observed. The analogous dependencies for isolated hepatocytes are demonstrated in Fig. 3. The character of curves is similar to those for erythrocytes. With an increase in temperature the intensity of substance uptake sharply augments, but a reduction of fluorescein number after reaching maximum is not observed.

Comparing the results, obtained in different types of cells, we can make some general conclusions. An increase in the rate of fluorescein uptake with the temperature augmentation is characteristic for both investigated types of cells. At a physiological temperature the maximum is reached by a similar way in both cases by the 10th minute of incubation. An extremely high difference between the rate of fluorescein uptake at 0 and 37 °C allows to conclude that fluorescein penetrates into cells via a channel or carrier. The hypothesis on an active transport, made in the [10] is hardly probable due to the capability of fluorescein both to penetrate inside of a cell and to leave it with a comparable rate.

The most hardly explained is the fact of reduction of fluorescein accumulation after reaching the maximum for erythrocytes. There are the data for cultured rat's hepatocytes with the similar phenomenon. However in this case a decrease in an accumulated fluorescein number is seen after a long time after the maximum attaining (about 60 min). Besides, the conditions of the mentioned experiment permit to reveal that fluorescein did not leave the cells, but simply

Матеріал, захищений авторським правом

соответствующей кривой на плато и отсутствия интенсивного микросомального окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеточных мембран и липопротеидов.– М.: Наука, 1989.– 172 с.
2. *Коган И. М.* Химия красителей.– М.: Госхимиздат, 1956.– 298 с.
3. *Ballatory N., Boyer J. L.* Taurine transport in skate hepatocytes I. Uptake and efflux // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 25).– 1992.– 262.– P. G445–G450.
4. *Baur H., Kasperek S., Pfaff E.* Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. Physiol. Chem.– 1975.– 356.– P. 827–838.
5. *Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C.* Research in Isolated and Cultured Hepatocytes.– London–Paris: Les Editions INSERM, 1986.– 408 p.
6. *Klein M., Martinoia E., Weissenbock G.* Transport of lucifer yellow CH into plant vacuoles: evidence for direct energization of a sulphonated substance and implications for the design of new molecular probes // FEBS Lett.– 1997.– 420.– P. 86–92.
7. *Meier P. J., Eckhardt U., Schoeder A.* Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver // Hepatology.– 1997.– 26.– P. 1667–1677.
8. *Muller M., Jansen P. L. M.* Molecular aspects of hepatobiliary transport // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 35).– 1997.– 272.– P. G1285–G1303.
9. *Paulusma C. C., Bosnia P. J., Zaman G. J. R. et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene // Science.– 1996.– 271.– P. 1126–1128.
10. *Persisdsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // Cryobiology.– 1977.– 14, № 3.– P. 322–332.
11. *Rotman B., Papermaster B. W.* Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1966.– 55.– P. 134–141.

Поступила 11.07.2000

"disappeared", that is rather explained by its degradation under the effect, apparently, of microsomal system of hepatocyte oxidation. Unfortunately, for erythrocytes such an explanation is not applicable due to a small interval between the outlet of a corresponding curve to the plateau and the absence of intensive microsomal oxidation.

REFERENCES

1. *Dobretsov G. E.* Fluorescent probes in the investigation of cellular membranes and lipoproteids.– M.: Nauka, 1989.– 172 p.
2. *Kogan I. M.* Chemistry of dyes.– M.: Goschimizdat, 1956.– 298 p.
3. *Ballatory N., Boyer J. L.* Taurine transport in skate hepatocytes I. Uptake and efflux // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 25).– 1992.– 262.– P. G445–G450.
4. *Baur H., Kasperek S., Pfaff E.* Criteria of viability of isolated liver cells // Hoppe-Seyler Ztschr. Physiol. Chem.– 1975.– 356.– P. 827–838.
5. *Guillouzo A., Guguen-Guillouzo C.* Research in Isolated and Cultured Hepatocytes.– London–Paris: Les Editions INSERM, 1986.– 408 p.
6. *Klein M., Martinoia E., Weissenbock G.* Transport of lucifer yellow CH into plant vacuoles: evidence for direct energization of a sulphonated substance and implications for the design of new molecular probes // FEBS Lett.– 1997.– 420.– P. 86–92.
7. *Meier P. J., Eckhardt U., Schoeder A.* Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver // Hepatology.– 1997.– 26.– P. 1667–1677.
8. *Muller M., Jansen P. L. M.* Molecular aspects of hepatobiliary transport // Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 35).– 1997.– 272.– P. G1285–G1303.
9. *Paulusma C. C., Bosnia P. J., Zaman G. J. R. et al.* Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene // Science.– 1996.– 271.– P. 1126–1128.
10. *Persisdsky M. D., Baillie G. S.* Fluorometric test of cell membrane integrity // Cryobiology.– 1977.– 14, № 3.– P. 322–332.
11. *Rotman B., Papermaster B. W.* Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1966.– 55.– P. 134–141.

Accepted in 11.07.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.1: 57.043: 611-018.51

UDC 577.1: 57.043: 611-018.51

Антигемолитическая и трансформирующая активность амфифильных соединений

Л. Г. КУЛЕШОВА, Н. В. ОРЛОВА, Н. М. ШПАКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Antihemolytic and Transforming Activity of Amphiphilic Compounds

L. G. KULESHOVA, N. V. ORLOVA, N. M. SHPAKOVA

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

Проведен морфологический анализ эритроцитов, находящихся в физиологическом растворе и плазме, в присутствии катионных, анионных, неионных и цвиттерионных амфифильных соединений. Несмотря на то, что морфологический ответ клеток на введение в среду амфифильных соединений различен, все исследуемые вещества проявляли высокую антигемолитическую активность (60–90%) в условиях гипертонического стресса эритроцитов.

Проведено морфологічний аналіз еритроцитів, що знаходилися у фізіологічному розчині та плазмі, в присутності катіонних, аніонних, неіонних та цвіттеріонних амфіфільних сполук. Незважаючи на те, що морфологічна відповідь клітин на введення в середовище амфіфільних сполук була різною, усі речовини, що досліджувалися, виявляли високу антигемолітичну активність (60–90%) в умовах гіпертонічного стресу еритроцитів.

Morphological analysis of the erythrocytes, being in a physiological solution and in plasm, in the presence of cationic, anionic, non-ionic and zwitterionic amphiphilic compounds has been conducted. In spite of the fact, that cell morphological response to the introduction of amphiphilic compounds into the medium varies, all studied substances manifested a high antihemolytic activity (60–90%) under hypertonic stress of erythrocytes.

Эритроциты человека при перенесении в среду, содержащую хлорид натрия в концентрации 2,6 М и выше, лизируют. Лизис клеток в растворе 4,0 М NaCl развивается в течение 2 мин и достигает уровня 90%. Предварительная обработка клеток глюкозой либо их частичная дегидратация позволяет снизить уровень гипертонического повреждения [2]. Нами показано, что гипертонический лизис существенно уменьшается и в том случае, когда в растворе 4,0 М NaCl в момент внесения клеток находятся катионные или неионные амфипатические соединения [3, 4].

Цель данной работы — изучить действие некоторых амфипатических соединений на устойчивость эритроцитов к гипертоническому стрессу и исследовать изменения формы клеток, индуцированные этими веществами. Для изучения антигемолитической активности и трансформирующей способности были выбраны представители анионных (децилсульфат натрия), катионных (хлорпромазин), неионных (додецил-β,D-мальтозид) и цвиттерионных (3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат) амфифильных соединений.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, *pH* 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2 ч при 0 °С. Все используемые в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, *pH* 7,4.

There is human erythrocytes lysis when transferring into the medium, containing sodium chloride in 2.6 M concentration and higher. Cell lysis in 4.0 M NaCl solution develops within 2 min and reaches the level of 90%. Preliminary cell treatment by glucose or their partial dehydration allows to reduce the level of hypertonic impairment [2]. We demonstrated, that hypertonic lysis significantly decreased in the case, when cationic and non-ionic amphipatic compounds were in 4.0 M NaCl solution to the moment of cell introduction [3, 4].

The aim of given work was to study the effect of some amphipatic compounds on erythrocytes' stability to hypertonic stress and investigate the changes of cell shape, induced by these substances. derivatives of anionic (sodium decyl sulphate), cationic (chlorpromazine), non-ionic (dodecyl-β,D-maltoside) and zwitterionic (3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate) amphiphilic compounds were chosen for studying antihemolytic activity and transforming capability.

Erythrocytes were obtained from the II-nd donor's group. After plasm removal the erythromass was twice washed-out by physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4) and stored as a dense sediment not more than 2 hrs under 0 °C. All used in the work media were prepared by 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4.

Hyperosmotic shock was induced by transferring erythrocytes into 4.0 M NaCl solution under given

Матеріал, захищений авторським правом

Гиперосмотический шок осуществляли путем перенесения эритроцитов в раствор 4,0 М NaCl при заданной температуре на 5 мин. Конечный гематокрит составлял 0,4%. Степень гемолиза определяли спектрофотометрически (543 нм), измеряя гемоглобин в супернатанте. Антигемолитическую активность амфифильных соединений выражали как процент снижения гемолиза по сравнению с пробой, не содержащей амфифил.

Морфологический анализ эритроцитов проводили методом световой микроскопии на микроскопе МБИ-15У с фотографической регистрацией морфологической картины крови. Реакцию клеток на введение амфифильных соединений оценивали в микропробе капли крови, которую помещали между двумя покровными стеклами и равномерно распределяли тонким слоем. При этом эритроциты находились во взвешенном состоянии, что позволяло всесторонне наблюдать за формой клетки, начиная с 30-й секунды реакции [1]. В морфологической оценке особенностей формы и поверхностной архитектоники эритроцитов применяли общепринятую классификацию, приведенную в [5].

В работе были использованы хлорпромазин (Serva), 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат и додецил-β,D-мальтозид (Calbiochem), децилсульфат натрия (НИИПАВ), реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ч.д.а.

Исследуемые соединения различны по своей химической структуре. Хлорпромазин, который является катионным амфифильным соединением, – производное фенотиазина. Класс анионных соединений представлен децилсульфатом натрия. Додецил-β,D-мальтозид и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат относятся к неионным и цвиттерионным амфифилам.

В таблице приведены концентрации амфифильных соединений, обеспечивающие максимальную защиту эритроцитов от гипертонического лизиса, и величины максимальной антигемолитической активности амфифилов. Из представленных данных видно, что в условиях гипертонического шока эритроцитов все исследуемые вещества при температуре 37 °С обладают антигемолитической активностью. Хлорпромазин и децилсульфат натрия характеризуются высоким уровнем антигемолитической активности – 80–90%, в то время как протектирующий эффект додецил-β,D-мальтозида и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната выражен в меньшей степени (около 60%). Эффективные концентрации исследуемых амфипатических соединений – это концентрации, при которых гипертонический гемолиз эритроцитов минимален, а антигемолитическая активность этих веществ – максимальна.

Следует обратить внимание, что эффективные концентрации веществ, оказывающие наиболее выраженный протектирующий эффект (хлорпромазин и децилсульфат), на 1–2 порядка выше по

temperature for 5 min. Final hematocrit made 0.4%. Hemolysis degree was detected spectrophotometrically (543 nm) by measuring hemoglobin in a supernatant. Antihemolytic activity of amphiphilic compounds was manifested as a percentage of hemolysis reduction in comparison with a sample, not containing amphiphile.

Morphological analysis of erythrocytes was carried-out by the method of light microscopy on MBI-15U microscope with photographing registration of blood morphological picture. Cell response to the introduction of amphiphilic compounds was estimated in a microprobe of blood drop, placed between two cover glasses and evenly redistributed by a thin layer. Thereat erythrocytes were in a suspended state, that allowed to observe comprehensively the cell shape, starting from the 30th second reaction [1]. In morphological estimation of shape peculiarities and surficial architecture of erythrocytes, generally accepted classification, given in the work [5] was applied.

Chlorpromazine (Serva), 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate and dodecyl-β,D-maltoside (Calbiochem), sodium decylsulphate, reagents of home productionof chemically pure and pure for analysis qualification.

Studied compounds differed on their chemical structure. Chlorpromazine, being cationic amphiphilic compound, is phenotiasine derivative. Class of anionic compounds is represented by sodium decylsulphate. Dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate are related to non-ionic and zwitterionic amphiphiles.

Concentrations of amphiphilic compounds, providing maximum erythrocytes protection from hypertonic lysis and the values of maximum antihemolytic activity of amphiphiles are presented in the table. As it is seen from the data presented, under the conditions of erythrocytes hypertonic shock all studied substances at 37 °C possess antihemolytic activity. Chlorpromazine and sodium decylsulphate are characterized by a high level of antihemolytic activity – 80–90%, at the same time protecting effect of dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate is manifested less (about 60%). Efficient concentrations of studied amphipatic compounds these are concentrations, under which a hypertonic effect of erythrocytes is minimum and antihemolytic activity of these substances is maximum.

Efficient concentrations and values of maximum antihemolytic activity in amphiphilic compounds under the conditions of erythrocytes hypertonic stress (4.0 M NaCl, 37 °C)

Substance	Efficient concentrations, μM	Antihemolytic activity, %
Sodium decylsulphate	40	84 ± 5
Chlorpromazine	120	93 ± 7
Dodecyl-β,D-maltoside	6	67 ± 9
3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate	6	60 ± 7

Матеріал, захищений авторським правом

сравнению с менее активными соединениями (додецил-β,D-мальтозид и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат).

Эффективные концентрации и величины максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений в условиях гипертонического стресса эритроцитов (4,0 М NaCl, температура 37 °С)

Вещество	Эффективные концентрации, мкМ	Антигемолитическая активность, %
Децилсульфат натрия	40	84 ± 5
Хлорпромазин	120	93 ± 7
Додецил-β,D-мальтозид	6	67 ± 9
3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат	6	60 ± 7

Общим для молекул всех изучаемых соединений является их амфифильность, обусловленная наличием в молекуле как гидрофобной, так и гидрофильной частей. Именно эта характерная особенность позволяет молекулам веществ проникать в мембрану и распределяться в ней. Об особенностях распределения свидетельствует морфологический анализ клеток, обработанных амфифильными соединениями.

На рис. 1, *а* даны контрольные эритроциты, находящиеся в физиологическом растворе, в котором большинство клеток имели слабо выраженную эхиноцитарную форму. Кренированные эритроциты представлены главным образом эхиноцитами I и II по классификации Bessis [5]. Так как отмеченный эхиноцитоз наблюдался и в том случае, когда использовали силиконизированные предметные и покровные стекла, мы полагаем, что он не обусловлен "эффектом стекла". Кренирование клеток, по-видимому, является результатом удаления белков плазмы, в частности альбумина [7], при отмывании эритроцитов физиологическим раствором.

Таким образом, предварительный морфологический анализ эритроцитов показал, что последующие исследования клеток в физиологическом растворе с использованием амфифильных соединений

It should be noted, that efficient concentrations of substances, causing the most manifested protecting effect (chlorpromazine and decylsulphate), by 1–2 times higher in comparison with less active compounds (dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate).

Amphiphilic characteristic, stipulated by the presence of both hydrophobic and hydrophilic parts in molecule is common for all studied compounds. This characteristic allows for molecules of substances to penetrate into a membrane and redistribute in it. Morphological analysis of cells, treated by amphiphilic compounds, testifies to redistribution peculiarities.

The control erythrocytes in a physiological solution, where the majority of cells has slightly manifested echinocyte shape are presented in Fig. 1, *a*. Crenated erythrocytes are manifested, mainly, by I and II types of echinocytes according to Bessis classification [5]. Echinocytosis was observed in the case, when siliconized subject and cover glasses were used in the work, thus we suppose, that it was not stipulated by a "glass effect". Cell crenation, obviously, is the result of the removal of plasm proteins, in particular, albumin [7], when washing-out the erythrocytes by a physiological solution.

Thus, preliminary morphological analysis of erythrocytes demonstrated that further cell investigations in physiological solution using amphiphilic compounds were conducted in initially crenated erythrocytes. Erythrocytes' morphological response on the introduction into physiological solution of different amphiphilic compounds is presented by microphotos (Fig. 2).

Under the effect of positively charged chlorpromazine the change of the cell shape occurred. In this case the majority of erythrocytes in the sample was manifested by stomatocytes and spherostomatocytes. Another picture was observed when using sodium decylsulphate, dodecyl-β,D-maltoside and 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate. Cell response to the introduction of anionic and non-ionic

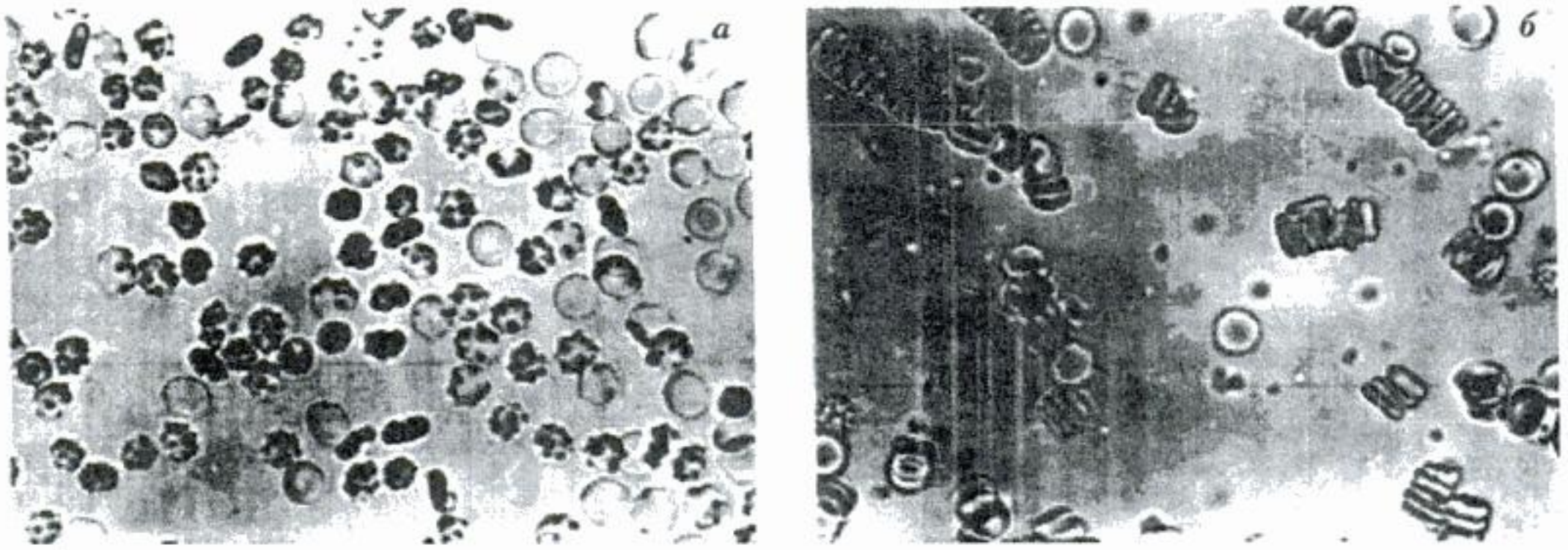


Рис. 1. Морфоэритрограмма донорской крови человека: *а* – эритроциты в физиологическом растворе; *б* – эритроциты в плазме.

Fig. 1. Morphoerythrogram of human donor's blood: *а* – erythrocytes in physiological solution; *б* – erythrocytes in plasm.

Матеріал, захищений авторським правом

проводили на исходно кренированных эритроцитах. Морфологический ответ эритроцитов на введение в физиологический раствор различных амфифильных соединений представлен микрофотографиями (рис. 2).

Под влиянием положительно заряженного хлорпромазина происходило изменение формы клеток. В этом случае большинство эритроцитов в образце представлено стоматоцитами и сферостоматоцитами. Иная картина наблюдалась при использовании децилсульфата натрия, додецил-β,D-мальтозида и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната. Реакция клеток на введение в среду анионного или неионного соединения сопровождалась образованием сфероэхиноцитов, а в присутствии 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната в образце были сферы и отдельные эхиноцитарные клетки.

Наблюдаемые морфологические особенности эритроцитов в присутствии амфифильных веществ не зависели от времени инкубации клеток (до 30 мин).

Так как вышеописанные результаты были получены на исходно кренированных клетках, мы провели морфологический анализ эритроцитов, находящихся в плазме, поскольку описанные результаты были получены на исходно кренированных клетках (рис. 1, *б*). Как видно, эритроциты цельной крови имеют дискоцитарную форму. В поле зрения видны столбики сгруппированных эритроцитов.

compound into the medium was accompanied by spheroechinocytes formation, and in the presence of 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate in the sample the spheres and separate echinocyte cells were observed.

Observed morphological peculiarities of erythrocytes in the presence of amphiphile compounds did not depend on the time of cell incubation (up to 30 min).

We have conducted morphological analysis of erythrocytes, being in a plasm, because the results, described were obtained in the initially crenated cells (Fig. 1, *b*). As it is seen, erythrocytes of the whole blood are of discocyte shape. In the vision field the columns of grouped erythrocytes are seen.

Эритроциты цельной крови в присутствии амфифильного соединения представлены на рис. 3. Как видно, в этом случае трансформация клеток наблюдается только при использовании хлорпромазина и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната в концентрациях, более высоких, чем в экспериментах с отмытыми эритроцитами. Хлорпромазин вызывает появление стоматоцитов в плазме, в то время как 3-це-

Erythrocytes of the whole blood in the presence of amphiphilic compound are presented on the Fig. 3. It is seen, that in this case the transformation of cells is observed only when using chlorpromazine and of 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate in the concentrations, higher, than in the experiments with washed-out erythrocytes. Chlorpromazine causes the appearance of stomatocytes in plasm, meanwhile 3-ce-

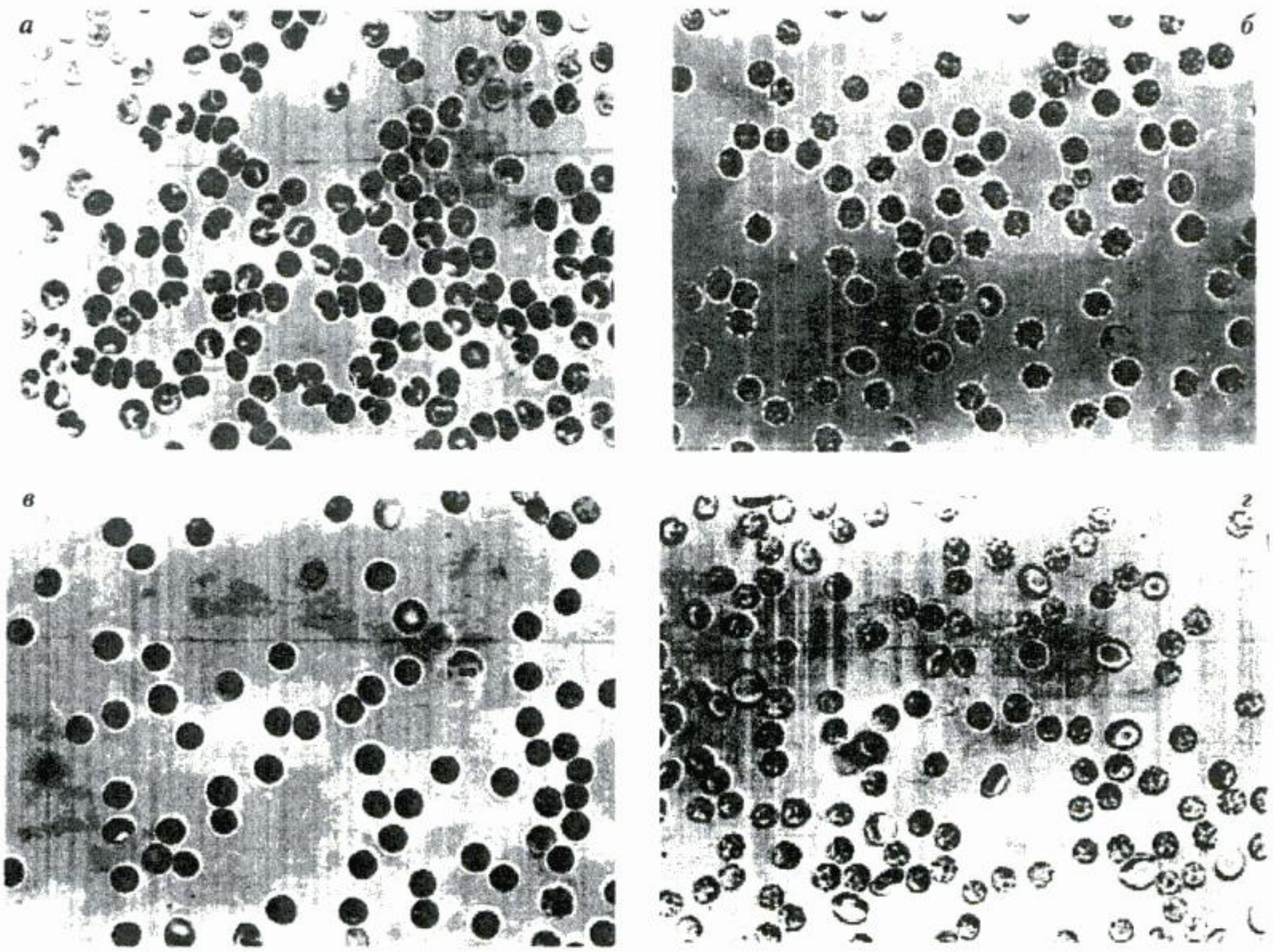


Рис. 2. Реакция отмытых эритроцитов на введение амфифильных соединений: *а* – хлорпромазина (160 мкМ); *б* – децилсульфата натрия (40 мкМ); *в* – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната (8 мкМ); *г* – додецил-β,D-мальтозида (12 мкМ).

Fig. 2. Response of washed-out erythrocytes to the introduction of amphiphilic compounds: *а* – chlorpromazine (160 μM); *б* – sodium decylsulphate (40 μM); *в* – 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate (8 μM); *г* – dodecyl-β,D-maltoside (12 μM).

Матеріал, захищений авторським правом

дящихся в плазме (рис. 1, *б*). Видно, что эритроциты цельной крови имеют дискоцитарную форму. В поле зрения хорошо видны монетные столбики эритроцитов.

На рис. 3 представлены эритроциты цельной крови в присутствии амфифильных соединений. Видно, что в этом случае трансформация клеток наблюдается только при использовании хлорпромазина и 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната в концентрациях более высоких, чем в экспериментах с отмытыми эритроцитами. Хлорпромазин вызывает появление в плазме стоматоцитов, в то время как 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат – сфероэхиноцитов.

При добавлении к цельной крови как децилсульфата натрия, так и додецилмальтозида существенных морфологических изменений эритроцитов не выявлено. Клетки сохраняют способность к формированию монетных столбиков. В образцах отмечено незначительное увеличение количества эхиноцитарных клеток по сравнению с контролем, хотя концентрации веществ были в 8–9 раз больше, чем при исследовании формы эритроцитов в физиологическом растворе.

tyldimethylammonium-1-propane sulphonate – of spheroechinocytes.

When adding both sodium decylsulphate and dodecyl maltoside to the whole blood, no significant morphological changes in erythrocytes were revealed. The cells keep a capability to the formation of grouped erythrocytes columns. A slight increase in the number of echinocyte cells in comparison with the control was noted in the samples, though the concentrations of substances were by 8–9 times higher, than when investigating erythrocytes' shape in physiological solution.

Thus, erythrocyte response to the introduction of amphiphilic compounds is determined by the medium with the cells. In a physiological solution, when the control cells were initially crenated, all studied compounds possess transforming activity. When using erythrocytes of the whole blood just cationic and zwitterionic compounds caused the changes in a cell shape.

Cell transformation is stipulated by the building-in of the substances into membrane. It should be supposed, that the molecules of these compounds were unreachable for membrane, because in the presence of dodecylmaltoside and decyl alkyl sodium sulphate erythrocytes, being in a plasm, remained to be disco-

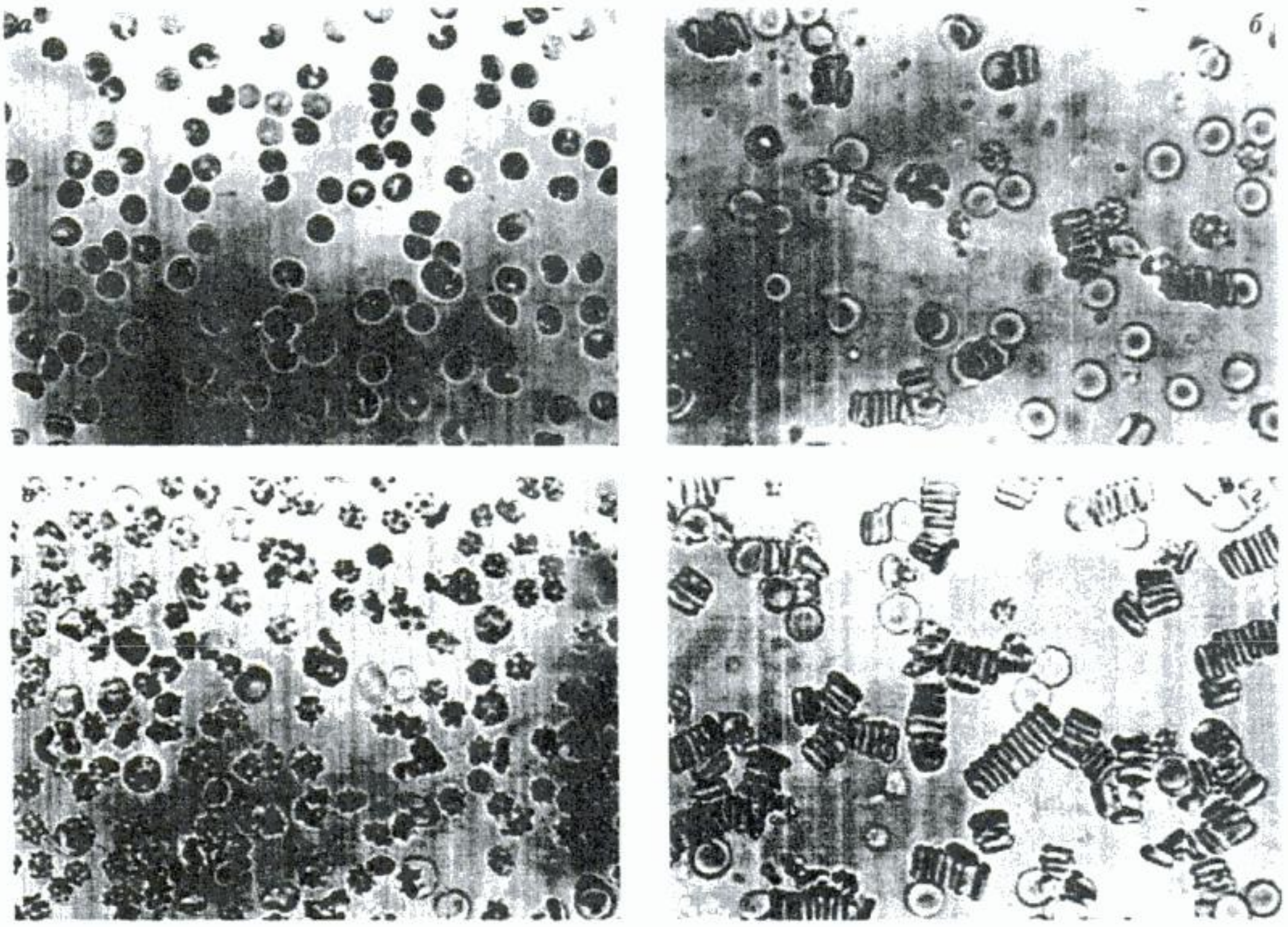


Рис. 3. Реакция эритроцитов в плазме на введение амфифильных соединений: *а* – хлорпромазина (360 мкМ); *б* – децилсульфата натрия (360 мкМ); *в* – 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфоната (40 мкМ); *г* – додецил-β,D-мальтозида (96 мкМ).

Fig 3. Erythrocytes' response to the introduction of amphiphilic compounds in plasm: *а* – chlorpromazine (360 μM); *б* – sodium decylsulphate (360 μM); *в* – 3-cetyldimethylammonium-1-propane sulphonate (40 μM); *г* – dodecyl-β,D-maltoside (96 μM).

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, ответ эритроцитов на введение амфифильных соединений определяется средой, в которой находились клетки. В физиологическом растворе, когда контрольные клетки изначально кренированы, трансформирующей активностью обладают все исследуемые соединения. При использовании эритроцитов цельной крови только катионное и цвиттеринное соединения вызвали изменение формы клеток.

Трансформация клеток обусловлена встраиванием веществ в мембрану. Так как в присутствии додецилмальтозида и децилалкил сульфата натрия эритроциты, находящиеся в плазме, оставались дискоцитами, можно предположить, что молекулы этих соединений были недоступны мембране. По-видимому, свободные белки плазмы сорбируют молекулы неионных и анионных соединений, либо белковый слой, покрывающий эритроцит, препятствует встраиванию данных веществ в мембрану.

В настоящее время для объяснения изменения формы эритроцитов под влиянием амфифильных соединений наиболее распространенной является гипотеза, предложенная Sheetz и Singer [9]. В ней липидный бислой рассматривается как структура, образованная двумя близко расположенными и сопряженными монослоями. При встраивании веществ в один из монослоев изменяется площадь этого монослоя по отношению к другому и в результате сопряжения монослоев изменяется форма клетки. Вещества, которые встраиваются во внешний монослой, приводят к трансформации клетки по типу дискоцит–эхиноцит, а вещества, молекулы которых распределяются во внутреннем монослое, вызывают появление в среде стоматоцитов.

Клетки, обработанные хлорпромазином, представляют собой стоматоциты, следовательно, молекулы данного соединения находятся во внутреннем монослое, обогащенном отрицательно заряженным фосфатидилсерином. Представители неионных, цвиттерионных и анионных амфифильных соединений приводили к появлению в среде эхиноцитов и сфероэхиноцитов, что свидетельствует об их локализации во внешнем монослое липидного бислоя. Таким образом, антигемолитической активностью обладают вещества, распределяющиеся как во внутреннем, так и в наружном монослоях липидного бислоя.

Исследуемые соединения проявляли антигемолитическую активность при гипертоническом шоке эритроцитов в том случае, когда клетки переносили в раствор, содержащий 4,0 M NaCl и амфифильное вещество. Если клетки предварительно инкубировали с амфифильными веществами, а затем подвергали действию гипертонического стресса, то антигемолитическая активность не проявлялась. Аналогичные результаты были получены финскими исследователями [6] при изучении гипотонического лизиса эритроцитов в присутствии амфифилов.

cytes. Obviously, plasm free proteins absorb the molecules of non-ionic and anionic compounds, or the protein layer, covering an erythrocyte, is an obstacle for the building-in of these proteins into the membrane.

Nowadays the hypothesis, proposed by Sheets and Signer [9], about the explanation of the change in an erythrocyte shape under the effect of amphiphilic compounds, is the most spread. Lipid bilayer in this hypothesis is considered as the structure, formed by two closely located and conjugated monolayers. When building-in the substances into one monolayer the area of this monolayer changes regarding to another one, and as the result of monolayers conjugation the cell shape changes. The substances, built-in into outer monolayer, result to cell transformation by the type of discocyte-echinocyte, and substances, molecules of those are redistributed in inner monolayer, cause the appearance of stomatocytes in the medium.

Treated by chlorpromazine cells, are stomatocytes, so, the molecules of the given compound are in an inner monolayer, enriched by negatively-charged phosphatidyl choline. Representatives of non-ionic, zwitterionic and anionic amphiphilic compounds resulted to the appearance of echinocytes and spheroechinocytes in the medium, that testifies to their localization in outer monolayer of lipid bilayer. Thus, the substances, redistributed both in inner and outer monolayers of a lipid bilayer, possessed antihemolytic activity.

Studied compounds manifested antihemolytic activity under hypertonic shock of erythrocytes in the case when the cells were transferred into the solution, containing 4.0 M NaCl and amphiphilic compound. Antihemolytic activity was not manifested, when the cells were preliminarily incubated with amphiphilic compounds, and then subjected to the effect of hypertonic stress. Similar results were obtained by Finnish investigators [6] when studying hypertonic lysis of erythrocytes in the presence of amphiphiles.

Thus, a protecting effect of amphiphilic compounds is realized in the moment of osmotic stress. The processes, related to the formation of hemolytic pore, are in the base of hypertonic damage of erythrocytes. Probably, a rapid absorption and redistribution of amphiphilic compounds in a lipid monolayer, accompanied by membrane rearrangements [8], prevents the formation of a lytic pore in an erythrocyte membrane under the conditions of hypertonic stress.

Coming from the fact, that the substances, various on the chemical structure possess a protecting activity, non-specific character of their effect can be stated.

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, защитное действие амфифильных соединений реализуется в момент осмотического стресса. В основе гипертонического повреждения эритроцитов лежат процессы, связанные с формированием гемолитической поры. Вероятно, быстрое встраивание и распределение амфифильных веществ в липидном монослое, сопровождаемые мембранными перестройками [8], предотвращают образование литической поры в эритроцитарной мембране в условиях гипертонического стресса.

Исходя из того, что протектирующей активностью обладают вещества, различные по химической структуре, можно говорить о неспецифическом характере их действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кулешова Л. Г.* Трансформация эритроцитов человека в растворах неэлектролитов ряда Н-спиртов. Часть 1.Морфологический аспект взаимодействия // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 1.– С. 9–13.
2. *Поздняков В. В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
3. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
4. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Орлова Н. В.* Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гипертоническому и холодовому шоку // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 3.– С. 10–15.
5. *Bessis M.* Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale // Red Cell Shape; Physiology, Pathology, Ultrastructure / Ed. by M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond.– Heidelberg: Springer-Verlag, 1973.– P. 1–24.
6. *Hagerstrand H., Izooma B.* Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 982, № 1.– P. 179–186.
7. *Jay A. W. V.* Geometry of the human erythrocyte. !. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J.– 1975.– 15, № 3.– P. 205–222.
8. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P. F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.

Поступила 25.07.2000

REFERENCES

1. *Kuleshova L. G.* Transformation of human erythrocytes in the solutions of non-electrolytes of H-alcohol row. Part 1. Morphological aspect of the interaction // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 1.– P. 9–13.
2. *Pozdnyakov V. V.* The effect of composition and medium osmolarity on the erythrocytes' stability to osmotic and temperature shock: Auth. Thesis abstract. PhD (biology).– Kharkov, 1989.– 16 p.
3. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A.* Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biohimiya.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
4. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Orlova N. V.* The effect of dodecyl-β, D-maltoside on the stability of preliminarily dehydrated erythrocytes to a hypertonic and a cold shock // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 3.– P. 10–15.
5. *Bessis M.* Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale // Red Cell Shape; Physiology, Pathology, Ultrastructure / Ed. by M. Bessis, R. I. Weed, P. F. Leblond.– Heidelberg: Springer-Verlag, 1973.– P. 1–24.
6. *Hagerstrand H., Izooma B.* Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 982, № 1.– P. 179–186.
7. *Jay A. W. V.* Geometry of the human erythrocyte. !. Effect of albumin on cell geometry // Biophys. J.– 1975.– 15, № 3.– P. 205–222.
8. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P. F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.

Accepted in 25.07.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.36.018.1: 615.361.014.41: 57.086.13

UDC 611.36.018.1: 615.361.014.41: 57.086.13

Дыхательная активность изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации

Л. П. КРАВЧЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО, А. Ю. СОМОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Б. Д. ФУЛЛЕР

Королевский госпиталь, отдел хирургии, Лондон

Respiratory Activity of Isolated Hepatocytes During Long-term Storage and Following Normothermic Incubation

L. P. KRAVCHENKO, A. Yu. PETERENKO, A. Yu. SOMOV

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

B. J. FULLER

University Department of Surgery, Royal Free & University College Medical School, London, United Kingdom

Представлены данные дыхательной активности изолированных гепатоцитов при длительном холодовом хранении и последующей нормотермической инкубации в минимальной солевой среде. Показано, что сахарозосодержащий раствор и раствор Университета Висконсин (UW) практически одинаково сохраняют жизнеспособность, эндогенное и стимулируемое сукцинатом дыхание гепатоцитов в течение 48 ч.

Подано дані дихальної активності ізольованих гепатоцитів при тривалому холодовому зберіганні та наступній нормотермічній інкубації. Показано, що сахарозовмісний розчин та розчин Університету Вісконсин (UW) практично однаково зберігають життєздатність, ендогенне та стимульоване сукцинатом дихання гепатоцитів протягом 48 год.

The data of respiratory activity of isolated hepatocytes during long-term storage and following normothermic incubation in minimum saline medium are presented. It is shown that sucrose-containing solution and solution of the University of Wisconsin (UW) practically in similar way preserve the viability, endogenous and succinate-stimulated respiratory of isolated hepatocytes during 48 hrs.

В последние годы значительно интенсифицировалось использование изолированных гепатоцитов человека и животных в клеточной терапии для коррекции различных форм печеночной недостаточности [9]. Показано, что данный тип клеток печени можно консервировать при –196 °С и хранить при 0 °С [2, 13]. Однако по-прежнему важным аспектом этой проблемы является создание достаточного запаса жизнеспособных клеток, проявляющих в физиологических условиях специфические функции.

При разработке метода длительного гипотермического хранения изолированных гепатоцитов главным явилось решение вопроса о подавлении осмотического набухания клеток, индуцированного холодовой ишемией, на ранних этапах [11, 19]. Оказалось, что консервирующие растворы, имеющие в своем составе непроникающие в клетку компоненты, способствуют морфофункциональной со-

Совместные исследования поддержаны грантом Wellcome Trust № 056648/Z/99/Z (Великобритания).

Recently the usage of human and animal isolated hepatocytes in cellular therapy has been intensified, for the correction of various forms of hepatic insufficiency [9]. It was shown, that given type of liver cells can be presented both at –196 °C and store at 0 °C [4, 13]. However, the creation of sufficient stock of viable cells, capable to manifest specific functions under physiological conditions, is still an important aspect of this problem.

When developing the questions of long-term hypothermic storage of isolated hepatocytes the main one was the solving of the task about the suppression of osmotic cell swelling, induced by cold ischemia, at early stages [11, 19]. Preserving solutions, comprising non-penetrating into a cell components, occurred to be contributing to morphofunctional integrity of hepatocytes at 0–4 °C. In [13, 15] the viability of isolated hepatocytes at the stages of cold storage was

Collaborative study was possible under the support of the Wellcome Trust Grant № 056648/Z/99/Z (UK).

Матеріал, захищений авторським правом

хранности гепатоцитов при 0–4 °С. В [13, 15] жизнеспособность изолированных гепатоцитов на этапах холодового хранения оценивали с помощью следующих показателей: окраска трипановым синим, выход во внеклеточную среду цитозольных ферментов, содержание внутриклеточного АТФ, уровень процессов перекисного окисления липидов. В условиях консервирования особый интерес представляет оценка эндогенного дыхания (ЭД) жизнеспособных гепатоцитов. Анализ литературы по этому вопросу показал отсутствие систематических исследований этого показателя при хранении изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии. Полученные результаты достаточно противоречивы, равно как неоднозначны применяемые приемы оценки этого параметра [1, 15, 16].

Цель работы — изучение дыхательной активности изолированных гепатоцитов крыс после различных сроков холодового хранения и последующей нормотермической инкубации.

Выделение клеток осуществляли по методу, разработанному в ИПКиК НАН Украины [5]. Гипотермическое хранение образцов проводили в баклечатках (с концентрацией клеток $3–5 \cdot 10^6$ /мл, объем 5 мл) при температуре 4 °С в течение 45 мин (контроль), 24-х и 48-и часов. В работе исследовали эффективность двух консервирующих растворов: сахарозосодержащего (ССР) — разработка ИПКиК НАН Украины [6] — и модифицированного раствора Университета Висконсин (UW) [12]. Инкубацию деконсервированных клеток проводили в минимальной солевой среде Кребс–Рингер (бикарбонат, *pH* 7,4) в течение 60 мин при температуре 37 °С. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию витальным красителем (трипановый синий). ЭД измеряли полярографически в ячейке 1 мл при 36 °С, используя закрытый платиновый кислородный электрод Кларка (инкубационная среда — раствор Кребс–Рингер-фосфат, *pH* 7,4). Интактность плазматической мембраны гепатоцитов оценивали по "сукцинатному тесту" — концентрация сукцината 2 мМ. Полученные данные обрабатывали с использованием программы ORIGIN, достоверность изменений определяли по методу Стьюдента–Фишера.

Известно, что в основе защитного действия гипотермии лежит снижение функциональной активности клеток, ведущее к торможению обменных процессов и снижению потребления кислорода. Показано, что уже при 5 °С потребление кислорода клетками не превышает 5% от нормы [10]. Этим обстоятельством следует объяснить тот факт, что гипотермия пролонгирует сроки допустимой ишемии клеток и тканей. Дыхание является интегральным показателем, который отражает, с одной стороны, активность окислительного фосфорилирования митохондрий, а с другой — энергетические затраты клетки, связанные с синтезом биомолекул, секреторной функцией и поддержанием ионного градиента [1, 3]. Поэтому сохранение дыхания в

estimated using the following indices (staining by trypan blue, release into extracellular medium of cytosole enzymes, content of intracellular ATP, lipid peroxidation processes). The evaluation of endogenous respiration (ER) is of a special interest as one of the criteria of hepatocytes viability under conditions of preservation. Literature analysis on this question showed the absence of systematic investigations of this parameter when storing isolated hepatocytes under hypothermic conditions. Obtained results are quite contradictory as well as not uniform the ways of this parameter estimation [1, 15, 16].

The aim of this work was to study a respiratory activity of isolated rat's hepatocytes after different terms of cold storage and following normothermic incubation.

Isolation of cells was accomplished by the method developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [5]. Hypothermic storage of the samples was carried out in the vials (cell concentration was $3–5 \cdot 10^6$/ml, 5 ml volume) under conditions of domestic refrigerator at 4 °C for 45 min (control), 24 and 48 hrs. In the work we investigated the efficiency of two preserving solutions — sucrose-based solutions (SBS) — the development of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [3] and the solution of the University of Wisconsin (UW) — modification [12]. Incubation of thawed cells was conducted in minimum saline medium of Krebs–Ringer (bicarbonate, *pH* 7.4) within 60 min at 37 °C. Cell viability was estimated on the exclusion of vital dye (trypan blue). ER was measured polarographically in 1 ml well at 36 °C, using closed Clark's platinum oxygen electrode (incubation medium was Krebs–Ringer-phosphate solution, *pH* 7.4). The intactness of plasmatic membrane of hepatocytes was estimated also by a succinate test — succinate concentration is 2 mM. Obtained data were processes using ORIGIN software, statistical significance was determined with Student–Fisher method.

In the base of protective effect of hypothermia there is a reduction of functional activity of cells, resulting in the inhibition of metabolic processes and a decrease in oxygen consumption. It was shown, that even at 5 °C an oxygen consumption by cells did not exceed 5% from the norm [10]. This explains the fact, that hypothermia prolongs the terms of admissible cell and tissue ischemia. Respiration is an integral parameter reflecting from one hand the activity of oxidative phosphorylation of mitochondria, and from another — energetic cell expenditures, connected to the synthesis of biomolecules, secretory function and keeping ionic gradient [1, 3]. So, preservation of this index in isolated hepatocytes under cold storage is essential for proper functioning of cells after transplantation.

Initial suspension of freshly isolated hepatocytes contained not less than 87–95% of cells excluding a

Матеріал, захищений авторським правом

изолированных гепатоцитах при холодовом хранении является необходимым условием полноценного функционирования клеток после трансплантации.

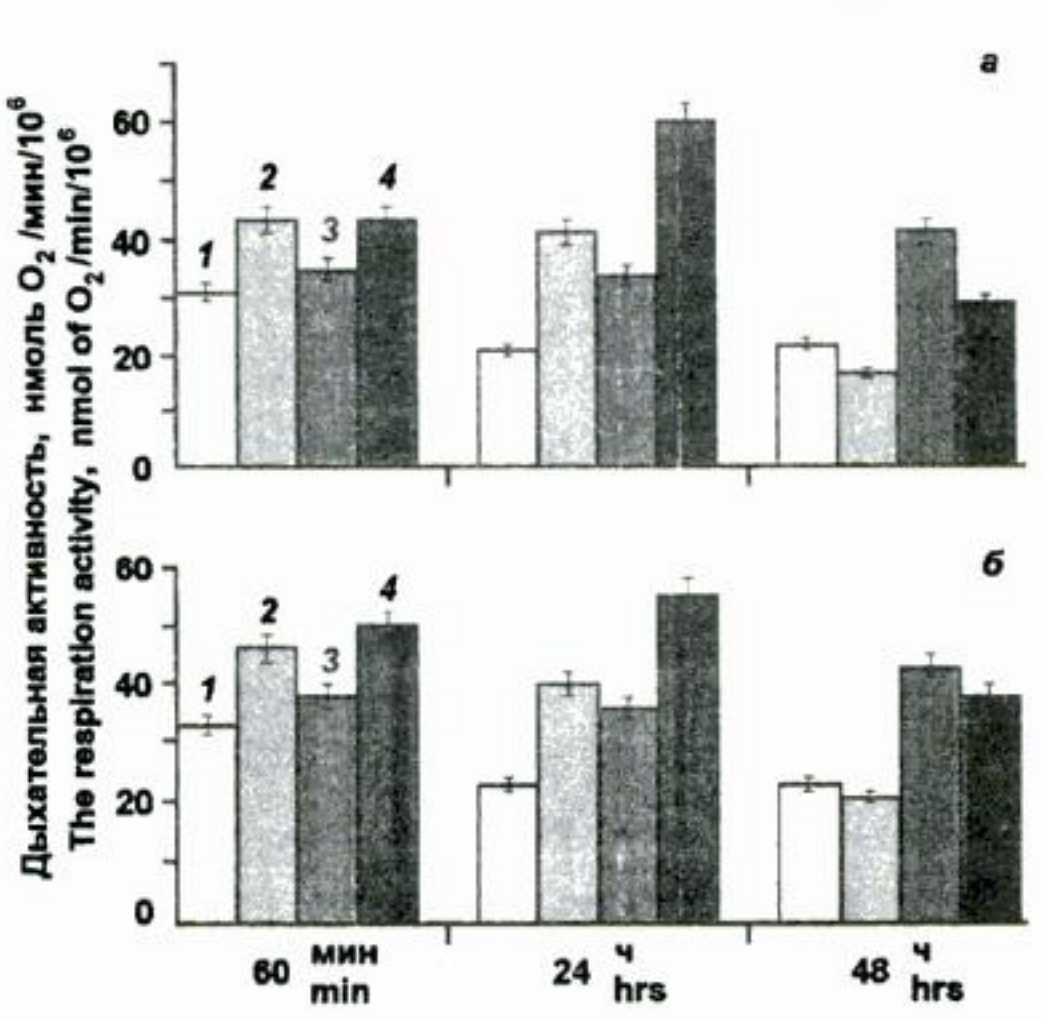
Исходная суспензия свежевыделенных гепатоцитов содержала не менее 87–95% клеток, исключающих витальный краситель. Общепринято использовать в работе суспензию, содержащую не более 15% клеток, прокрашенных трипановым синим [1, 7, 8]. Из рисунка видно, что свежевыделенные гепатоциты имели высокий уровень ЭД, которое увеличивалось в период 60-минутной нормотермической инкубации и согласуется с данными [4, 17, 18]. Повышение эндогенного дыхания изолированных гепатоцитов после нормотермической инкубации можно рассматривать как показатель высокого оборота АТФ для различных синтетических реакций и активного транспорта. Показатели дыхания в присутствии сукцината на этапе выделения клеток свидетельствуют о незначительной стимуляции дыхания (1,12), что согласуется с данными литературы. Сукцинат практически не проникает через интактную плазматическую мембрану при наличии в суспензии не менее 90% жизнеспособных клеток, окисляющих эндогенные субстраты. В таких условиях коэффициент стимуляции дыхания сукцинатом (1 мМ) не должен быть более 1,2–1,4 [14]. Не обнаружено изменения стимуляции дыхания гепатоцитов в постинкубационный период.

В первые сутки хранения изолированных гепатоцитов в условиях холодовой ишемии морфологические исследования выявили наличие в суспензии 85 и 83% клеток, исключающих трипановый синий (CCP и UW соответственно). Дыхательная активность изолированных гепатоцитов в обоих растворах достоверно снижалась и составляла 75% от уровня контроля. Коэффициент стимуляции дыхания сукцинатом увеличился для обоих образцов. Нормотермическая инкубация клеток свидетельствовала о равнозначном и достоверном увеличении дыхательной активности (почти в два раза) после хранения в этих растворах. Стимуляция дыхания деконсервированных клеток в присутствии сукцината была практически равной для обоих растворов (1,5).

После 48 ч хранения образцов при 4 °С жизнеспособность клеток по исключению витального красителя составила 78% для CCP и 76% для UW. При этом жизнеспособные клетки сохраняли присущую им округлую форму и желто-зеленый цвет, что характерно для свежевыделенных клеток. Дыхательная активность деконсервированных клеток оставалась высокой. Однако коэффициент стимуляции дыхания сукцинатом повышался в сравнении с предыдущим периодом хранения и составлял 1,9 для обоих образцов. Отмеченная стимуляция дыхания гепатоцитов сукцинатом, по-видимому, была за счет клеток с нарушенной мембраной, так как в процессе нормотермической инкубации количество прокрашенных клеток практически не изме-

vital dye. It is very common to use in the work the suspension, containing not more, than 15% of stained by trypan blue cells [1, 7, 8]. The Figure shows that freshly isolated hepatocytes possessed a high level of ER, which statistically and significantly increased in the period of 60min normothermic incubation. Similar levels of ER for freshly isolated cells were demonstrated in the works [4, 17, 18]. A rise in ER of isolated hepatocytes after normothermic incubation can be considered as an index of a high turnover of ATP for various synthetic reactions and active transport. Respiration indices in the presence of succinate at the stage of cell isolation testify to a slight respiration stimulation (1.12), that confirms literature data. It was shown, that succinate did not practically penetrate through intact plasmatic membrane in the presence in the suspension of not less than 90% of viable cells, oxidating endogenous substances coefficient of respiration stimulation by succinate (1 mM) under such conditions might not be more than 1.2–1.4 [14]. No growth in respiration stimulation of hepatocytes was also noted in post-incubation period.

Within the first 24 hrs of storage of isolated hepatocytes under conditions of cold ischemia morphological investigations revealed the presence in the suspension of 85% and 83% of cells, excluding trypane blue (SBS and UW, correspondingly). Respiratory activity of isolated hepatocytes in both solutions statistically and significantly decreased and made 75% of the control level. The coefficient of respiration stimulation by



Показатели дыхательной активности изолированных гепатоцитов при холодовом хранении в CCP (*а*) и UW (*б*) (4 °С) и последующей нормотермической инкубации (37 °С): *1* – ЭД клеток; *2* – ЭД клеток после инкубации; *3* – ЭД, стимулируемое сукцинатом; *4* – ЭД, стимулируемое сукцинатом, после инкубации.

Indices of the respiration activity of isolated hepatocytes under cold storage in SBS (*а*) and UW (*б*) at 4 °C and further normothermic incubation at 37 °C: *1* – ER of the cells; *2* – ER of the cells after incubation; *3* – ER stimulated by succinate; *4* – ER stimulated by succinate after incubation.

Матеріал, захищений авторським правом

нялось (CCP, UW). Не отмечено также изменение скорости ЭД, которая на этапе нормотермической инкубации сохранялась в пределах значений хранения. Проведенная оценка проницаемости плазматической мембраны гепатоцитов по сукцинатному тесту свидетельствовала о незначительном снижении этого показателя.

Анализ полученных результатов показывает, что изученные консервирующие растворы (CCP, UW) практически одинаково сохраняют жизнеспособность и дыхательную активность изолированных гепатоцитов в условиях холодовой ишемии (4 °C), что связано с особенностями композиционного состава этих растворов. Известно, что непроникающие в клетку компоненты (ионной и неионной природы) обеспечивают защиту клеток от осмотических повреждений, индуцированных гипотермией [11, 19]. Представленные консервирующие растворы имеют в своем составе непроникающие в клетку компоненты ионной (лактобионат) и неионной (сахароза) природы, что в равной степени обеспечивает защиту клеток от осмотических повреждений, индуцированных гипотермией. В связи с этим мы получили высокую сохранность клеток при длительном холодовом хранении (до 48 ч). В то же время определенный процент клеток печени со временем подвергался осмотическому воздействию, в результате чего снижалась жизнеспособность как после холодового хранения, так и последующей нормотермической инкубации.

Наиболее характерным признаком повреждения мембраны гепатоцитов является снижение скорости ЭД. В наших экспериментах суспензия клеток, которая была полностью проницаема для витального красителя, характеризовалась очень низким ЭД (4,0 нмоль O_2/мин/10^6). Коэффициент стимуляции ЭД поврежденных клеток составлял 8,0. Снижение эндогенного дыхания изолированных гепатоцитов на этапе 24-часового холодового хранения, видимо, связано только с увеличением числа поврежденных клеток, поскольку оставшиеся жизнеспособные клетки при инкубации в минимальной солевой среде при 37 °C значительно повышали дыхательную активность. Это отражает относительную стабильность энергетического метаболизма в целом клеток, сохранивших нативную морфологию. Тот факт, что нормотермическая инкубация деконсервированных клеток не усиливала ЭД гепатоцитов после 48 ч холодового хранения свидетельствует о начинающихся изменениях в энергетическом метаболизме клеток. Известно, что 80% ЭД изолированных гепатоцитов, поддерживаемого окислением эндогенных субстратов, осуществляется главным образом за счет активности дыхательной цепи митохондрий [1]. В связи с этим отмеченное изменение, видимо, связано с истощением внутриклеточного пула эндогенных субстратов. Возможно, замена минимального солевого раствора для инкубации на сложную питательную

succinate increased for both samples. Normothermic incubation of cells testified to a similar and statistically true increase in respiratory activity (almost twice) after storage in studied solutions. Respiration stimulation of frozen-thawed cells in succinate presence was practically equal for both studied solutions and made the value of 1.5.

After 48 hrs storage of samples at 4 °C cell viability on the excluding of a vital dye made 78% for SBS and 76% for UW. Thereat the cells, excluding trypane blue, kept typical for them roundish shape and yellow-green colour, that is characteristic for freshly isolated cells. Respiratory activity of rewarmed cells remained high. However, coefficient of the respiration stimulation by succinate increased in comparison with the previous period of storage and made the value of 1.9, equal for both samples. Noted respiration stimulation of hepatocytes by a succinate, obviously, occurred due to the cells with damaged membrane, because within the course of normothermic incubation the number of stained cells practically did not change (SBS, UW). No change in the rate of ER, which at the stage of normothermic incubation was kept within the limits of storage values, was also observed. Provided estimation of permeability of plasmatic membrane of hepatocytes according to succinate test testified to a slight decrease of this index.

The analysis of obtained results testifies to the fact, that studied preserving solutions (SBS, UW) practically in similar way preserve the viability and respiratory activity of isolated hepatocytes under cold ischemia conditions (4 °C). It is related to the peculiarities of composition of studied solutions. It is known, that non-penetrating into a cell components (of ionic and non-ionic origin), provide the protection of cells from osmotic damages, induced by hypothermia [11, 19]. Presented preserving solutions have in their content non-penetrating into a cell components of ionic (lactobionate) and non-ionic (sucrose) origin, that in equal extent provides the protection of cells from osmotic damages, induced by hypothermia. In this connection we received a significant preservation of cell viability during long term cold storage (up to 48 hrs). At the same time a certain percentage of liver cells with the time was subjected to osmotic effect, in result of that the viability decreased both after cold storage and following normothermic incubation.

Reduction of ER is the most characteristic feature of hepatocyte membrane damage. In our experiments cell suspension, which was completely permeable for vital dye, was characterised by very low ER (4.0 nmol of O_2/min/10^6). ER stimulation coefficient for damaged cells in given case made 8.0. Decrease in ER of isolated hepatocytes at the stage of 24 hrs' cold storage, probably related only to an increase in the number of damaged cells, because survived viable cells during incubation in minimum saline medium at 37 °C considerable exceeded this index. This situation reflects a relative stability of energetic metabolism in the whole and preservation of all energy-consuming metabolic processes of cells, kept native morphology. The fact, that normothermic incubation of rewarmed cells did not strength ER of hepatocytes after 48hrs' cold storage testifies to starting changes in energetic metabolism. It is known that 80% of ER of isolated hepatocytes, supported with oxidation of endogenous

Матеріал, захищений авторським правом

среду будет способствовать повышению дыхательной активности деконсервированных клеток после 48 ч холодового хранения. Не исключено, что при этом могут иметь место нарушения структурных звеньев дыхательной цепи клеток [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гепатоцит*: функционально-метаболические свойства / Под ред. Л. Д. Лукьяновой.– М.: Наука, 1985.– 270 с.
2. *Петренко А. Ю.* Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.– Харьков, 1993.– 31 с.
3. *Скулачев В. П.* Аккумуляция энергии в клетке.– М.: Наука, 1969.– 440 с.
4. *Тощаков В. Ю., Морозова Т. И., Боровик И. Н., Онищенко Н. А.* Влияние криоконсервации на энергетическое состояние изолированных гепатоцитов // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем.– Харьков, 1989.– С. 86–91.
5. *Пат. України* № 14080. С12 № 5/00. Спосіб здобуття ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко. Заяв. 20.07.89. Опубл. 25.04.97. Бюл. № 2.
6. *Пат. України* № 16946. С12 № 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко. Заяв. 20.02.89. Опубл. 29.08.97. Бюл. № 4.
7. *Berry M. N., Edwards A. M., Barrit G. J.* Isolated hepatocytes: Preparation, Properties and Applications.– Amsterdam: Elsevier, 1991.– 510 p.
8. *Berry M. N., Farrington C., Gay S. et al.* Isolation, characterization and use of hepatocytes.– Amsterdam: Elsevier, 1983.– P. 7–10.
9. *Fuller B.* Transplantation of isolated hepatocytes // J. Hepatology.– 1988.– 7, № 3.– P. 368–376.
10. *Fuller B.* Storage of cells and tissues at hypothermia for clinical use // Symposia of the Society for Experimental Biology / Eds. by K. Bowler and B. Fuller.– 1987.– P. 341–362.
11. *Green C. J., Pegg D. E.* The effect of variation in electrolyte composition and osmolality of solutions for infusion and hypothermic storage of kidneys // Organ preservation. II.– Edinburgh: Churchill Livingstone Press, 1979.– P. 86–101.
12. *Jemieson N.* Liver preservation: historical review of preservation techniques // Procurement, preservation and allocation of vascularized organs.– Kluwer Academic Publishers, 1997.– P. 159–167.
13. *Kravchenko L. P. , Belous A. M., Shanina I. V.* Long-term storage of isolated liver cells at hypothermia // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 3.– P. 135–144.
14. *Letko G. A.* A quick test for intactness of hepatocytes // Acta Biol. Med. Germ.– 1978.– 37.– P. 663–665.
15. *Mack J. E., Kerr J. A., Ureugdenhil P. K. et al.* Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes // Cryobiology.– 1991.– 28.– P. 1–7.
16. *Matsuda H., Yagi T., Matsuoka J. et al.* Subzero non-freezing storage of isolated rat hepatocytes in University of Wisconsin solution // Transplantation.– 1998.– 67, № 1.– P. 186–191.
17. *Pang J., Zalezki J., Kauffman F.* Action of selected hepatotoxicans on freshly isolated hepatocytes and cryopreserved rat hepatocytes // Cryobiology.– 1996.– 33.– P. 226–235.
18. *Petrenko A., Sukach A.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes // Analytical biochemistry.– 1991.– 194.– P. 326–329.
19. *Southard J., Van Gulik T., Ametani V., Vreugdenhil P.* Important components of the UW solution // Transplantation.– 1990.– 49, № 2.– P. 251–257.

Поступила 05.12.2000

substrates is mainly accomplished due to the activity of respiratory chain of mitochondria [1]. In this connection found change perhaps first of all is related to the exhaustion of intracellular pool of endogenous substrates. Probably, the change of minimum saline for incubation to complete nutritive medium will contribute to an increase of respiratory activity of rewarmed cells after 48 hrs' cold storage. It is not excluded, that in this case the impairments of structural links of respiratory chain of cells can occur, that was noted in the work [16].

REFERENCES

1. *Hepatocyte*: functional and metabolic properties / Ed. by L. D. Lukyanova.– M.: Nauka, 1985.– 270 p.
2. *Petrenko A.Yu.* Energetic state and metabolism of xenobiotics in isolated hepatocytes depending on cells' conditions of accomplishment and cryopreservation: Authors thesis abstract for Doctor's degree obtaining.– Kharkov, 1993.– 31 p.
3. *Skulachev V. P.* Accumulation of energy in a cell.– M.: Nauka, 1969.– 440 p.
4. *Toschakov V. Yu., Morozova T. I., Borovik I. N., Onischenko N. A.* Cryopreservation effect on the energetic state of isolated hepatocytes // Biochemical aspects of the cryodamage and cryoprotection of cellular systems.– Kharkov, 1989.– P. 86–91.
5. *Patent of the Ukraine* № 14080. C12 № 5/00. The way of obtaining of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. N. Andrienko, O. A. Semenchenko. Manif. 20.07.89. Publ. 25.04.97. Bul. № 2.
6. *Patent of the Ukraine* № 16946. The medium for hypothermia storage of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. N. Andrienko, O. A. Semenchenko. Manif. 20.02.89. Publ. 29.08.97. Bul. № 4.
7. *Berry M. N., Edwards A. M., Barrit G. J.* Isolated hepatocytes: Preparation, Properties and Applications.– Amsterdam: Elsevier, 1991.– 510 p.
8. *Berry M. N., Farrington C., Gay S. et al.* Isolation, characterization and use of hepatocytes.– Amsterdam: Elsevier, 1983.– P. 7–10.
9. *Fuller B.* Transplantation off isolated hepatocytes // J. Hepatology.– 1988.– 7, № 3.– P. 368–376.
10. *Fuller B.* Storage of cells and tissues at hypothermia for clinical use // Symposia of the Society for Experimental Biology / Eds. by K. Bowler and B. Fuller.– 1987.– P. 341–362.
11. *Green C. J., Pegg D. E.* The effect of variation in electrolyte composition and osmolality of solutions for infusion and hypothermic storage of kidneys // Organ preservation. II.– Edinburgh: Churchill Livingstone Press, 1979.– P. 86–101.
12. *Jemieson N.* Liver preservation: historical review of preservation techniques // Procurement, preservation and allocation of vascularized organs.– Kluwer Academic Publishers, 1997.– P. 159–167.
13. *Kravchenko L. P. , Belous A. M., Shanina I. V.* Long-term storage of isolated liver cells at hypothermia // Cryo-Lett.– 1994.– 15, № 3.– P. 135–144.
14. *Letko G. A.* A quick test for intactness of hepatocytes // Acta Biol. Med. Germ.– 1978.– 37.– P. 663–665.
15. *Mack J. E., Kerr J. A., Ureugdenhil P. K. et al.* Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes // Cryobiology.– 1991.– 28.– P. 1–7.
16. *Matsuda H., Yagi T., Matsuoka J. et al.* Subzero non-freezing storage of isolated rat hepatocytes in University of Wisconsin solution // Transplantation.– 1998.– 67, № 1.– P. 186–191.
17. *Pang J., Zalezki J., Kauffman F.* Action of selected hepatotoxicans on freshly isolated hepatocytes and cryopreserved rat hepatocytes // Cryobiology.– 1996.– 33.– P. 226–235.
18. *Petrenko A., Sukach A.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes // Analytical biochemistry.– 1991.– 194.– P. 326–329.
19. *Southard J., Van Gulik T., Ametani V., Vreugdenhil P.* Important components of the UW solution // Transplantation.– 1990.– 49, № 2.– P. 251–257.

Accepted in 05.12.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.15: 57.043.085.1

UDC 577.15: 57.043.085.1

Изменение активности глутатионзависимых ферментов в ткани слизистой полости рта крыс при различных температурных воздействиях

Н. Л. РОДИОНОВА, А. М. БЕЛОУС, В. В. РЯЗАНЦЕВ, А. Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Change in the Activity of Gluthathione-Dependent Enzymes in a Tissue of Mucous Membrane of Rat's Oral Cavity at Various Temperature Effects

N. L. RODIONOVA, A. M. BELOUS, V. V. RYAZANTSEV, A. Yu. PETRENKO

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

Проведено исследование ферментативной антиоксидантной (АО) системы гомогенатов ткани слизистой полости рта крыс при различных температурных воздействиях (криодеструкция, диатермокоагуляция, их объединение). Состояние ферментативной АО системы оценивали по изменению активностей глутатионредуктазы (GSH-R) и глутатионпероксидазы (GSH-Po) в различные сроки после деструкции. Установлено, что активность глутатионсодержащих ферментов изменяется подобным образом при всех видах воздействий, хотя динамика изменений различна. Полученные результаты свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи между изменением активностей ферментов системы глутатиона и уровнем пролиферативных пластических процессов после всех исследуемых видов деструкции тканей. При криовоздействии течение регенерации более благоприятно, активность ферментов снижается в меньшей степени и восстанавливается быстрее, т.е. уровень активации защитной антиокислительной системы выше.

Проведено дослідження ферментативної антиоксидантної (АО) системи гомогенатів тканин слизистої ротової порожнини щурів при різних температурних впливах (кріодеструкція, діатермокоагуляція та їх поєднання). Стан ферментативної АО системи оцінювали за зміною активностей глутатіонредуктази (GSH-R) та глутатіонпероксидази (GSH-Po) у різні терміни після деструкції. Встановлено, що активність ферментів системи глутатіону змінюється подібно при всіх видах впливів, але динаміка цих змін відрізняється. Отримані результати свідчать про існування тісного взаємозв'язку між зміною активностей ферментів системи глутатіону та рівнем проліферативних процесів після всіх досліджуваних видів деструкції тканин. Слід віддати перевагу перебігу регенерації після кріодеструкції, коли активність ферментів знижується в меньшій мірі та скоріше відновлюється, тобто рівень активації захисної антиокислювальної системи вище.

The study of enzymatic antioxidative (AO) system of tissue homogenates of rats' oral cavity mucous membrane under various temperature effects (cryodestruction, diathermocoagulation, their combination) was carried-out. The state of enzymatic AO-system was estimated by the change in the activities of gluthathione-reductase (GSH-R) and gluthathione-peroxidase (GSH-Po) at different terms after destruction. It was established that the activity of gluthathine-containing enzymes changed in the similar way under all types of effects, although the dynamics of changes was different.

Изучение процессов морфогенеза заживления ран, образующихся при разных экстремальных температурных воздействиях, имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Известно, что после криовоздействия регенерация протекает более благоприятно по сравнению с другими видами травм (диатермокоагуляцией, механической травмой и т. д.)[3, 4, 6]. Предполагается, что важную роль в заживлении ран играют свободнорадикальные процессы, в основном связанные с перекисным окислением липидов (ПОЛ) [2, 13].

Интенсивность ПОЛ в клетке контролируется наряду со структурными антиоксидантами и антиоксидантной глутатионзависимой системой [2, 7, 11], которая включает ферменты: глутатионпероксидазу (GSH-Po), участвующую в гидролизе органических гидроперекисей; глутатионтрансферазу, утилизирующую вторичные продукты ПОЛ — альдегиды, глутатионредуктазу (GSH-R), катализирующую реакцию восстановления окисленного

The study of morphogenesis processes of healing of the wounds resulted from various extreme temperature effects, is of both theoretical and practical significance. It is known, that the regeneration after cryoeffect proceeds more favourably in comparison with traumas of other kind (diathermocoagulation, mechanical trauma et al.) [3, 4, 6]. It is assumed, that significant role in wounds healing is played by free radical processes, connected mainly to lipid peroxidation (LPO) [2, 13].

The LPO intensity in cell is controlled along with structural antioxidants by antioxidant gluthathione-dependent system [2, 7, 11], which includes the number of enzymes: gluthathione-peroxidase (GSH-Po) participating in hydrolysis of organic hydroperoxides; gluthathione-transpherrase scavenging secondary LPO products — the aldehydes; gluthathione-reductase (GSH-R) catalisating the NADPH-depended reaction of reduction of oxidised gluthathione (GSSG) to GSH. The mentioned group of enzymes prevents an

Матеріал, захищений авторським правом

глутатиона (GSSG) до GSH в $НАДФН_2$-зависимой реакции. Названная группа ферментов предотвращает избыточное образование активных форм кислорода и участвует в нерадикальном разложении перекисей липидов [2, 5]. Оценка активности глутатионзависимых ферментов является необходимой при изучении механизмов свободнорадикального окисления, поскольку эти системы создают антиокислительный ингибирующий барьер на пути процессов ПОЛ в клетках [2, 9].

Цель данного исследования — изучение активности ферментов системы глутатиона (GSH-Po и GSH-R) в гомогенате ткани слизистой полости рта крыс на различных сроках регенерации после локальной криодеструкции, диатермокоагуляции и диатермокоагуляции с предварительной криообработкой.

Исследование проводили на 40 белых крысах-самцах линии Вистар весом 200–250 г после введения им внутрибрюшинно 0,3 мл тиопентала натрия и наступления наркоза. Животные были разделены на 4 группы по 10 в каждой:

в первой группе животным проводили локальную криодеструкцию слизистой оболочки щеки криотерапевтическим инструментом КАС-01 на расстоянии 2–3 мм от поверхности, игла № 0625. Диаметр зоны обморожения составил 5–7 мм при глубине деструкции в пределах слизистой оболочки полости рта (методика разработана проф. Никитиным В. А.) [4];

во второй группе в тех же условиях с помощью стоматологического диатермокоагулятора проводили локальную диатермокоагуляцию;

в третьей группе в тех же условиях применяли комбинированный метод: предварительная криообработка слизистой оболочки полости рта, а затем — диатермокоагуляция [6];

четвертая группа являлась контрольной.

Для биохимических исследований динамики процессов регенерации животных выводили из эксперимента на 1-, 3-, 10- и 21-е сутки. Участки поражения диаметром 1,0×1,0 см в пределах видимо здоровых тканей иссекали, гомогенизировали в холодном фосфатном буфере *pH* 7,4 (с добавлением ингибитора протеаз PMSF — фенилметилсульфонилфлуорид) с помощью ручного стеклянного гомогенизатора.

Для определения активности глутатионпероксидазы была использована методика Моина В. М. [9], основанная на оценке убыли субстрата (восстановленный глутатион) в процессе пероксидазной реакции. Температура инкубации 37 °С. Экстинкцию измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 412 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Активность глутатионредуктазы определяли по методу Панченко Л. Ф. [5], основанному на измерении скорости окисления восстановленного $НАДФН_2$ в процессе реакции. Скорость реакции регистрировали на двулучевом спектрофотометре "Specord UV-

abundant formation of the oxygen active forms and participates in non-radical decomposition of lipid peroxides [2, 5]. The evaluation of gluthathione-dependent enzymes when studying the LP processes in cell is necessary for explaining the mechanism of free-radical processes, since these systems create the antioxidant inhibiting barrier to the LP processes in cells [2, 9].

The aim of this investigation is to study the activity of gluthathione system enzymes (GSH-Po and GSH-R) in tissue homogenate of mucous membrane of rat's oral cavity at various stages of regeneration after local cryodestruction, diathermocoagulation and diathermocoagulation with preliminary cryoeffect.

The investigation was carried-out in 40 Wistar male rats with weight 200–250 g after intraperitoneal injection of 0.3 ml of sodium thiopental and the narcosis beginning. The animals were divided into 4 groups ($n = 10$ in each group):

in the first group the local cryoeffect was carried-out on the cheek mucous membrane using the CAS-01 cryotherapeutical device, in the 2–3 mm distance from a surface, with the № 0625 needle. The frostbite zone diameter was 5–7 mm with the destruction depth being within the ranges of oral cavity mucous membrane (the method was elaborated by Prof. Nikitin V. A.) [4];

in the second group the local diathermocoagulation was carried-out under the same conditions using the stomatological diathermocoagulator;

in the third group the combined effect of mucous membrane of oral cavity under the same conditions was carried-out (preliminary cryoeffect of a mucous membrane and subsequent diathermocoagulation);

the fourth group was the control one.

For biochemical investigations of regeneration processes dynamics the animals were taken-out from the experiment by the 1st, 3rd, 10th and 21st day. The affected sites of 1.0×1.0 cm diameter within visually observed healthy tissues were dissected, homogenised in a cold phosphate buffer *pH* 7.4 (with adding the protease inhibitor PMSF — phenylmethylsulphonylphluoride) using the glass manual homogeniser. For the gluthathione-peroxidase activity determination we used the method of Moin V. F. [9], based on the estimation of substrate (reduced gluthathione) diminution in the peroxidase reaction. The incubation temperature was 37 °C. The extinction was measured with spectrophotometer SF-16 at 412 nm using the well with 1 cm optical path.

The activity of gluthathione-reductase was determined with Panchenko's L. F. method [5], based on the measurement of reduced $NADPH_2$ oxidation rate in reaction process. The reaction rate was recorded with two-beam spectrophotometer "Specord UV-VIS" (Germany) in the well with agitation and 1 cm's layer thickness, at 340 nm and temperature of 25 °C.

According to obtained results (Fig. 1) the activity of GSH-R within 1st day after cryoeffect (corresponding to the traumatic inflammation phase) was statis-

Матеріал, захищений авторським правом

VIS" (Германия) в кювете с перемешиванием и толщиной слоя 1 см при 340 нм и температуре 25 °С.

Согласно полученным нами данным (рис. 1) активность GSH-R в первые сутки после криовоздействия (соответствующие фазе травматического воспаления) достоверно ($p < 0{,}001$) снижалась почти в 1,6 раза по отношению к контролю. Затем, начиная с 3-х суток, соответствующих началу образования грануляционной ткани и пролиферативным процессам в базальном слое эпителия, она нормализовалась. Активность GSH-Po (рис. 2) также снижалась через сутки после криовоздействия ($p < 0{,}001$), а ее восстановление наблюдали к 3-м суткам. Изменение активности GSH-Po было выражено в меньшей степени, чем GSH-R.

В первые сутки термокоагуляция слизистой приводила примерно к такому же снижению активности GSH-R, как и криовоздействие, однако активность фермента восстанавливалась медленнее и к 21-м суткам она все еще не достигала исходного уровня. Изменение активности GSH-Po при термокоагуляции сходно с изменением активности GSH-R, но в меньшей степени. К 21-м суткам активность GSH-Po восстанавливалась.

Известно (по данным морфологического исследования аналогичного материала [12]), что при диатермокоагуляции наблюдается замедление процессов регенерации тканей по сравнению с криодеструкцией (фаза альтерации удлиняется, фаза пролиферативного воспаления соответствует 7–8-м суткам, а не 3–4-м, как при криовоздействии). Можно предположить, что замедление темпов восстановления ферментативной активности при диатермокоагуляции связано с удлинением сроков регенерации ткани при данном виде воздействия.

tically ($p < 0.001$) reduced by about 1.6 times in respect of the control group. Later, starting from the 3rd day corresponding to the beginning of the granulational tissue formation and proliferative processes in the epithelial basal layer, it normalised. The GSH-Po activity (Fig. 2) also decreases in 24 hrs after the cryoeffect ($p < 0.001$), and its reduction was observed to the 3rd day. The change in the GSH-Po activity was less than the one for GSH-R.

The thermocoagulation of mucous membrane resulted within 24 hrs to the GSH-R activity decrease similar to cryoeffect, but the enzyme activity reduced more slowly, and by the 21st day it did not yet reach the initial level. The change in the GSH-Po activity at the thermocoagulation is similar to GSH-R activity change, but in lesser degree. By the 21st day the activity of GSH-Po reduced.

It is known (due to morphological investigation of the similar material [12]), that at the thermocoagulation the delay in tissue regeneration processes in comparison with cryodestruction is observed (the alteration phase is prolonged; the proliferative inflammation phase corresponds to the 7–8th days, instead of the 3–4th days as at cryodestruction). It is possible to assume, that the slowing of enzymatic activity reduction rate at the thermocoagulation is connected to the prolongation of tissue regeneration terms at the effect of this kind.

In the 3rd group the dynamics of enzymatic activity change was similar to the changes after thermocoagulation. However the enzymatic activity decreases in a higher degree, its reduction rate was expressed more poorly and to the 21st day it still remained reduced in comparison to the control group. It can be explained, apparently, with deeper destruction of mucous membrane tissue after application of combined cryo- and thermoeffect, protective properties suppression and fall of biological tissue reparative capabilities [6].

Apparently the triggering mechanism of decrease of the enzymatic activity in oral cavity mucous membrane regenerate is the trauma, causing the develop-

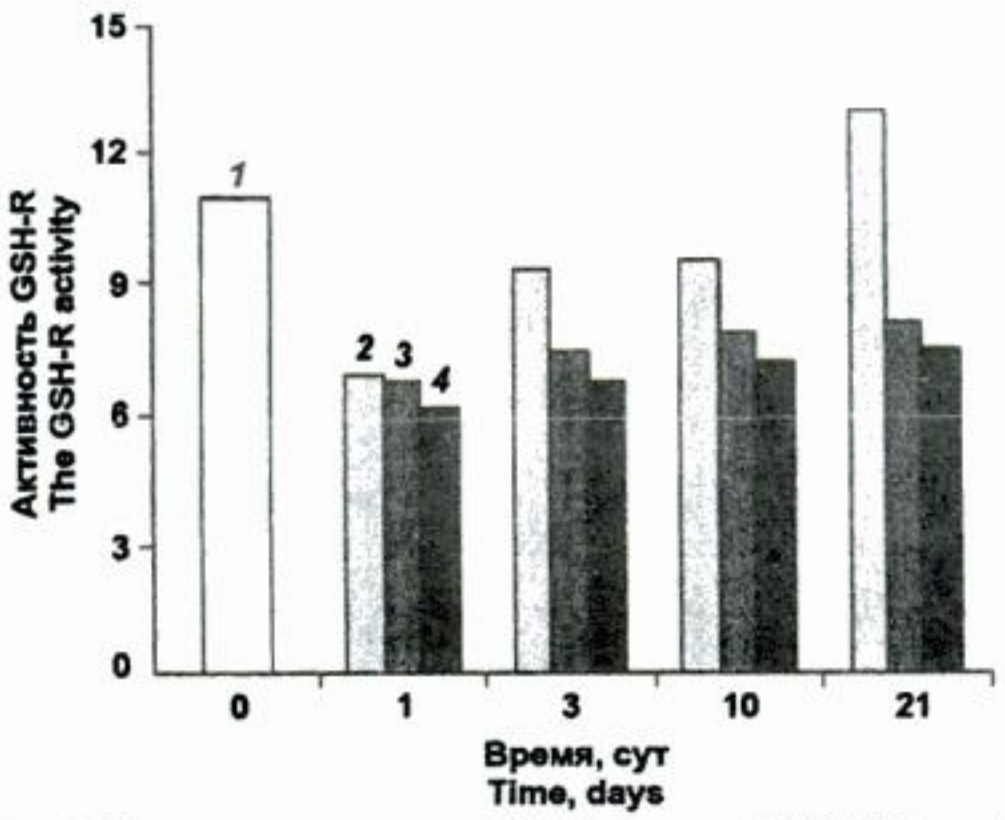


Рис. 1. Изменение активности GSH-R (мкмоль НАДФН/г·мин) в гомогенате слизистой полости рта: *1* – контроль; *2* – при криодеструкции; *3* – термокоагуляции; *4* – комбинированном воздействии.

Fig. 1. The change in the GSH-R activity (μM of NADPH/g·min) in oral mucous membrane homogenate: *1* – the control group; *2* – under the cryodestruction; *3* – under the thermocoagulation; *4* – under the combined effect.

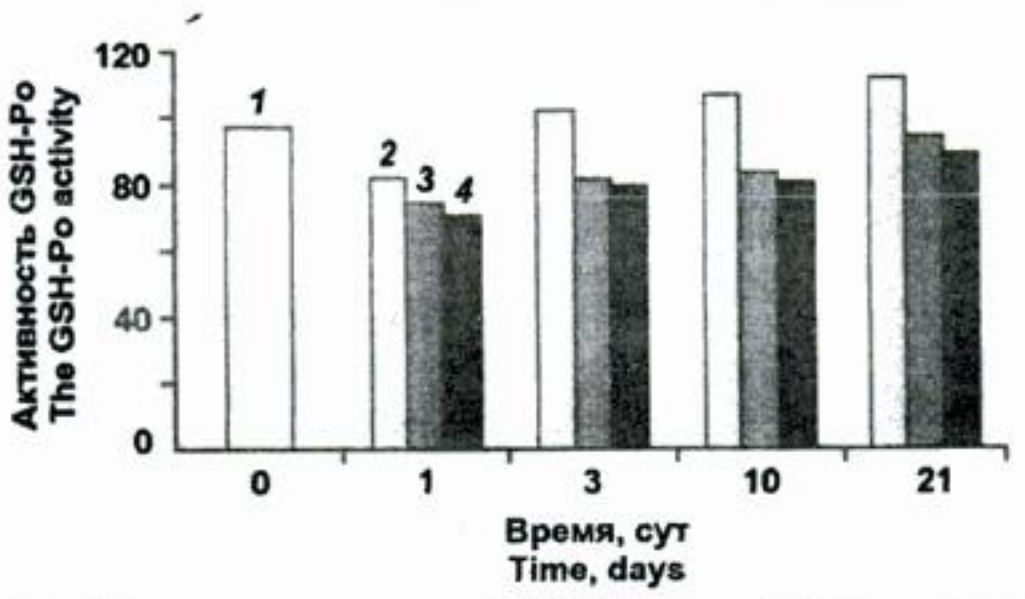


Рис. 2. Изменение активности GSH-Po (мкмоль GSH/г·мин при 37 °С) в гомогенате слизистой полости рта: *1* – контроль; *2* – при криодеструкции; *3* – термокоагуляции; *4* – комбинированном воздействии.

Fig. 2. The change in the GSH-Po activity (μM of GSH/g·min) in oral mucous membrane homogenate: *1* – the control group; *2* – under the cryodestruction; *3* – under the thermocoagulation; *4* – under the combined effect.

Матеріал, захищений авторським правом

У животных 3-й группы динамика изменения активности ферментов была сходна с изменениями после термокоагуляции. Однако активность ферментов снижалась в большей степени, темпы ее восстановления были выражены слабее и к 21-м суткам она все еще оставалась сниженной по отношению к контролю. Это можно объяснить, по-видимому, более глубокой деструкцией ткани слизистой после применения сочетанного крио- и термовоздействия, угнетением защитных свойств и понижением репаративных возможностей биоткани [6].

Очевидно, пусковым механизмом снижения активности ферментов в регенерате слизистой оболочки полости рта в первые сутки после различных видов деструкции ткани является сама травма, вызывающая развитие местной воспалительной реакции. Посттравматические процессы в тканях приводят к разрушению части клеток ткани и соответственно к потере белковых молекул ферментов и их субстратов.

Нами было показано [10], что в ранние сроки после различных видов воздействий накапливаются продукты ПОЛ (диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид), а перекиси липидов могут непосредственно воздействовать на каталитические центры фермента и выступать в роли ингибиторов ферментативной активности [2].

В прогрессивной фазе регенерации активность ферментов постепенно увеличивалась (с различной интенсивностью при разных видах деструкции), что можно связать с пролиферационными процессами в ткани слизистой и синтезом ферментов *de novo*.

Видно, что при всех видах воздействий активность глутатионзависимых ферментов изменяется, хотя динамика изменений различна. Причем при криовоздействии активность ферментов снижается в меньшей степени и восстанавливается быстрее.

Механизмы взаимодействия глутатионзависимых ферментов и окисления липидов в клетках пока окончательно не выяснены. Учитывая, что глутатионпероксидаза — основной фермент, утилизирующий перекись водорода и токсичные продукты ПОЛ — гидроперекиси липидов с прекращением лавинообразной цепной реакции [2, 9, 13], можно предположить, что при криообработке она обеспечивает более высокую утилизацию гидроперекисей, перекиси водорода, препятствует образованию агрессивного водород-радикала.

Так как глутатионредуктаза является основным ферментом, генерирующим восстановленный глутатион для глутатионзависимой АО системы [2, 5, 13], то при снижении ее активности пул восстановленного глутатиона в регрессивной фазе регенерации либо может истощаться, либо может нарушаться его синтез, что в конечном счете проявляется в виде активации процессов ПОЛ. Следовательно, при термообработке и комбинированном воздействии процессы ПОЛ протекают активнее, в основ-

ment of local inflammatory responce. The tissue post-traumatic processes result in the destruction of a part of tissue cells and accordingly in the loss of protein molecules of enzymes and their substrates.

We showed [10] that at early terms after the effect of various kinds the LPO products (dien conjugates and malone dialdehyde) are accumulated, and the lipid peroxides can immediately affect the enzyme catalytic sites and can act as enzymatic activity inhibitors [2].

In the progressive regeneration phase the enzymatic activity was gradually increased (with various intensity at the destruction of various kind), that can be connected to proliferative processes in mucous membrane tissue and to de novo enzyme synthesis.

It is obvious, that under the effect of all kinds the gluthathione-dependent enzymes activity changes, although the dynamics of the changes is various. In addition under the cryoeffect the enzymatic activity decreases lesser and reduces more rapidly.

The mechanisms of interaction of gluthathione-dependent enzymes and lipid oxidation in cells are not completely clear. Taking into account that gluthathione-peroxidase is the basic enzyme that scavenges the hydrogen peroxide and LPO toxic products — the lipid hydroperoxides with the ceasing of avalanche chain reaction [2, 9, 13], it can be assumed that under the cryoeffect it provides higher scavenging of hydroperoxides, hydrogen peroxide and prevents an aggressive hydrogen-radical formation.

Since the gluthathione-reductase is the basic enzyme, generating the reduced gluthathione for the gluthathione-dependent AO-system, it can be assumed either the reduced gluthathione pool in the regeneration regressive phase can exhaust or reduced gluthathione synthesis impairs, that results finally to LPO processes activation. Consequently, under the thermoeffect and the combined effect the LPO processes proceeds more actively, basically because of inability of the AO-system enzymes to inactivate the toxic products of free radical lipid oxidation.

Obtained results testify to the existence of a tight dependence of the accumulation of LPO toxic products in mucous membrane tissues at inflammation and gluthathione-dependent AO-system activity, and their common effect on proliferative plastic processes rate.

Besides, the statistically reliable dependence ($p < 0.001$) of gluthathione-dependent AO-system enzymes activity and wound process phases at the tissue destruction of various kinds is noted.

Thus, the estimation of the AO-system efficiency helps to obtain the information about the depth and degree of pathological process expression and to prove the evidence of application of medications, containing antioxidative substances, which accelerate the tissue reparation processes.

Матеріал, захищений авторським правом

ном из-за неспособности ферментов АО системы инактивировать токсичные продукты свободнорадикального окисления липидов.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи накопления токсичных продуктов ПОЛ в тканях слизистой при воспалении и активности глутатионзависимой АО системы, а также их совместного влияния на уровень пролиферативных пластических процессов.

Кроме того, отмечается достоверная зависимость ($p < 0{,}001$) между активностью ферментов глутатионзависимой АО системы и фазами раневого процесса при различных видах деструкции ткани.

Таким образом, оценка эффективности АО системы помогает получить информацию о глубине и степени выраженности патологического процесса и обосновать показания к использованию лекарственных средств, включающих противоокислительные вещества, которые ускоряют репаративные процессы в тканях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамова Ж. И., Оксенглендер Г. И.* Человек и противоокислительные вещества.– Л.: Наука, 1985.– 230 с.
2. *Белоус А. М., Бондаренко В. А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 256 с.
3. *Белоус А. М.* Проблемы регенерации тканей при местном криовоздействии // Пробл. криобиологии.– 1992.– № 1.– С. 14–18.
4. *Веркин Б. И., Никитин В. А., Божко К. В. и др.* Низкие температуры в стоматологии.– Киев: Наук. думка, 1990.– 272 с.
5. *Герасимов Я. М., Панченко Л. Ф.* Методика определения глутатионредуктазы // Фармакол. и токсикол.– 1975.– 83, № 3.– С. 331–337.
6. *Данилевский Н. Ф., Грохольский А. П.* Применение низких и высоких температур в стоматологии.– Киев: Здоров'я, 1990.– 166 с.
7. *Козлова И. В., Иванов В. Н.* Влияние селена на процессы СРО в регенерате кости после перелома // Патологическая физиология и экспериментальная терапия.– 1997.– № 2.– С. 35–37.
8. *Левицкий А. П., Коваленко А. Ф. и др.* Ферменты в диагностике и лечении заболеваний слюнных желез.– Душанбе: Ирфон, 1991.– 205 с.
9. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.– 1986.– № 12.– С. 724–727.
10. *Родионова Н. Л., Белоус А. М., Петренко А. Ю.* Процессы ПОЛ в оценке регенерации тканей слизистой полости рта крыс после локальной криодеструкции // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 15–20.
11. *Сандомирский Б. П., Исаев Ю. А., Волина В. В.* Холодовое лечение ожогов.– Киев: Наук. думка, 1981.– 102 с.
12. *Сирота О. Н.* Структурно-морфологические и биохимические изменения слизистой оболочки полости рта после криодеструкции и диатермокоагуляции предраковых заболеваний: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Полтава, 1992.– 19 с.
13. *Buege L. A., Aust St. D.* Microsomal lipid peroxidation // Methods Enzimol.– 1978.– № 52.– P. 302–310.

Поступила 16.01.2001

REFERENCES

1. *Abramova Zh. I., Oksenglender G. I.* Human being and antioxidative substances.– L.: Nauka, 1985.– 230 p.
2. *Belous A. M., Bondarenko V. A.* Structural changes of biological membranes under cooling.– Kiev: Nauk. Dumka, 1982.– 256 p.
3. *Belous A. M.* Problems of tissue regeneration under local cryoeffect // Problems of Cryobiology.– 1992.– № 1.– P. 14–18.
4. *Verkin B. I., Nikitin V. A., Bozhko K. V. et al.* Low temperatures in stomathology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1992.– 272 p.
5. *Gerasimov Ya. M., Panchenko L. F.* Methods of gluthathione determination // Farmakol. i toksikol.– 1975.– 83, № 3.– P. 331–337.
6. *Danilevskiy N. F., Grokholskiy A. P.* The application of low and high temperatures in stomathology.– Kiev: Zdorovja, 1990.– 166 p.
7. *Kozlova I. V., Ivanov V. N.* Effect of selenium on the free radical oxidation processes in bone regenerate after fracture // Patologicheskaya fiziologija i eksperimentalnaya terapiya.– 1997.– № 2.– P. 35–37.
8. *Levitsky A. P., Kovalenko A. F. et al.* Enzymes in salivary gland diagnosis and treatment.– Dushanbe: Irfon, 1991.– 205 p.
9. *Moin V. M.* Simple and specific determination method of gluthathione-peroxidase in erythrocytes // Lab. Delo.– 1986.– № 12.– P. 724–727.
10. *Rodionova N. L., Belous A. M., Petrenko A. Yu.* The LPO processes in estimation of rats' oral cavity mucous membrane tissues regeneration after local cryodestruction // Problems of cryobiology.– 2000.– № 3.– P. 15–20.
11. *Sandomirsky B. P., Isayev Yu. A., Volina V. V.* Cold treatment of burns.– Kiev: Nauk. Dumka, 1981.– 102 p.
12. *Sirota O. N.* Structural, morphological and biochemical changes in oral cavity mucous membrane after cryodestruction and diathermocoagulation of precancer diseases: Author's thesis abstract ... Cand. med. sci.– Poltava, 1992.– 19 p.
13. *Buege L. A., Aust St. D.* Microsomal lipid peroxidation // Methods Enzimol.– 1978.– № 52.– P. 302–310.

Accepted in 16.01.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.352.4: 611.018.51

UDC 577.352.4: 611.018.51

Проникність мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду в діапазоні позитивних температур

Є. О. ГОРДІЄНКО, О. І. ГОРДІЄНКО, Л. І. ВАСИЛЬЧЕНКО, І. Ф. КОВАЛЕНКО, Ю. Є. ПАНІНА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Erythrocytes Membrane Permeability of Human Donor's and Cord Blood for 1,2-Propanediol and Dimethyl Sulfoxide Molecules within the Range of Positive Temperatures

E. O. GORDIENKO, O. I. GORDIENKO, L. I. VASILCHENKO, I. F. KOVALENKO, Yu. E. PANINA

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

Визначено коефіцієнти проникності мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини в діапазоні позитивних температур для двох кріопротекторів (1,2-ПД і ДМСО), які швидко проникають у ці клітини, та розраховано енергії активації процесу трансмембранного переносу цих речовин.

Определены коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов донорской и пуповинной крови человека в диапазоне положительных температур для двух быстро проникающих в эти клетки криопротекторов (1,2-ПД и ДМСО) и рассчитаны энергии активации процесса трансмембранного переноса этих веществ.

Coefficients of erythrocytes' membranes permeability of human donors' and cord blood within the range of positive temperatures for 1,2-propanediol (PD) and DMSO cryoprotectants, which rapidly penetrated into these cells, were revealed, activation energy of the process of transmembrane transfer of these substances was calculated.

Проникність клітинних мембран для різних речовин є важливим біофізичним параметром, що характеризує їх структурні та функціональні властивості. Цей параметр також в значній мірі визначає режимні параметри кріоконсервування біооб'єктів. Оскільки кріоконсервування біооб'єктів безпосередньо пов'язане зі значними змінами температури, вивчення температурної залежності транспортних характеристик клітинних мембран важливе як для визначення впливу цього чинника на стан і властивості мембранних структур, так і для коригування та оптимізації режимів кріоконсервування.

У роботі визначено коефіцієнти проникності мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул двох кріопротекторів (ДМСО і 1,2-ПД), які швидко проникають у ці клітини, у діапазоні температур 37–3 °С і розраховано значення енергії активації процесу трансмембранного переносу цих речовин. З цією метою за описаним в [4] методом нами вимірювалась інтенсивність світла, розсіяного суспензією еритроцитів під кутом 9° до напрямку падаючого пучка, під час їх експозиції у водних розчинах при різних позитивних температурах. На рис. 1 представлено характерні експериментальні криві гемолізу еритроцитів донорської крові людини в 1 М водному розчині ДМСО при різних температурах. На рис. 2

Permeability of cellular membranes for various substances is an important biophysical parameter, characterizing their structural and functional properties. Given parameter in a considerable extent determines the regimen parameters for bioobjects cryopreservation. Investigation of the temperature dependence of transport characteristics in cellular membranes is an important task both for detection of the effect of this factor on the state and properties of membrane structure and correction and optimization of cryopreservation regimens, since bioobjects cryopreservation is closely connected to significant temperature changes.

Coefficients of membrane permeability in the erythrocytes of human donors' and cord blood for the molecules of both cryoprotectants, which rapidly penetrated into these cells within 37–3 °C temperature range, were determined, energy values of the activation in the process of these substances transmembrane transfer were calculated. With this aim according to the method described [4] we measured the intensity of light, diffused by erythrocytes suspension under 9° angle, directed to a falling beam, during their exposure in aqueous solutions under various positive temperatures. Characteristic experimental curves of erythrocytes hemolysis of human donor's blood in 1 M DMSO aqueous solution under different

Матеріал, захищений авторським правом

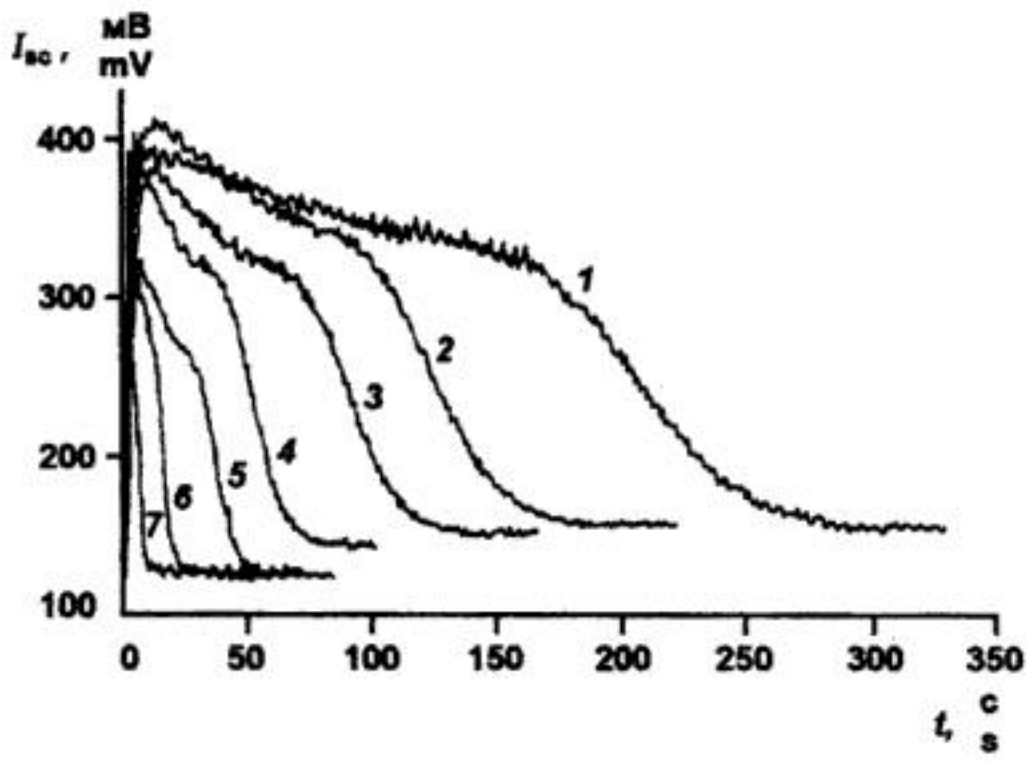


Рис. 1. Кінетичні криві гемолізу еритроцитів донорської крові людини в 1 М водному розчині ДМСО при температурах, °С: *1* – 2,5; *2* – 5,5; *3* – 8,5; *4* – 12; *5* – 18; *6* – 25; *7* – 37.

Fig. 1. Kinetic curves of erythrocytes hemolysis of human donors' blood in 1 M DMSO aqueous solution under the temperatures, °C: *1* – 2.5; *2* – 5.5; *3* – 8.5; *4* – 12; *5* – 18; *6* – 25; *7* – 37.

для порівняння подано кінетичні криві гемолізу еритроцитів в 1 М водних розчинах ДМСО та 1,2-ПД при температурі 3 °С.

У табл. 1, 2 подано експериментальні дані про час напівгемолізу та розраховано за цими даними коефіцієнти проникності для еритроцитів донорської та пуповинної крові в дослідженому діапазоні температур [1–3]. На рис. 3, 4 подано залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для ДМСО та 1,2-ПД в ареніусових координатах. Апроксимуючи ці залежності прямими за методом найменших квадратів, розраховували енергію активації відповідних процесів трансмембранного переносу стандартним методом. У табл. 3 подано визначені таким чином значення енергії активації

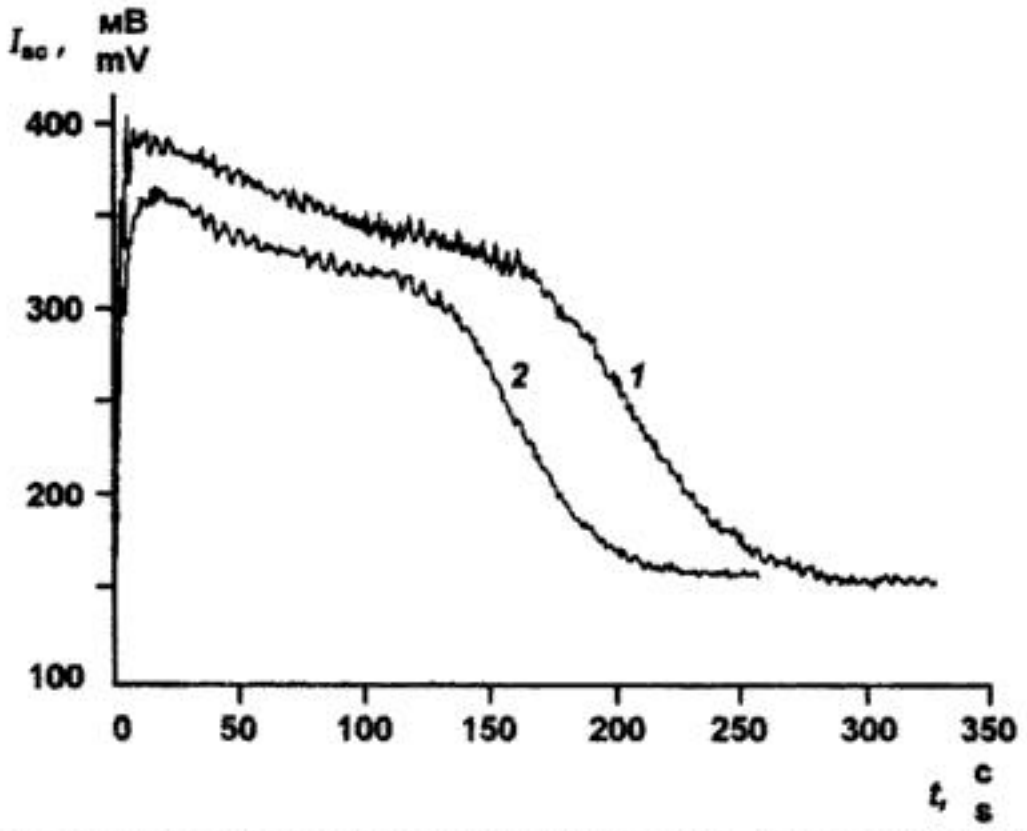


Рис. 2. Кінетичні криві гемолізу еритроцитів донорської крові людини в 1 М водних розчинах ДМСО (*1*) та 1,2-ПД (*2*) при температурі 3 °С.

Fig. 2. Kinetic curves of erythrocytes hemolysis of human donor blood in 1 M DMSO (*1*) and 1,2-PD (*2*) aqueous solutions at the temperature of 3 °C.

temperatures are presented in Fig. 1. To comparatively study, the kinetic curves of erythrocytes hemolysis in 1M aqueous solutions of DMSO and 1,2-PD under 3 °C temperature are presented in Fig. 2.

Experimental data on the time of semi-hemolysis are given in the Tables 1, 2, permeability coefficients of erythrocytes membranes of donor's and cord blood in the investigated temperature range, were evaluated according to these data [1–3]. Coefficient dependencies of erythrocytes membranes permeability for DMSO and 1,2-PD in Arrhenius coordinates are given in the Fig. 3, 4. Approximating these dependencies by the lines according to the method of the least squares, activation energy of the corresponding processes of transmembrane transfer by the standard method was measured. Energy values of the processes activation of

Таблиця 1 **Table 1**

Значення часу напівгемолізу та коефіцієнти проникності мембран еритроцитів донорської крові для ДМСО та 1,2-ПД

Time values of semi-hemolysis and coefficients of erythrocytes' membranes permeability of donors' blood for DMSO and 1,2-PD

T, °C	ДМСО / DMSO		1,2-ПД / 1,2-PD	
	$t_{1/2}$, с $t_{1/2}$, s	$K \cdot 10^7$, м/с $K \cdot 10^7$, m/s	$t_{1/2}$, с $t_{1/2}$, s	$K \cdot 10^7$, м/с $K \cdot 10^7$, m/s
3	178	0,97	131	1,36
4	160	1,1	118	1,49
5	140	1,26	81,7	2,38
7	105	1,62	77	2,54
9	82,7	2,37	44,3	4,05
12	62	3,1	39,7	4,44
13	50	3,6	32	5,17
16	44,7	4,04	27,7	5,47
18	33,5	5,03	21,5	6,12
20	27,3	5,51	19,3	9,2
25	22,5	6,03	15,5	12,7
27	15,5	14,0	10,75	19,1
30	11,5	18,2	7,5	24,2
37	5,7	28,5	5	31

Таблиця 2 **Table 2**

Значення часу напівгемолізу та коефіцієнти проникності мембран еритроцитів пуповинної крові для ДМСО та 1,2-ПД

Time values of semi-hemolysis and coefficients of erythrocytes' membranes permeability of cord blood for DMSO and 1,2-PD

T, °C	ДМСО / DMSO		1,2-ПД / 1,2-PD	
	$t_{1/2}$, с $t_{1/2}$, s	$K \cdot 10^7$, м/с $K \cdot 10^7$, m/s	$t_{1/2}$, с $t_{1/2}$, s	$K \cdot 10^7$, м/с $K \cdot 10^7$, m/s
4	262	0,59	152	1,15
5	242,5	0,65	136	1,3
7	119,5	1,47	82.5	2,33
10	83,5	2,29	64	3,05
13	74,75	2,62	46,5	3,87
16	49	3,66	32	5,17
20	37	4,71	27,5	5,55
25	23,7	6,0	18,7	9,6
30	11	18,8	8,5	22,4
37	6,25	27,2	5,5	29,6

Матеріал, захищений авторським правом

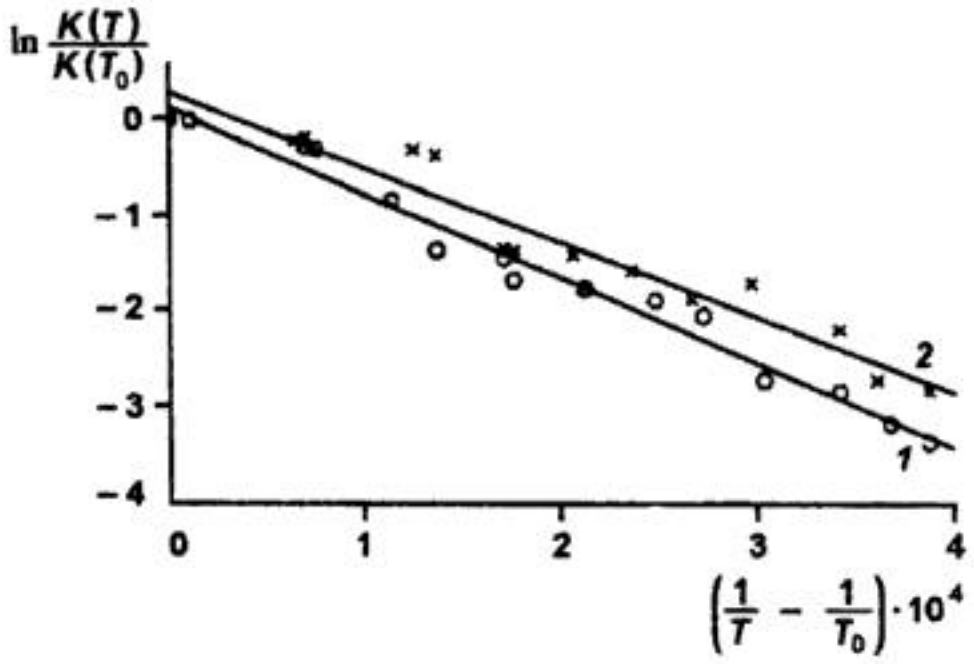


Рис. 3. Ареніусові залежності коефіцієнта проникності мембран еритроцитів донорської крові людини для ДМСО (*1*) та 1,2-ПД (*2*)

Fig. 3. Arrhenius dependencies of permeability coefficient of erythrocytes membrane of a human donors' blood for DMSO (*1*) and 1,2-PD (*2*).

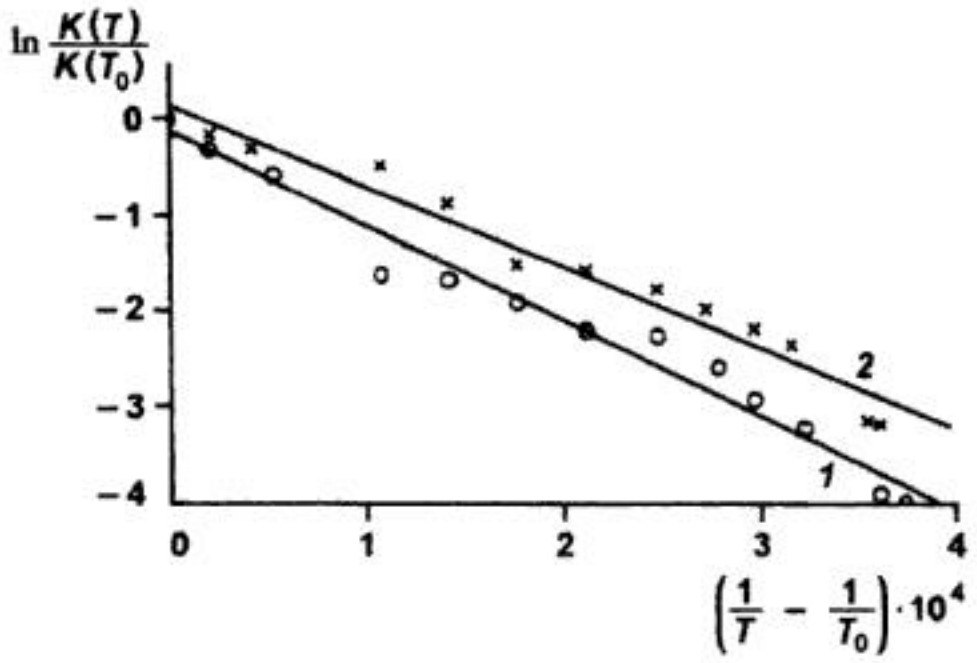


Рис. 4. Ареніусові залежності коефіцієнта проникності мембран еритроцитів пуповинної крові людини для ДМСО (*1*) та 1,2-ПД (*2*)

Fig. 4. Arrhenius dependencies of permeability coefficient of erythrocytes membrane of human cord blood for DMSO (*1*) and 1,2-PD (*2*).

процесу трансмембранного переносу кріопротекторів через мембрани еритроцитів.

Таблиця 3

Енергія активації процесу трансмембранного переносу молекул ДМСО та 1,2-ПД для еритроцитів донорської і пуповинної крові людини

Кров	Кріопротектор	Енергія активації, КДж/моль
Донорська	ДМСО	71,34 ± 5,25
	1,2-ПД	67,24 ± 6,46
Пуповинна	ДМСО	75,58 ± 6,7
	1,2-ПД	70,4 ± 3,91

Як видно з представлених даних, кріопротектори проникають значно повільніше в еритроцити пуповинної крові, ніж донорської. У той же час енергії активації цих процесів для еритроцитів донорської та пуповинної крові вірогідно не відрізняються і незначно відрізняються для двох досліджених кріопротекторів. З поданих таблиць та рисунків також видно, що коефіцієнти проникності для 1,2-ПД більші за коефіцієнти проникності для ДМСО у всьому дослідженому діапазоні температур, але ця різниця є більшою при низьких температурах.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Гордиенко Е. А., Гордиенко О. И., Коваленко И. Ф., Розанов Л. Ф.* Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов методом малоуглового рассеяния // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 1.– С. 32–39.
2. *Гордиенко Е. А., Панина Ю. Е.* Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. I Этап набухания // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– № 1.– С. 79–85.
3. *Гордиенко Е. А., Панина Ю. Е.* Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II. Этап гемолиза // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– № 2.– С. 54–58.
4. *Гордиенко О. И., Панина Ю. Е., Коваленко И. Ф.* Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов // Вісник ХДУ. Біофіз. вісник.– 1998.– № 2.– С. 59–63.

Поступила 27.06.2000

cryoprotectants transfer through erythrocytes membranes, are demonstrated in the Table 3. As it is seen from the data presented, cryoprotectants penetrate slower into cord blood erythrocytes in comparison with donor's blood erythrocytes. At the same time activation energies of these processes for erythrocytes of donor's and cord blood statistically did not differ, and slightly differ for both studied cryoprotectants.

Table 3

Activation energy of the process of transmembrane transfer of DMSO and PD molecules for erythrocytes of human donors' and cord blood

Blood	Cryoprotectant	Activation energy, kJ/mol
Donor	DMSO	71.34 ± 5.25
	1,2-PD	67.24 ± 6.46
Cord	DMSO	75.58 ± 6.7
	1,2-PD	70.4 ± 3.91

The tables and figures presented show that, permeability coefficients for 1,2-PD are higher than ones for DMSO permeability within the whole studied temperature range, but this difference is higher under low temperatures.

REFERENCES

1. *Gordienko E. A., Gordienko O. I., Kovalenko I. F., Rozanov L. F.* Experimental studying of kinetics of hypotonic and acidic erythrocytes hemolysis by means of small-angle scattering // Problemy kribiologii.– 1994.– № 1.– P. 32–39.
2. *Gordienko E. A., Panina Yu. F.* Physical and mathematical model of the phenomenon of human erythrocytes hypotonic hemolysis. I. Swelling stage // Visnyk KhDU. Biofiz. visnyk.– 1998.– № 1.– P. 79–85.
3. *Gordienko E. A., Panina Yu. F.* Physical and mathematical model of the phenomenon of human erythrocytes hypotonic hemolysis. II. Hemolysis stage // Visnyk KhDU. Biofiz. visnyk.– 1998.– № 2.– P. 54–58.
4. *Gordienko O. I., Panina Yu. E., Kovalenko I. F.* Determination of the coefficients of erythrocytes membranes permeability for cryoprotectants // Visnyk KhDU. Biofiz. visnyk.– 1998.– № 2.– P. 59–63.

Accepted in 27.06.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 636.4.082: 57.08

UDC 636.4.082: 57.08

Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определение их криорезистентности.
III. Осмотический состав бластоцист свиньи

Н. А. ГОРДИЕНКО
Харьковский государственный медицинский университет

Н. Д. БЕЗУГЛЫЙ, А. В. МЕДВЕДОВСКИЙ, Г. В. ЖЕРНОКЛЕВ
Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи

К. Р. ЯНГС
Сельскохозяйственный колледж университета штата Айова, США

Some biophysical properties of sexual and embryonic porcine cells, its cryoresistance determination.
III. Osmotic composition of pig blastocyst

N. A. GORDIENKO
Kharkov Medical University

N. D. BEZUGLY, A. V. MEDVEDOVSKY, G. V. ZHERNOKLYOV
Center of Biotechnology, Kharkov, Kulinichi

C. R. YOUNGS
Iowa State University, College of Agriculture, Department of Animal Science, Iowa, USA

Для эмбрионов на стадии бластоцисты введен новый параметр (коэффициент α), количественно описывающий качественные изменения эмбрионов в процессе развития. Приведены числовые значения осмотического давления внутри бластоцели для эмбрионов свиньи от стадии ранней бластоцисты до выхода из зоны пеллюцида. Определен осмотический состав доимплантационных эмбрионов свиньи поздних стадий развития. Изучено изменение количества осмотически неактивных и активных веществ, количества осмотически активной воды на завершающих стадиях дробления.

Для ембріонів на стадії бластоцисти введено новий параметр (коефіцієнт α), який кількісно описує якісні зміни ембріонів у процесі розвитку. Наведено числові значення осмотичного тиску в середині бластоцілі для ембріонів свині від стадії ранньої бластоцисти до виходу з зони пеллюцида. Визначено осмотичний склад доімплантаційних ембріонів свині пізніх стадій розвитку. Вивчено зміну кількості осмотично неактивних та активних речовин, кількості осмотично активної води на завершальних стадіях дроблення.

New parameter (coefficient α) quantitatively describes qualitative developmental changes of embryos at blastocyst stage was introduced. Numerical values of osmotic pressure in the blastocoele of porcine blastocyst from early to hatching stages were given. Osmotic composition of pre-implantation porcine embryos of late developmental stages was determined. Changes of osmotically active and inactive substances and osmotically active water during late cleavage stages were investigated.

Криоконсервация эмбрионов, полученных от высокоценных животных, стала неотъемлемым элементом программ по повышению генетического потенциала всех основных видов сельскохозяйственных животных, исключая свинью [13], что, очевидно, объясняется видовыми особенностями строения ее эмбрионов. Хотя способность поздних стадий эмбрионов свиньи переносить замораживание и была подтверждена экспериментом [11], результаты не были повторены, и говорить о создании метода криоконсервации ее эмбрионов пока преждевременно.

Cryopreservation of the embryos, obtained from marketable animals, became an integral element of the programmes on genetic potential increase of agricultural animals of all basic species, excluding pig [13], that is apparently explained by the species peculiarities of its embryos structure. Although the ability of late stages porcine embryos to survive the freezing was confirmed by the experiment [11], the results were not repeated, and it is early to speak about the creation of porcine embryos cryopreservation method.

Cryopreservation of both embryos and other biological objects comes mainly to the determining of

Матеріал, захищений авторським правом

Криоконсервация эмбрионов, как и других биообъектов, сводится главным образом к определению оптимального состава криозащитной среды и режима замораживания-оттаивания. Исследования показали, что повреждения эмбрионов при криоконсервации во многом определяются осмотическими процессами, проходящими при замораживании и оттаивании [5, 10, 15]. Созданы адекватные физико-математические модели, позволяющие рассчитывать оптимальный состав криопротекторов и скорости замораживания и оттаивания, но для их практического использования необходимо изучить осмотические параметры конкретного объекта замораживания [1, 9]. Для эмбрионов свиньи такие исследования проводились в очень незначительном объеме [14, 16, 17], и полученные данные недостаточны для полного математического анализа.

Цель работы — изучение осмотического состава эмбрионов свиньи на стадии бластоцисты.

Эмбрионы для исследований получали хирургическим путем от естественно циклирующих свинок на 5–9-й дни полового цикла.

Осмотический состав эмбрионов определяли по методу волюмометрии [1], используя полуавтоматическую установку для изучения осмотических свойств эмбрионов млекопитающих [4]. Необходимые растворы получали добавлением рассчитанных количеств хлорида натрия к фосфатно-солевому буферу Дюльбекко, тоничность растворов контролировали осмометром. Все манипуляции с эмбрионами выполняли при комнатной температуре (22 ± 2 °C). Математический анализ проводили по специально разработанным программам при помощи компьютера.

Объектом наших исследований были бластоцисты свиньи. С точки зрения эмбриологии образование бластулы завершает процесс дробления и непосредственно предшествует последующему этапу эмбрионального развития — гаструляции. Вместе с тем бластоцисты различного срока развития существенно отличаются по строению. В своих исследованиях мы придерживались следующей классификации бластоцист:

1) ранняя — бластоциста, у которой бластоцель лишь начинает формироваться и имеет вид щели между клетками;

2) расширяющаяся — увеличиваются размеры бластоцели, которая уже представляет собой полость между клетками, а также начало дифференцировки клеток на трофобластические и эмбриобластические;

3) расширенная — бластоцель полностью сформирована, клеточная масса четко разделена на эмбриобласт и трофобласт;

4) вылупляющаяся — находится в процессе выхода из зоны пеллюцида, при этом зона пеллюцида разрывается в месте вылупления бластоцисты;

cryoprotective medium optimal composition and freezing-thawing regimen. The investigations show that embryos injury at cryopreservation is generally determined by osmotic processes occurring at freezing and thawing [5, 10, 15]. The adequate physical and mathematical models allowing to determine the optimal cryoprotectant composition and freezing-thawing rates have been created, but for their practical usage it is necessary to study the osmotic parameters of distinct freezing object [1, 9]. For pig embryos such studies were carried-out in a slight bulk [14, 16, 17] and the obtained results were not sufficient for complete mathematical analysis.

The aim of this investigation is to study the osmotic composition of porcine embryos at blastocyst stage.

The embryos for investigation were obtained by a surgical way from the naturally cycling pigs to the 5–9th day of sex cycle.

The embryos' osmotic composition was determined with volumetric method using semi-automated device for determining the mammalian embryos osmotic properties [4]. Necessary solutions were obtained by adding the calculated sodium chloride amount to the Dulbecco's phosphate saline buffer, the solutions' tonicity was tested with osmometer. All manipulations with embryos were made at room temperature (22 ± 2 °C). The mathematical analysis was carried-out with specially elaborated programs using PC.

The porcine blastocysts were the object of our study. From embryology point of view the blastula formation ceases the fission process and immediately precedes the subsequent stage of embryonic development — the gastrulation. At the same time the blastocysts of various development term essentially differ on a structure. In our study we confined ourselves to the following blastocyst classification:

1) early blastocyst — in which the blastocoele only starts to be formed (generated) and looks like a fissure between cells;

2) extending blastocyst — increases the size of blastocoele, which has already represented a gap between cells, also the differentiation of cells to the trophoblastic and embryoblastic ones starts;

3) extended blastocyst — the blastocoele is completely formed, the cell mass is distinctly divided in the embryoblast and trophoblast;

4) hatching blastocyst — is in releasing process out of zona pellucida, zona pellucida by such a way is broken- off in a place of blastocyst hatching;

5) hatched blastocyst — which left the zona pellucida, its size is considerably increased in comparison with above mentioned stages.

When studying the blastocysts' osmotic properties the approaches and mathematical assumptions, used for embryos of earlier stages, are inapplicable. It is determined by the fact that embryo at the blastocyst stage has a cell mass along with the blastocoele — the cavity filled with a liquid. Due to the blastocoele presence the blastocyst's volume changes have the character different from the embryos of earlier stages.

Матеріал, захищений авторським правом

5) вылупившаяся — вышедшая из зоны пеллюцида, размер ее значительно увеличен по сравнению с предыдущими стадиями.

При изучении осмотических свойств бластоцист неприменимы подходы и математические допущения, используемые для эмбрионов более ранних стадий. Это определяется тем, что на стадии бластоцисты эмбрион, кроме клеточной массы, имеет бластоцель — полость, заполненную жидкостью. Вследствие наличия бластоцели изменения объема бластоцисты носят характер, отличный от эмбрионов более ранних стадий. Изменения объема бластоцисты состоят из изменений объема собственно клеточной массы и бластоцели. Так как клетка является абсолютным осмометром, концентрация растворенных веществ внутри и вне клетки одинакова, что и приводит к изменению клеточного объема при изменении тоничности среды. Бластоцель не является клеточной структурой и, как показывают эксперименты, концентрация растворенных в ней веществ не может быть равна концентрации окружающей клетку среды.

При помещении в гипертонический раствор клеточная масса уменьшает свой объем согласно закону Вант-Гоффа. Бластоцель же начнет изменять свой объем только тогда, когда осмотическое давление среды превысит давление внутри бластоцели. Таким образом, наблюдается запаздывание в изменении объема бластоцели по отношению к клеточной массе. Для учета этого запаздывания нами был введен коэффициент α, выражающий отношение объема бластоцели к объему бластоцисты. Кроме того, описанная выше классификация бластоцист сугубо качественная, в то время как коэффициент α, являющийся количественным параметром, позволяет более объективно классифицировать стадии развития бластоцист. Работая с изображениями эмбрионов, мы измеряли площади поперечного сечения бластоцели S_{bl} и всего эмбриона S_{emb}, а как известно, отношение этих параметров в степени 3/2 равно отношению соответствующих объемов [1].

$$\alpha = \frac{V_{bl}}{V_{emb}} = \left(\frac{S_{bl}}{S_{emb}}\right)^{3/2}. \qquad (1)$$

В результате проведенных исследований были получены следующие значения коэффициента α для бластоцист свиньи: ранней — $0{,}25 \pm 0{,}09$; расширяющейся — $0{,}57 \pm 0{,}12$; вылупляющейся — $0{,}55 \pm 0{,}07$; вылупившейся — $0{,}72 \pm 0{,}04$. Мы считаем, что коэффициент α может быть использован для описания раннего эмбриогенеза у других видов млекопитающих.

Для определения осмотического давления в бластоцели эмбрионы последовательно помещали в ряд гипертонических растворов повышающейся концентрации. Осмотическое давление каждого предыдущего раствора отличалось от последующего на 5 мОсм. Осмотическое давление раствора, в

The blastocyst's volume changes consist of the changes in the volumes of cell mass itself and blastocoele. Since a cell is an absolute osmometer, the concentrations of dissolved substances outside and inside of cell are the same that results in cell volume change under medium tonicity changes. Blastocoele is not a cellular structure and the concentration of dissolved in it substances was experimentally showed to be not equal to the concentration of substances in surrounding medium.

When placing into hypertonic solution the cell mass reduces its volume according to the Van't Hoff law. Whereas the blastocoele starts to change its volume only then medium osmotic pressure exceeds that one in blastocoele. Thus the delay of the change in blastocoele volume in respect of the cell mass is observed. To underline this delay we have introduced the α coefficient showing the ratio of blastocoele volume to that for blastocyst. In addition, the described above blastocyst classification is just qualitative, while the α coefficient being a quantitative parameter allows more objective classification of blastocyst development stages. Working with embryos' images we have measured the blastocoele's cross sectional area S_{bl}) and that one for the embryo S_{emb}, and as it is known the 3/2 power of these parameters ratio is equal to the corresponding volumes' ratio [1].

$$\alpha = \frac{V_{bl}}{V_{emb}} = \left(\frac{S_{bl}}{S_{emb}}\right)^{3/2}. \qquad (1)$$

As a result of the investigations carried-out we have obtained the following values of α coefficient for porcine blastocysts: early — 0.25 ± 0.09, extending — 0.57 ± 0.12, hatching — 0.55 ± 0.07, hatched — 0.72 ± 0.04. We believe, that the α coefficient can be used for the describing of embryogenesis of another mammalian species.

To determine the blastocoele's osmotic pressure the embryos were consistently placed in the series of hypertonic solutions with raising concentrations. The osmotic pressure of each previous solution differed from the subsequent one by 5 mOsm. The solution osmotic pressure, in which the embryo taking-off from zona pellucida is observed, was assumed as approximately equal to those in blastocoele. The average results are given in Fig. 1. As it seen from the given data the blastocoele's content is a hypertonic solution and the hypertonicity extent increases in the process of embryo development. In blastocysts from early to extended stages this increased pressure is counterbalanced by mechanical pressure of zona pellucida. In the hatched blastocysts the osmotic pressure in blastocoele is balanced with the surrounding medium one. These results confirm the hypothesis of osmotic nature of blastocoele formation and blastocyst hatching processes [3].

To determine the blastocyst's osmotic parameters the experiments for finding the embryo's relative volume in sodium chloride hypertonic solutions were carried-out (Fig. 2).

As it was noted earlier the volume of embryo at the blastocyst stage V_{emb} consisted of the intracellular mass volume V_c and blastocoele volume V_{bl}:

Матеріал, захищений авторським правом

котором наблюдался отрыв эмбриона от зоны пеллюцида, принималось как приблизительно равное давлению в бластоцели. Полученные усредненные результаты приведены на рис. 1. Как видно из представленных данных, содержимое бластоцели является гипертоническим раствором и степень гипертонии возрастает по мере развития эмбриона. У бластоцист от ранней до расширенной стадий это повышенное давление уравновешивается механическим напряжением зоны пеллюцида. У вылупившихся бластоцист осмотическое давление в бластоцели уравнивается с давлением окружающей среды. Эти результаты подтверждают гипотезу осмотической природы процессов формирования бластоцели и вылупления бластоцисты [3].

Для установления осмотических параметров бластоцист были проведены эксперименты по определению относительного объема эмбрионов в гипертонических растворах хлорида натрия (рис. 2).

Как уже было отмечено ранее, объем эмбриона на стадии бластоцисты V_{emb} состоит из объема внутриклеточной массы V_c и объема бластоцели V_{bl}:

$$V_{emb} = V_c + V_{bl}. \qquad (2)$$

С точки зрения осмотических свойств абсолютный объем внутриклеточной массы V_c определяется как сумма объемов несвязанной воды V_w, непроникающих веществ V_i и осмотически неактивных веществ V_b:

$$V_c = V_w + V_i + V_b. \qquad (3)$$

Абсолютный объем бластоцели состоит из объема воды бластоцели $V_{bl(w)}$ и объема непроникающих веществ бластоцели $V_{bl(i)}$:

$$V_{bl} = V_{bl(w)} + V_{bl(i)}. \qquad (4)$$

Для дальнейшего анализа введем относительные значения объемов:

$v_w = V_w / V_c^{iso}$ – внутриклеточной воды для внутриклеточной массы;

$v_b = V_b / V_c^{iso}$ – осмотически неактивных веществ для внутриклеточной массы;

$v_i = V_i / V_c^{iso}$ – непроникающих веществ для внутриклеточной массы;

$v_{bl(w)} = V_{bl(w)} / V_{bl}^{iso}$ – воды бластоцели;

$v_{bl(i)} = V_{bl(i)} / V_{bl}^{iso}$ – осмотически неактивных веществ бластоцели.

Относительное количество несвязанной воды согласно закону Вант-Гоффа может быть выражено формулой

$$v = C_i^{iso} / C_i^e, \qquad (5)$$

где C_i^{iso} – изотоническая концентрация непроникающих веществ; C_i^e – внеклеточная концентрация непроникающих веществ.

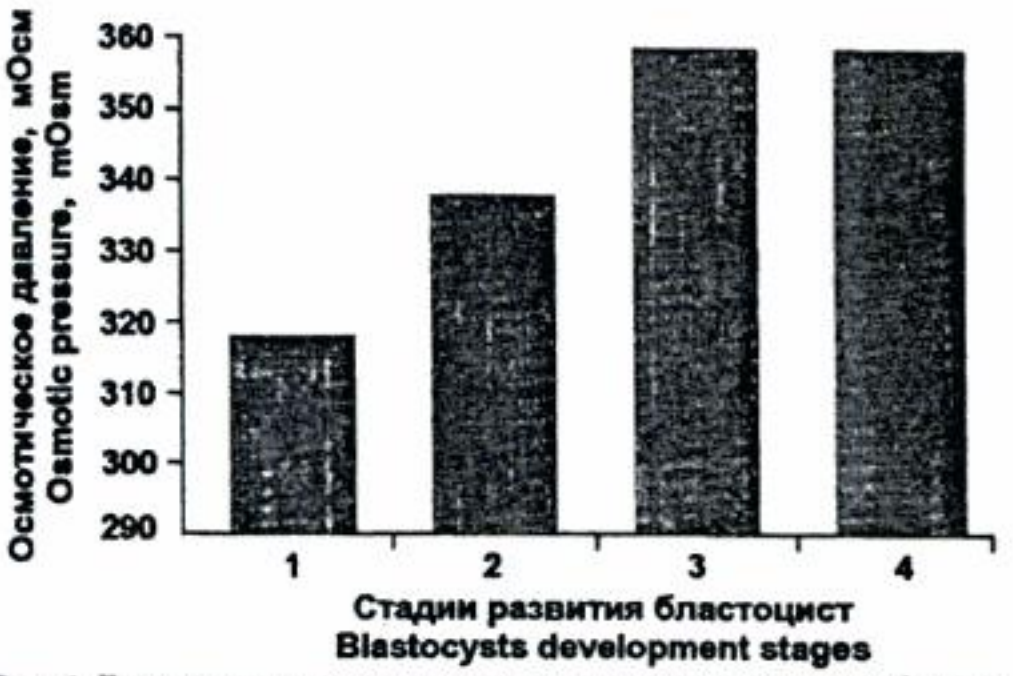


Рис. 1. Гистограмма изменения осмотического давления в бластоцели бластоцист свиньи различных стадий развития: 1 – ранней; 2 – расширяющейся; 3 – расширенной; 4 – вылупляющейся.

Fig. 1. The change of osmotic pressure in blastocoele of porcine blastocysts of various development stages: 1 – early; 2 – extending; 3 – extended; 4 – hatching.

$$V_{emb} = V_c + V_{bl}. \qquad (2)$$

Regarding to osmotic properties the intacellular mass absolute volume V_c is determined as the sum of volumes of the non-bound water V_w, non-penetrating substances V_i and osmotically inactive substances V_b:

$$V_c = V_w + V_i + V_b. \qquad (3)$$

The blastocoele absolute volume comprises the blastocoele's water volume $V_{bl(w)}$ and blastocoele's non-penetrating substances $V_{bl(i)}$:

$$V_{bl} = V_{bl(w)} + V_{bl(i)}. \qquad (4)$$

For further analysis we will introduce the following volume relative values:

$v_w = V_w / V_c^{iso}$ – those of intracellular water for intracellular mass;

$v_b = V_b / V_c^{iso}$ – those of osmotic inactive substances for intracellular mass;

$v_i = V_i / V_c^{iso}$ – those of non-penetrating substances for intracellular mass;

$v_{bl(w)} = V_{bl(w)} / V_{bl}^{iso}$ – blastocoele's water;

$v_{bl(i)} = V_{bl(i)} / V_{bl}^{iso}$ – blastocoele's osmotic inactive substances.

The non-bound water relative amount can be expressed according to the Van't Hoff law by the formula

$$v = C_i^{iso} / C_i^e, \qquad (5)$$

where C_i^{iso} is the isotonic concentration of non-penetrating substances; C_i^e – extracellular concentration of non-penetrating substances.

Relative volume of substances non-penetrating through a cytoplasmic membrane can be expressed by the formula:

$$v_i \approx C_i \frac{M}{\rho}, \qquad (6)$$

Матеріал, захищений авторським правом

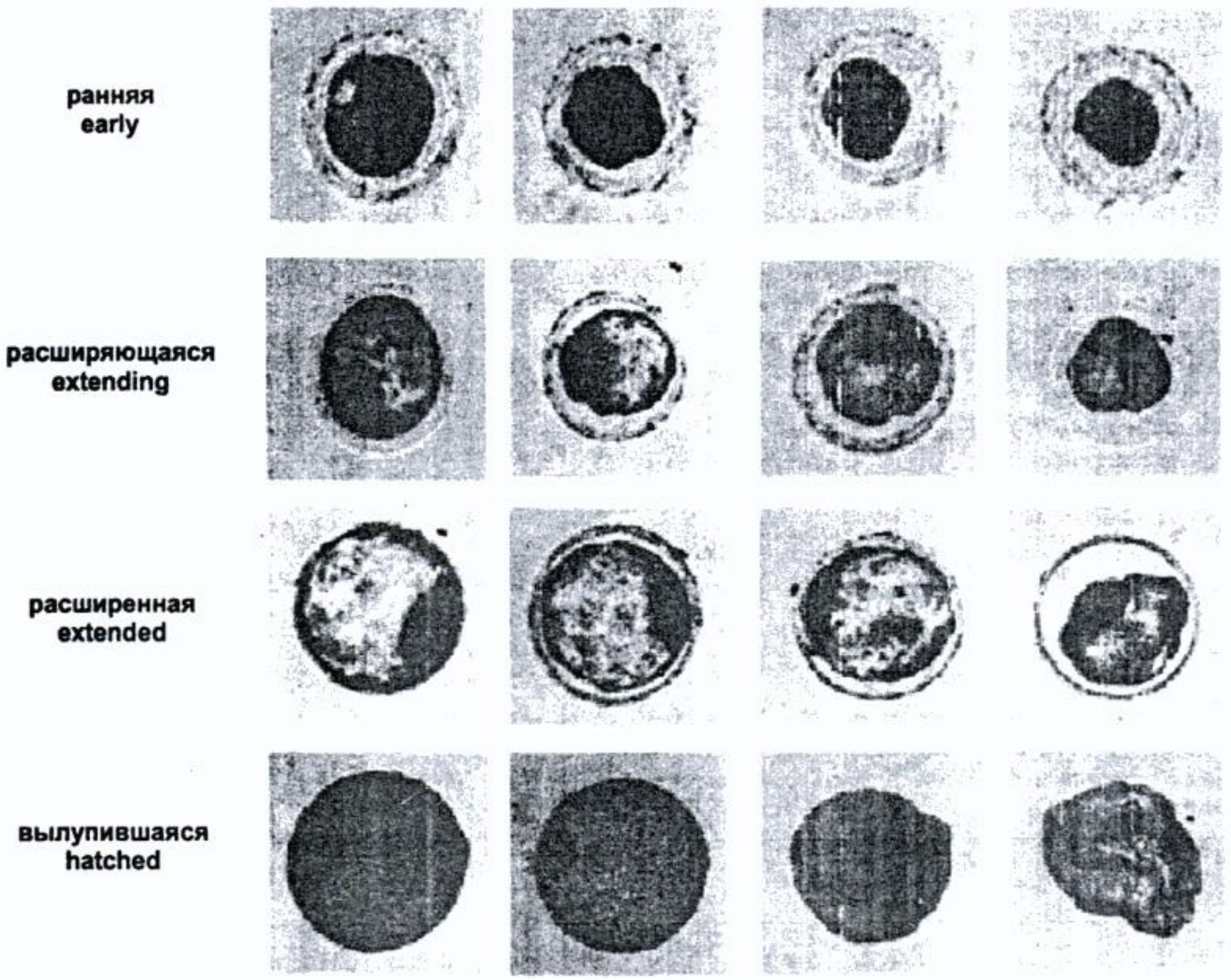


Рис. 2. Изменение объема бластоцист свиньи различных стадий развития в гипертонических растворах.

Fig. 2. The change of volume of porcine blastocysts of various development stages in hypertonic solutions.

Относительный объем непроникающих через цитоплазматическую мембрану веществ может быть выражен формулой

$$v_i \approx C_i \frac{M}{\rho}, \qquad (6)$$

где M и ρ – молекулярный вес и плотность осмотически неактивных веществ.

Объем эмбриона на стадии бластоцисты с учетом выражений (5) и (6), а также введенного нами коэффициента α будет иметь вид:

$$v_{emb} = \alpha\left(\frac{C_{bl(i)}}{C_i^e} + \frac{C_{bl(i)}M}{\rho}\right) + v_b(1-\alpha) + (1-\alpha)(1-v_b)\left(\frac{C_i^{iso}}{C_i^e} + \frac{C_i^{iso}M}{\rho}\right). \qquad (7)$$

Для учета того, что изменение объема бластоцисты состоит из изменения объема клеточной массы и изменения объема бластоцели, при анализе экспериментальных данных применяли метод

where M and ρ – molecular weight and density of osmotic inactive substances.

Volume of the embryo of blastocyst stage using expressions (5) and (6) and with introduced by us α coefficient will be presented as follows:

$$v_{emb} = \alpha\left(\frac{C_{bl(i)}}{C_i^e} + \frac{C_{bl(i)}M}{\rho}\right) + v_b(1-\alpha) + (1-\alpha)(1-v_b)\left(\frac{C_i^{iso}}{C_i^e} + \frac{C_i^{iso}M}{\rho}\right). \qquad (7)$$

For tracing the fact, that blastocyst's volume change consists of the cell mass volume one and that of the blastocoele's volume, by analysing the experimental data we have applied the superposition method. In the Van't Hoff coordinates using the obtained data we have plotted the graph of dependence of relative cellular volume on the solution concentration. In the region of superhypertonic concentrations the linear approximation of experimental data for the experimental concentrations range was used. In Fig. 3 the dependence of relative cellular volume on the

Матеріал, захищений авторським правом

суперпозиций. По полученным данным в координатах Вант-Гоффа строили график зависимости относительного клеточного объема от концентрации растворов. В области сверхгипертонических концентраций была использована линейная апроксимация опытных данных для диапазона экспериментальных концентраций. На рис. 3 приведен график зависимости относительного клеточного объема от концентрации растворов для расширенной бластоцисты. Относительный объем осмотически неактивных веществ определяется как точка пересечения с осью ординат функции, отраженной на данном графике.

Аналогичный анализ был проведен для бластоцист свиньи других стадий развития, а также был выполнен анализ экспериментальных данных при помощи математической модели, учитывающей особенности сжатия бластоцист в гипертонических растворах. В результате мы получили формулу для определения относительного объема осмотически неактивных веществ:

$$V_b = \frac{\sum_{j=1}^{k}\left[(V_{emb})^j - \frac{C_i^{iso}}{(C_i^e)^j} - \alpha\frac{C_{bl}^{iso} - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j} - \alpha C_{bl}^{iso}\frac{M}{\rho}\right]\left[\frac{1 - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j}\right]}{(1-\alpha)\sum_{j=1}^{k}\left[\frac{1 - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j}\right]^2}, \quad (8)$$

где V_{emb} – объем эмбриона; C_i^{iso} – молярная концентрация осмотически активных веществ в изотонии; C_i^e – молярная концентрация осмотически активных веществ в эксперименте; M – молекулярный вес растворенных веществ; ρ – плотность растворенных веществ.

Значения осмотических параметров для эмбрионов свиньи поздних стадий развития приведены в таблице.

По мере развития эмбриона объем осмотически неактивных веществ снижается. Этот объем состоит из объема внутриклеточных мембран, высокомолекулярных веществ типа белков, питательных и энергетических веществ, необходимых для построения новых клеточных структур в ходе дробления. Одной из возможных причин уменьшения объема осмотически неактивных веществ в клетках эмбриона может быть использование питательных веществ в ходе эмбриогенеза.

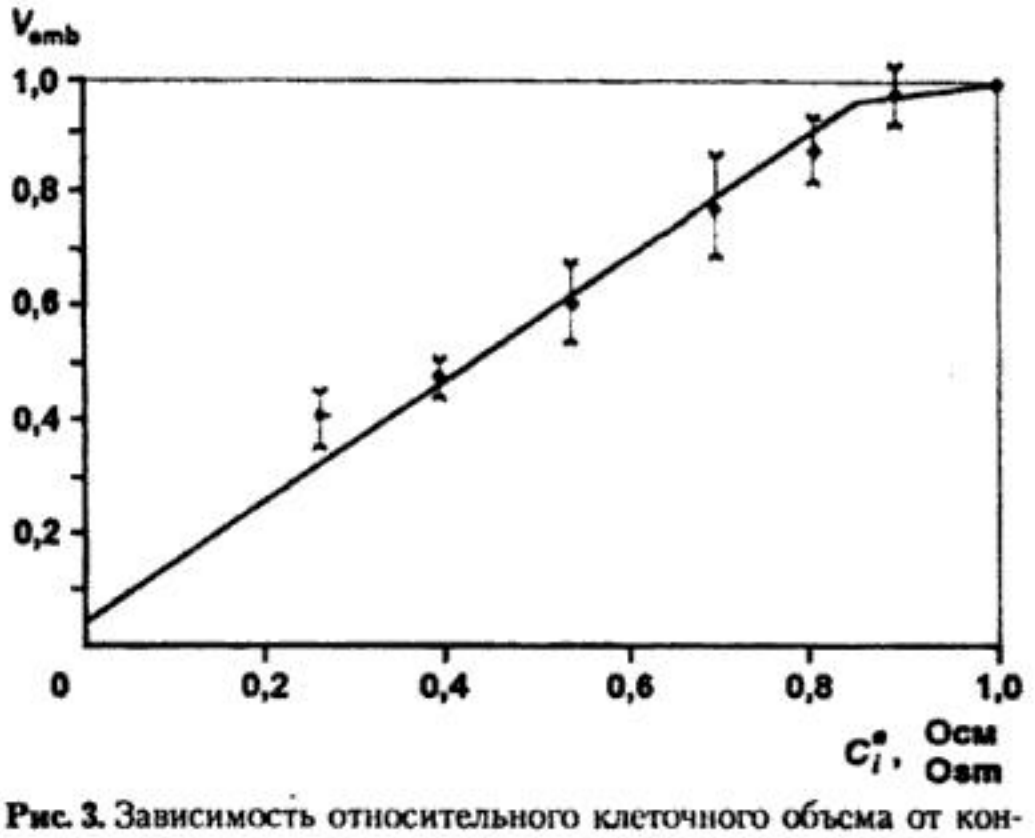


Рис. 3. Зависимость относительного клеточного объема от концентрации растворов для расширенных бластоцист свиньи.

Fig. 3. Dependence of relative cellular volume on the solution concentration for extended porcine blastocysts.

solution concentration is given. The relative volume of osmotic inactive substances is determined as the intersection point of the function presented in this graph with the axis of ordinates.

The similar analysis was carried-out for porcine blastocysts of other development stages, also we have carried-out the analysis of experimental data using a mathematical model considering the peculiarities of blastocyst shrinking in hypertonic solutions. As a result we obtained the formula for determining the relative volume of osmotically inactive substances:

$$V_b = \frac{\sum_{j=1}^{k}\left[(V_{emb})^j - \frac{C_i^{iso}}{(C_i^e)^j} - \alpha\frac{C_{bl}^{iso} - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j} - \alpha C_{bl}^{iso}\frac{M}{\rho}\right]\left[\frac{1 - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j}\right]}{(1-\alpha)\sum_{j=1}^{k}\left[\frac{1 - C_i^{iso}}{(C_i^e)^j}\right]^2}, \quad (8)$$

where V_{emb} – embryo's volume; C_i^{iso} – molar concentration of osmotically active substances in isotony; C_i^e – molar concentration of osmotically active substances in the experiment; M – molecular weight of dissolved substances; ρ – density of dissolved substances.

The values of osmotic parameters of porcine embryos of late development stages are given in Table.

With embryo development the volume of osmotically inactive substances decreases. This volume consists of intracellular membranes volume, highly molecular substances such as proteins, nutritive and energetic substances which are necessary for building the new cellular structures after cleavage. One of the possible reason of decreasing of osmotically inactive substances volume in embryo cells is the usage of nutritive substances in embryogenesis course.

Thus, the introduced α coefficient, expressing the blastocoele to blastocyst vo-

Осмотический состав эмбрионов свиньи поздних стадий развития

Относительный объем	Стадии развития эмбрионов				
	морула	ранняя бластоциста	расширяющаяся бластоциста	расширенная бластоциста	вылупившаяся бластоциста
Осмотически неактивных веществ	0,2302 ± 0,02	0,0910 ± 0,02	0,0710 ± 0,016	0,026 ± 0,02	0,063 ± 0,01
Осмотически активной воды	0,76 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,92 ± 0,016	0,964 ± 0,02	0,926 ± 0,012
Осмотически активных веществ	0,0098±0,0002	0,009 ± 0,0002	0,001±0,00016	0,010 ± 0,0002	0,010 ± 0,0001

Матеріал, захищений авторським правом

Таким образом, введенный коэффициент α, выражающий отношение объема бластоцели к объему бластоцисты, при определении осмотических параметров бластоцист позволяет учитывать особенности изменения их объема в неизотонических растворах, количественно описывает качественные изменения бластоцист в течение развития и может быть использован для описания раннего эмбриогенеза у млекопитающих. Содержимое бластоцели является гипертоническим раствором и степень гипертонии возрастает по мере развития эмбриона. Определен осмотический состав доимплантационных эмбрионов свиньи поздних стадий развития. Установлено, что по мере развития эмбриона объем осмотически неактивных веществ снижается, причиной чего, вероятно, является использование этих веществ в процессе развития эмбриона в качестве энергетического и пластического материала.

Osmotic composition of porcine blastocysts of late development stages

Relative volume	Embryo development stages				
	morula	early blastocyst	extending blastocyst	extended blastocyst	hatched blastocyst
Osmotically inactive substances	0.2302 ± 0.02	0.0910 ± 0.02	0.0710 ± 0.016	0.026 ± 0.02	0.063 ± 0.01
Osmotically active water	0.76 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.92 ± 0.016	0.964 ± 0.02	0.926 ± 0.012
Osmotically active substances	0.0098±0.0002	0.009 ± 0.0002	0.001±0.00016	0.010 ± 0.0002	0.010 ± 0.0001

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безуглый Н. Д.* Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1984.– 218 с.
2. *Безуглый Н. Д.* Низкотемпературная консервация яйцеклеток и эмбрионов в биотехнологии воспроизведения сельскохозяйственных животных: Дис. ... д-ра с.-х. наук.– Харьков, 1995.– 333 с.
3. *Безуглий М. Д.* До питання про роль осмотичних процесів під час раннього ембріогенезу ссавців, використання трансплантації ембріонів в селекції і відтворенні сільськогосподарських тварин // Матеріали Міжнар. науково-виробничої конф.– Асканія-Нова, 1997.– С. 12.
4. *Медведовський О. В.* Підвищення технологічності низькотемпературної консервації ембріонів корови при використанні кріопротекторів з різною проникністю: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук.– Харків, 1996.– 22 с.
5. *Осташко Ф. И.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.– Киев: Урожай, 1968.– 74 с.
6. *Leibo S. P.* Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos // The Freezing of Mammalian Embryos (Ciba Foundation Symposium 52).– Elsevier, Amsterdam, 1977.– P. 69–94.
7. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. M. Y.* A two-factors hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res.– 1972.– 71.– P. 345–355.
8. *Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H.* Freezeability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages // Theriogenology.– 1992.– 37.– P. 839–850.
9. *Niemann H.* Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs // Theriogenology.– 1991.– 35.– P. 109–124.
10. *Niemann H.* Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10 °C // Theriogenology.– 1985.– 23.– P. 213.
11. *Schneider U., Mazur P.* Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos // Theriogenology.– 1984.– 21.– P. 68–79.
12. *Toner M., Cravalho E. G., Ebert K. M., Overstrom E. W.* Cryo-biophysical properties of porcine embryos // Biol. Reprod.– 1986.– 34.– P. 98.
13. *Weber P. K., Youngs C. R.*. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos // Theriogenology.– 1994.– 41.– P. 1291–1298.

Поступила 21.11.2000

lumes ratio, under the determining of blastocyst osmotic parameters allows to consider the peculiarities of their volume change in non-isotonic solutions, quantitatively describes the qualitative changes of blastocysts during the development and can be used for describing the mammalian early embryogenesis. The blastocoele's content is the hypertonic solution and the hypertonicity extent rises with the embryo development.

The osmotic content of pre-implantation porcine embryos of late development stages is determined. It is found that with the embryo development the osmotically inactive substances volume decreases and it results probably from expenditure of these substances as an energetic and plastic material.

REFERENCES

1. *Bezugly N. D.* Osmotic response of mammalian oocytes and embryos under cryopreservation: Thesis of Cand. of Biol. Sci.– Kharkov, 1984.– 218 p.
2. *Bezugly N. D.* Low temperature preservation of oocytes and embryos in biotechnology of agricultural animals reproduction: Thesis of Doctor of Agricult. Sci.– Kharkov, 1995.– 333 p.
3. *Bezugly N. D.* To the problem of osmotic processes role at mammalian early embryogenesis, usage of embryos transplantation in agricultural animals selection and reproduction // Materials of the International Science and Production Conference.– Askania-Nova, 1997.– P. 12.
4. *Medvedovsky O. V.* Increase in technique of cow embryos cryopreservation using cryoprotectants with various permeable ability: Author's abstract of the thesis of Cand. of Agricult. Sci.– Kharkov, 1996.– 22 p.
5. *Ostashko F. I.* Deep freezing and long-term storage of mature male sperm.– Kiev: Urozhay, 1978.– 734 p.
6. *Leibo S. P.* Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos // The Freezing of Mammalian Embryos (Ciba Foundation Symposium 52).– Elsevier, Amsterdam, 1977.– P. 69–94.
7. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. M. Y.* A two-factors hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res.– 1972.– 71.– P. 345–355.
8. *Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H.* Freezeability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages // Theriogenology.– 1992.– 37.– P. 839–850.
9. *Niemann H.* Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs // Theriogenology.– 1991.– 35.– P. 109–124.
10. *Niemann H.* Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10 °C // Theriogenology.– 1985.– 23.– P. 213.
11. *Schneider U., Mazur P.* Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos // Theriogenology.– 1984.– 21.– P. 68–79.
12. *Toner M., Cravalho E. G., Ebert K. M., Overstrom E. W.* Cryo-biophysical properties of porcine embryos // Biol. Reprod.– 1986.– 34.– P. 98.
13. *Weber P. K., Youngs C. R.*. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos // Theriogenology.– 1994.– 41.– P. 1291–1298.

Accepted in 21.11.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.111.615.361-014.413

UDC 612.111.615.361-014.413

Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500

Л. А. БАБИЙЧУК, Н. Г. ЗЕМЛЯНСКИХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Optimization and Advantages of Washing-out Method for Erythrocytes Cryopreservation with Peo-1500

L. A. BABIJCHUK, N. G. ZEMLYANSKIKH

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

Определена оптимальная концентрация криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов по разработанному безотмывочному методу, при которой достигается максимальная сохранность клеток после размораживания. Разработан метод удаления криопротектора в случае необходимости трансфузии больших объемов эритромассы. Обоснованы преимущества данного метода по сравнению с существующими.

Визначена оптимальна концентрація кріопротектору ПЕО-1500 для кріоконсервування еритроцитів за розробленим безвідмивним методом, при якій досягається максимальна цілість клітин після розморожування. Розроблено метод видалення кріопротектору у випадку необхідності трансфузії великих об'ємів еритромаси. Обгрунтовано переваги даного методу порівняно з існуючими.

The optimal concentration of PEO-1500 cryoprotectant for erythrocytes' cryopreservation according to the elaborated method was determined, under which the maximum integrity was achieved after thawing. When the transfusion of large erythromass volumes is necessary the method of cryoprotectant removal was worked-out. The advantages of this method in comparison with the existing ones are substantiated.

Долгосрочное хранение клеток крови продолжает оставаться актуальной проблемой современной криобиологии и трансфузиологии. Разработаны различные варианты криоконсервирования клеток донорской крови человека. Наиболее широко вошел в практику низкотемпературных банков нашей страны метод криоконсервирования эритроцитов с ограждающим раствором ЦНИИГПК 11 [1, 2, 5], основу которого составляет глицерин в конечной концентрации 15%. Однако применение глицерина, как и других криопротекторов, хорошо проникающих в клетку и создающих в ней условия гиперосмолярности, обусловливает необходимость удалять криопротектор после размораживания клеток. Это существенно усложняет и удорожает процедуру получения качественных деконсервированных клеток, пригодных для практического применения. Поэтому наиболее перспективно создание безотмывочных методов криоконсервирования эритроцитов с использованием непроникающих в клетку криопротекторов (ГЭК, ПЭГ, ПВП). Однако их применение при замораживании эритроцитов не всегда дает высокие положительные результаты [6, 7, 9], что связано, прежде всего, с отрицательным влиянием этих криопротекторов на структуру плазматической мембраны эритроцитов, которая становится высокопроницаемой для ионов, метаболитов и белков. Это свидетельствует о необходи-

Long-term storage of blood cells has remained to be an actual problem of current cryobiology and transfusiology. Different variants of cell cryopreservation of human donor's blood are elaborated. The methods for erythrocytes preservation with protecting solution, produced by Central R&D Institute of Blood Transfusion [1, 2, 5], is widely introduced into a practice of low temperature banks in our country; glycerol under 15% final concentration is the base of its composition. However, application of glycerol, as well as other cryoprotectants, penetrating into a cell and forming there hyperosmolarity conditions, stipulates the necessity to remove cryoprotectant after cell thawing. This fact significantly complicates and makes more expensive the procedure of the obtaining of qualitative frozen-thawed cells, suitable for practical application. Therefore the creation of washing-out methods for erythrocytes cryopreservation using non-penetrating cryoprotectants (HES, PEG, PVP) is the most perspective way. Their application when freezing erythrocytes sometimes is not efficient [6, 7, 9], that is connected, first of all, to the negative effect of these cryoprotectants on the structure of erythrocytes plasmatic membrane, which becomes highly-penetrating for ions, metabolites and proteins. This fact testifies to the necessity of further improvement of cryopreservation methods, considering damages in membrane structure and cytoskeleton proteins, playing an important role in the maintenance of cell stability

Матеріал, захищений авторським правом

мости дальнейшего усовершенствования методов криоконсервирования, учитывая повреждения мембранных структур и белков цитоскелета, которые играют важную роль в поддержании стабильности клеток и репарации криоповреждений, в цикле замораживания-отогрева клеток.

Нами была испытана эффективность ряда криопротекторов: поливинилпирролидона, гидроксиэтилкрахмала и полиэтиленоксидов различных молекулярных весов. В ходе экспериментов выяснилось, что среди указанных непроникающих криопротекторов наиболее выраженным защитным действием обладает ПЭО-1500, который может использоваться для криоконсервирования клеток [6].

В [8] описан следующий метод криоконсервирования эритроцитов: клетки перед замораживанием одномоментно смешивали с 40%-м водным раствором ПЭО-1500 и выдерживали при температуре 22 °С, после чего их замораживали до –196 °С. Выяснилось, что такой метод обеспечивает сохранность 88% клеток сразу после размораживания, но более 50% эритроцитов подвергаются гемолизу после переноса их в изотонические условия. При использовании этого метода, во-первых, экспонирование эритроцитов с ПЭО-1500 производили при 22 °С, т.е. в условиях, когда текучесть липидов мембран эритроцитов сохраняется на достаточно высоком уровне, что позволяет изменять проницаемость для ионов и биомолекул в процессе химического взаимодействия мембраны и криопротектора. Во-вторых, взвеси эритроцитов с раствором криопротектора смешивали одномоментно и достаточно быстро, а концентрацию криопротектора доводили до конечной при непрерывном его добавлении. Такая процедура приводит к неадекватной дегидратации клеток за время, недостаточное для осмотической и структурной адаптации к действию криопротектора. Кроме того, клетки в процессе добавления криопротектора при 22 °С выдерживали при постоянной его концентрации в течение 30–60 мин, что отрицательно влияло на структурно-функциональные параметры плазматической мембраны клеток. В-третьих, используемый водный раствор ПЭО-1500 не способен обеспечить ионный баланс между внутренней и наружной средой клетки, что приводит к потере части электролитов, а 40%-я концентрация ПЭО-1500 вызывает сильную агглютинацию эритроцитов. Это может в значительной степени влиять на возрастание осмотической хрупкости клеток после переноса в изоосмотические условия. Поэтому при работе с данным криопротектором мы считали необходимым выдержать определенные условия, чтобы "адаптировать" плазматическую мембрану клеток и белки цитоскелета к действию пониженной температуры и этого непроникающего криопротектора с целью предотвратить температурный и осмотический шок [3].

В [4] было показано, что снижение температуры инкубации эритроцитов с ПЭО-1500 до 0 °С и его

and cryodamage reparation, under the cycle of cell freeze-thawing.

The efficiency of the series of cryoprotectants: (polyvinylpyrrolidone, hydroxyethylstarch, polyethyleneoxides of various molecular weight) was tested by us. During the experiment it was revealed, that among the mentioned non-penetrating cryoprotectants PEO-1500, which could be used [6] for cell cryopreservation possessed the most manifested protective effect.

The following method for erythrocytes cryopreservation was described [8]: the cells before freezing were simultaneously mixed with the PEO 40% aqueous solution and stored under 22 °C temperature, then were frozen down to –196 °C. It was revealed, that such a method provided the integrity of 88% of cells just after thawing, but more than 50% of erythrocytes were subjected to hemolysis after their transfer into isotonic conditions. In this method, first of all, erythrocytes exposure with PEO-1500 was carried-out under 22 °C, i.e. under the conditions, when lipid fluidity in erythrocyte membranes was kept at quite a high level, that allowed to change permeability for ions and biomolecules during the process of chemical interaction of a membrane and cryoprotectant. Then, erythrocytes suspension with the cryorpotectant solution was simultaneously and rapidly mixed, and cryoprotectant concentration was gradually approached to the final one when it was added continuously. Such a procedure results in a non-adequate cell dehydration within the period, not enough for osmotic and structural adaptation to the effect cryoprotectant. Besides, the cells within the process of cryoprotectant adding under 22 °C were kept within 30–60 min under its constant concentration, this fact negatively affected the structural and functional parameters of the cell plasmatic membrane. Then, used by us PEO-1500 aqueous solution is not able to provide ionic balance between an inner and outer medium of a cell, which results to the loss of some electrolytes, and 40% PEO-1500 concentration causes a strong agglutination of erythrocytes. This may significantly affect an increase of cell osmotic fragility after their transfer into isoosmotic conditions. Thus, when working with given cryoprotectant we considered, that it was necessary to keep certain conditions for the "adaptation" of the cell plasmatic membrane and cytoskeleton proteins to the effect of the decreased temperature and this nonpeneetrating cryoprotectant with the aim of the temperature and an osmotic shock prevention [3].

It was shown [4], that the temperature decrease of erythrocytes incubation with PEO-1500 down to 0 °C and its dosed introduction into the suspension resulted to the decrease of the number of binding with cells cryoprotectant, correlated with the increase of erythrocytes stability to the effect of freeze-thawing factors. Such a regimen limited the impairment of different cell shapes and promoted to the integrity of the barrier characteristics of plasmatic membrane during the cryopreservation process. It was established,

Матеріал, захищений авторським правом

дозированное введение в суспензию приводят к уменьшению количества связывающегося с клетками криопротектора, что коррелирует с увеличением устойчивости эритроцитов к действию факторов замораживания-отогрева. Такой режим ограничивает повреждение различных форм клеток и способствует сохранению барьерных свойств плазматической мембраны в процессе криоконсервирования. Установлено, что повышение устойчивости эритроцитов после обработки при 0 °С по сравнению с инкубацией при 22 °С во многом определяется модификацией белков цитоскелета, которые удерживают форму и объем клеток в данных экспериментальных условиях.

Исходя из этого был разработан принцип "холодовой стабилизации" эритроцитов перед криоконсервированием, заключающийся в том, что после удаления плазмы к эритромассе при 0 °С дозированно добавляют раствор криопротектора ПЭО-1500. Такой режим подготовки способствует повышенной устойчивости клеток к последующему замораживанию-отогреву, что проявляется в снижении уровня гемолиза сразу после отогрева суспензии и особенно в уменьшении осмотической хрупкости клеток после переноса их в среды с физиологической тоничностью по сравнению с клетками, преинкубированными перед замораживанием при комнатной температуре.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было определение оптимальной концентрации криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов, разработка метода удаления криопротектора при необходимости переливания больших объемов эритромассы, а также сравнение разработанного безотмывочного метода криоконсервирования с существующими.

Объектом исследования служили эритроциты донорской крови человека, заготовленные на консерванте Глюгицир 7б. Основой растворов ПЭО-1500 были 150 мМ NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, *pH* 7,4. Эритроциты после удаления плазмы обрабатывали криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С дозированно в течение 40 мин, 1:1 по объему. После этого клетки замораживали до –196 °С в пластиковых одноразовых контейнерах, размораживали на водяной бане при температуре 42–44 °С с постоянным их покачиванием. Эксперименты были проведены на больших объемах крови (400–600 мл).

Выживаемость эритроцитов после размораживания рассчитывали по формуле

$$\mathrm{Rec} = \frac{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V}{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V + \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}} \cdot 100\%,$$

где Hg_{RBC} – концентрация гемоглобина в эритромассе; V – объем эритромассы; $\mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}$ – концентрация гемоглобина в супернатанте; V_{super} – объем супернатанта.

that an increase of erythrocytes stability after the treatment under 0#C in comparison with the incubation under 22 °C is mainly, determined by the modification of protein cytoskeleton, which keep cellular shape and volume under given experimental conditions.

The principle of erythrocytes cold "stabilization" before cryopreservation, consisting in the fact, that after the plasm removal under 0 °C the solution of PEO-1500 cryoprotectant is added by dose to erythromass. Such a preparation regimen promotes to the increased cell stability to further freeze-thawing, what is manifested in the decrease of hemolysis level just after the suspension thawing and especially in the decrease of cell osmotic fragility after their transfer into the medium with physiological tonicity in comparison with the cells, preliminary incubated before freezing under a room temperature.

Taking into consideration the data, mentioned above, the aim of given work was the determination of the optimum concentration of PEO-1500 cryoprotectant for erythrocytes cryopreservation, the elaboration of the method for cryoprotectant removal when the transfusion of erythromass of big volume is necessary, as well as the comparing of the elaborated washing-out method for cryopreservation with existed ones.

Erythrocytes of human donors' blood, prepared on 7b Glugicyr cryoprotectant were the objects under study. 150 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, *pH* 7.4 were the base of PEO-1500 solutions. Erythrocytes after plasm removal were treated by PEO-1500 cryoprotectant under 0 °C by dosage within 40 min, on the volume of 1:1. Then the cells were frozen down to –196 °C in plastic disposable containers, thawing was carried-out on a water base under 42–44 °C temperature with their regular swinging. Experiments were conducted with big volumes of blood (400–600 ml).

Erythrocytes recovery after thawing was calculated by the formula:

$$\mathrm{Rec} = \frac{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V}{\mathrm{Hg}_{RBC}\, V + \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}} \cdot 100\%,$$

where – hemoglobin concentration in erythromass; V – volume of erythromass; $\mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}$ – hemoglobin concentration in supernatant; V_{super} – volume of supernatant.

Osmotic fragility was calculated by the formula:

$$100\% - \frac{\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}\, V - \mathrm{Hg}_{\mathrm{super}}\, V_{\mathrm{super}}}{\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}\, V} \cdot 100\%,$$

where $\mathrm{Hg}_{\mathrm{total}}$ – hemoglobin concentration in blood; V – volume of blood.

When detecting optimum concentration of PEO-1500 for erythrocytes cryopreservation the series of solutions with the increasing concentrations (20, 25, 30, 35, 40%) were used.

Матеріал, захищений авторським правом

Осмотическую хрупкость определяли после переноса аликвоты криоконсервированных эритроцитов в физиологический раствор NaCl в соотношении 1:10 и оценивали процент погибших клеток. Расчет проводили по формуле

$$100\% - \frac{Hg_{total}\,V - Hg_{super}\,V_{super}}{Hg_{total}\,V} \cdot 100\%,$$

где Hg_{total} – концентрация гемоглобина в крови; V – объем крови.

При определении оптимальной концентрации криопротектора ПЭО-1500 для криоконсервирования эритроцитов был использован ряд растворов нарастающих концентраций (20, 25, 30, 35, 40%).

Как видно из данных, представленных в табл. 1, максимальная сохранность клеток после размораживания и переноса в 0,15 М NaCl наблюдалась в 30%-м растворе ПЭО-1500. Исходя из этого можно заключить, что наиболее оптимальным защитным раствором для криоконсервирования эритроцитов является 30%-й раствор ПЭО-1500.

Таблица 1

Выживаемость эритроцитов после размораживания в зависимости от концентрации ПЭО-1500

Концентрация ПЭО-1500, %	Выживаемость клеток после размораживания, %	Осмотическая хрупкость после переноса в 0,15 М NaCl, %
20	89	55
25	98	35,6
30	99	23
35	98	27
40	Hg_{RBC} не определяли из-за сильной агглютинации клеток	63

В настоящее время показано, что ПЭО молекулярной массы от 400 до 4 000 относится к веществам низкой токсичности. При изучении зависимости токсического эффекта ПЭО от его молекулярной массы было установлено, что с увеличением последней токсичность полимера понижается [6]. Сейчас накоплена значительная информация о токсичности ПЭО при однократном и повторном внутривенном введении. Получить указанные данные очень важно для решения вопроса о предельно допустимых дозах полимера в связи с использованием его в качестве криопротектора, не требующего отмывания из размороженной клеточной взвеси перед трансфузией. Опыты на мышах, крысах, кроликах показали [6], что безопасным является внутривенное введение им раствора ПЭО разных молекулярных масс в 10–15%-й концентрации и дозах до 1 г/кг массы животного. В течение первых суток основная масса препарата в неизменном состоянии выводится из организма. Куммулятивное действие ПЭО не установлено.

Особого внимания заслуживает исследование токсико-фармакологической характеристики ПЭО-1500 в связи с перспективой применения его в качестве криопротектора при криоконсервировании эритро-

As the Table 1 showed, the maximum integrity of cells after thawing and their transfer into 0.15 M NaCl was observed in the 30% PEO-1500 solution. Taking into consideration this fact, it should be concluded, that the 30% solution of PEO-1500 is the most optimum protective solution for erythrocytes cryopreservation.

Table 1

Erythrocytes viability after thawing depending on the PEO-1500 concentration

PEO-1500 concentration, %	Cell viability after thawing, %	Osmotic fragility after the transfer into 0.15 M NaCl, %
20	89	55
25	98	35,6
30	99	23
35	98	27
40	Hg_{RBC} was not determined due to intensive cell agglutination	63

Nowadays it was shown that PEO with the molecular mass from 400 to 4 000 was considered as the substance with low toxicity. When studying dependence of the toxic effect of PEO on its molecular mass, it has been established, that polymer toxicity decreased together with its increase [6]. A significant information about PEO toxicity under its single and repeated intravenous injection was accumulated nowadays. It is very important to obtain this information for solving the question on the maximum assumed doses of polymer in respect of its usage as a cryoprotectant, which does not require washing-out from a frozen-thawed suspension before transfusion. Experiments in mice, rats and rabbits demonstrated [6], that intravenous injection of PEO with various molecular masses in 10–15% concentrations to them in the doses up to 1 g/kg of the mass of animal was safe. Within the first two days the main mass of the preparation in a permanent state is removed from an organism. Cumulative effect of PEO was not established.

The investigation of toxico-pharmacological characteristics of PEO-1500 in respect of the perspective of its application as a cryoprotectant under erythrocytes cryopreservation without following washing-out of the frozen-thawed cells is of great importance. The data on PEO-1500 toxicity during its intravenous injection were obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [7]. It has been established that the 1/20th–1/30th DL_{50} of the doses of PEO-1500 are considered as assumed for parenteral injection with frozen-thawed erythro-polyethylene oxide mixture and recommended for clinical investigation of the cryoprotectant. Such a quantity of PEO-1500 can comprise 0.5–1.0 l of frozen-thawed erythrocyte suspension. The necessity of removal of the PEO-1500 surplus after erythrocytes' thawing can appear if the application of big quantity of erythromass is recommended. In this connection we carried-out the

Матеріал, захищений авторським правом

цитов без последующего отмывания оттаянных клеток. Данные о токсичности ПЭО-1500 при внутривенном введении получены в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [7]. Было установлено, что дозы 1/20–1/30 DL_{50} ПЭО-1500 считаются допустимыми для парентерального введения с оттаянной эритроцито-полиэтиленоксидной смесью и рекомендованы для клинического изучения криопротектора. Такое количество ПЭО-1500 может содержать 0,5–1,0 л оттаянной эритроцитарной взвеси. Если в клинической ситуации показано применение большого объема эритроцитарной массы, может возникнуть необходимость удаления избытка ПЭО-1500 после размораживания эритроцитов. В связи с этим нами были проведены эксперименты для подбора определенных оптимальных условий удаления криопротектора ПЭО-1500 после размораживания эритроцитов. При этом мы исходили из следующих рассуждений:

1) ПЭО-1500 является непроникающим в клетки криопротектором и, следовательно, при его добавлении в них не создаются условия гиперосмолярности, как в случае с проникающими криопротекторами, а это значит, что для удаления ПЭО-1500 убывающие концентрации гипертонических растворов NaCl (как при отмывании глицерина) не являются необходимыми;

2) при переливании размороженной взвеси эритроцитов в русло крови реципиента клетки попадают в изотонические условия;

3) разработанный нами метод холодовой "стабилизации" эритроцитов в значительной степени повышает осмотическую устойчивость клеток при переносе их в среды с физиологической тоничностью.

Поэтому для удаления криопротектора после размораживания эритроцитов мы использовали физиологический раствор NaCl, который добавляли к суспензии в равном объеме, перемешивали и центрифугировали при 1 000 об/мин в течение 10 мин, после чего надосадок удаляли. Выживаемость эритроцитов составляла после размораживания 98,8, после удаления ПЭО-1500 — 89,2%, а осмотическая хрупкость — 19,4%. Эти данные свидетельствуют, что если необходимо переливать большой объем крови, замороженной по разработанному методу, избыток ПЭО-1500 может быть довольно просто и быстро удален из размороженной взвеси. При этом эритроциты сохраняют хорошую выживаемость, а осмотическая хрупкость их не превышает допустимых для трансфузии величин.

Как уже было сказано выше, в настоящее время для криоконсервирования эритроцитов донорской крови в нашей стране и за рубежом широко применяется глицериновый метод. Этот метод требует больших материальных затрат и является довольно трудоемким в связи с трехкратным отмыванием эритроцитов перед трансфузией.

experiments for the selection of optimum conditions for the removal of PEO-1500 cryoprotectant after erythrocytes freeze-thawing. In our discussions we proceeded from the following factors:

1) PEO-1500 is non-penetrating into cells cryoprotectant and, therefore, there are no hyperosmolarity conditions after its adding to them, as in the case with penetrating cryoprotectants, and this means, that for the removal of PEO-1500 the decreasing concentrations of NaCl hypertonic solutions (in the case with glycerol washing-out) are not essential;

2) during the transfusion of frozen-thawed erythrocytes suspension into the recipient's blood channel the cells occur under isotonic conditions;

3) the method for erythrocytes' cold "stabilization" elaborated by us, significantly increases cell osmotic stability under their transfer into the media with physiological tonicity.

Thus, for the cryoprotectant removal after erythrocytes' freeze-thawing, NaCl physiological solution we used NaCl physiological solution, added to the suspension in an equal volume, mixed and centrifuged at 1 000 rot/min within 10 min. Then supernatant was removed. Erythrocytes survival after thawing made 98.8%, after the removal of PEO-1500 it was 89.2%, osmotic fragility made 19.4%. These data testify, that PEO-1500 surplus can be quite simply and rapidly removed from the frozen-thawed suspension, if it is necessary to transfuse a big volume of blood. Thereat erythrocytes keep a high viability, and their osmotic fragility did not exceed the values, permissible for transfusion.

As it was mentioned above, nowadays the glycerol method, is widely applied for erythrocytes cryopreservation of donor's blood in our country and abroad. This method require significant expenses and it is labor-consuming due to the three-fold washing-out of erythrocytes before the transfusion.

The works [9] on the elaboration of the washing-out method for erythrocytes cryopreservation on the base of hydroxyethylstarch non-penetrating cryoprotectant with 200 000 m.m., used in 25% concentration, are carried-out. In this connection we considered, that a comparative study of the washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500 elaborated by us, and other methods was necessary.

Experiments were conducted with big volumes of blood (total volume of the suspension — 400 ml), freezing was carried-out in plastic containers. In the experiments 30% PEO-1500 under 0 °C within 40 min, 30% glycerol and 25% hydroxyethylstarch with 200 000 m.m. were added to 200 ml of erythromass after plasm removal. Then the cells were frozen by containers immerging into a liquid nitrogen. Thawing was carried-out according to the mentioned above method. The data obtained (Table 2) testify, that the

Матеріал, захищений авторським правом

Ведутся работы [9] по созданию безотмывочного способа криоконсервирования эритроцитов на основе непроникающего криопротектора гидроксиэтилкрахмала с м.м. 200 000, который используется в 25%-й концентрации. В связи с этим мы считали необходимым сравнить разработанный нами безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 с другими методами.

Эксперименты выполняли на больших объемах крови (общий объем суспензии – 400 мл), замораживание проводили в пластиковых контейнерах. В опытах после удаления плазмы к 200 мл эритромассы добавляли: 30%-й ПЭО-1500 при 0 °С в течение 40 мин; 30%-й глицерин; 25%-й гидроксиэтилкрахмал с м.м. 200 000, после чего клетки замораживали погружением контейнеров в жидкий азот. Размораживание проводили, как было описано выше. Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют, что наиболее высокая выживаемость клеток после размораживания наблюдается у эритроцитов, замороженных по разработанному нами методу, и она практически в 2 раза выше, чем у клеток, криоконсервированных с гидроксиэтилкрахмалом.

Таблица 2

Выживаемость эритроцитов, криоконсервированных различными методами, после размораживания

Выживаемость эритроцитов, %		
30%-й ПЭО-1500	30%-й глицерин	25%-й ГЭК
98,0	91,2	46,0
98,8	92,0	56,8
98,9	94,2	54,9
95,8	89,8	40,1
97,9	91,8	49,5

Поскольку при использовании глицерина клетки после размораживания необходимо отмыть, а большой гемолиз при криоконсервировании с ГЭК также требует отмывания эритроцитов, мы провели эксперименты, в которых эритроциты после размораживания отмывали следующим образом:

1) к суспензии эритроцитов с ПЭО-1500 добавляли равный объем 0,9%-го NaCl, как это было разработано для удаления криопротектора, и центрифугировали;

2) суспензию эритроцитов с глицерином центрифугировали, надосадок удаляли и к осадку добавляли равный объем 3,5%-го NaCl, затем центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин, после чего еще дважды отмывали 0,9%-м NaCl согласно стандартной процедуре для глицеринового метода;

3) к суспензии эритроцитов с ГЭК добавляли равный объем 0,9%-го NaCl, центрифугировали, однако при большом гемолизе после отмывки требовалось повторное отмывание.

Выживаемость эритроцитов после размораживания и последующего отмывания составляла: с

highest cell viability after thawing is observed in the erythrocytes, frozen on the method elaborated by us; this viability is practically twice higher in comparison with the cells, cryopreserved with hydroxyethylstarch.

Table 2

Erythrocytes viability, cryopreserved by different methods after thawing

Erythrocytes viability, %		
30% PEO-1500	30% glycerol	25% HES
98.0	91.2	46.0
98.8	92.0	56.8
98.9	94.2	54.9
95.8	89.8	40.1
97.9	91.8	49.5

Since it is necessary to wash-out the cells after freeze-thawing when using glycerol, and intensive hemolysis during cryopreservation with HES also require erythrocytes washing-out, we have conducted the experiments, where erythrocytes after thawing were washed-out according to the following method:

1) an equal quantity of 0.9 NaCl, as it was elaborated for cryoprotectant removal, was added to erythrocytes suspension;

2) erythrocytes suspension with glycerol was centrifuged, supernatant was removed and an equal quantity of 3.5% NaCl was added to supernatant, then centrifuged under 3 000 rot/min within 5 min, twice washed-out by 0.9% NaCl according to the standard procedure for the glycerol method;

3) an equal quantity of 0.9% NaCl was added to the erythrocytes suspension with HES, centrifuged, however, under an intensive hemolysis after washing-out the secondary washing-out was required.

Erythrocytes viability after thawing and further washing-out made: with PEO-1500 – 86.2 ± 3.2, with glycerol – 87.1 ± 2.8, with HES – from 7.1 to 29.4%.

The data obtained testify, that the washing-out method for erythrocytes cryopreservation with PEO-1500, elaborated by us, allows to increase significantly the cells viability after thawing and especially after their transfer into the media with physiological tonicity (in comparison with the other methods for erythrocytes cryopreservation with non-penetrating cryoprotectants), to make the procedure of obtaining of qualitative frozen-thawed cells cheaper and more simple comparing to the methods for erythrocytes cryopreservation with non-penetrating cryoprotectants, which require their removal from cells after thawing.

Thus the washing-out method for erythrocytes cryopreservation, elaborated by us, is more perspective in comparison with the existed ones, and can find a wide application in a practical medicine. Thereat the question of the increase of cell stability to the effect of low temperature and osmotic factors, as well as

Матеріал, захищений авторським правом

ПЭО-1500 – 86,2 ± 3,2, с глицерином – 87,1 ± 2,8, с ГЭК – от 7,1 до 29,4%

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный безотмывочный способ криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 позволяет в значительной степени повысить выживаемость клеток после размораживания и особенно после переноса их в среды с физиологической тоничностью (по сравнению с существующими методами криоконсервирования эритроцитов с непроникающими криопротекторами), а также в значительной степени упрощает и удешевляет процедуру получения качественных деконсервированных клеток по сравнению с методами криоконсервирования эритроцитов с проникающими криопротекторами, требующими удаления их из клеток после размораживания.

Таким образом, разработанный нами безотмывочный метод криоконсервирования эритроцитов является более перспективным по сравнению с существующими и может найти широкое применение в практической медицине. При этом остается открытым вопрос о детальных механизмах повышения устойчивости клеток к действию низкотемпературных и осмотических факторов, а также замораживания в условиях предварительного экспонирования эритроцитов при 0 °С и циклического введения ПЭО-1500.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аграненко В. А., Виноград-Френкель Ф. Р., Федорова Л. И. и др.* Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии: Метод. рекомендации.– М.: МЗ СССР, 1980.– 47 с.
2. *Аграненко В. А., Федорова Л. И.* Замороженная кровь и ее клиническое применение.– М.: Медицина, 1983.– 96 с.
3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А., Бабийчук Л. А. и др.* Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология.– 1985.– № 2.– С. 25–32.
4. *Белоус А. М., Гулевский А. К., Бабийчук Л. А. и др.* Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология.– 1990.– № 4.– С. 3–14.
5. *Виноград-Френкель Ф. Р., Федорова Л. И., Семенова Н. Р. и др.* Усовершенствование криоконсервирования эритроцитов при ультранизких температурах (от –150 до –196 °С) // Пробл. гематологии и переливания крови.– 1980.– № 9.– С. 19–23.
6. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 204 с.
7. *Терехов Н. Т., Петров М. М.* Клиническое применение консервированных эритроцитов.– Киев: Здоров'я, 1979.– 166 с.
8. *А.с. № 560613*, СССР. Способ консервирования эритроцитов / Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, Л. П. Бредихина и др. Заявлено 30.10.75. Опубл. 20.07.77. Бюл. № 21.– С. 18.
9. *Sputtek A., Warnken U. N., Larger R. et al.* Hydroxyethyl starch plasma concentration profiles after administration of HES protected frozen erythrocytes // Abstr. 31st annual meeting of Society for Cryobiology.– Kyoto, Japan, 1994.– P. 97.

Поступила 23.01.2001

freezing under the conditions of the erythrocytes preliminary exposure under 0 °C and cyclic introduction of PEO-1500 remained to be opened.

REFERENCES

1. *Agranenko V. A., Vinograd-Frenkel F. R., Fedorova L. I. et al.* The methods for long-term storage under the frozen state of erythrocytes for transfusion: Method. Recommendations.– M.: Ministry of Health Care of the USSR, 1980.– 47 p.
2. *Agranenko V. A., Fedorova L. I.* Frozen blood and its clinical application.– M.: Meditsina, 1983.– 96 p.
3. *Belous A. M., Bondarenko V. A., Babijchuk L. A. et al.* United method of cell damage under the thermal shock, freezing and posthypertonic lysis // Kriobiologia.– 1985.– № 2.– P. 25–32.
4. *Belous A. M., Gulevsky A. K., Babijchuk L. A. et al.* The role of cytoskeletal proteins in the change of cell stability under the temperature and osmotic effect // Kriobiologia.– 1990.– № 4.– P. 3–14.
5. *Vinograd-Frenkel F. R., Fedorova L. I., Semenova N. R. et al.* Advancing of erythrocytes cryopreservation under ultra-low temperatures (from –150 to –196 °C) // Problems of Hematology and Blood Transfusion.– 1980.– № 9.– P. 19–23.
6. *Pushkar N. S., Shrago M. I., Belous A. M., Kalugin Yu. V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 204 p.
7. *Terekhov N. T., Petrov M. M.* Clinical application of cryopreserved erytrhocytes.– Kiev: Zdorovya, 1979.– 166 p.
8. *Author's* certificate № 560613, USSR. The way of erythrocytes cryopreservation / N. S. Pushkar, M. I. Shrago, L. P. Bredihina et al. Manifested 30.10.75. Published 20.07.77. Bul. № 21.– P. 18.
9. *Sputtek A., Warnken U. N., Larger R. et al.* Hydroxyethyl starch plasma concentrations profiles after administration of HES protected frozen erythrocytes // Abstr. 31st Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Kyoto, Japan, 1994.– P. 97.

Accepted in 23.01.01

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 616.043.849-57.089.36

UDC 57.043: 616.043.849-57.089.36

Влияние трансплантации криоконсервированных клеток фетальной печени человека на регенерацию и функции печени крыс после частичной гепатэктомии

Н. Н. МОИСЕЕВА, С. П. МАЗУР, О. В. ОЧЕНАШКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Transplantation of Cryopreserved Human Fetal Liver Cells on Regeneration and Functions of Rat Liver after Partial Hepatectomy

N. N. MOISEYEVA, S. P. MAZUR, O. V. OCHENASHKO, A. Yu. PETRENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Изучено влияние трансплантации в пульпу селезенки криоконсервированных клеток фетальной печени человека (ККФПЧ) на функциональное состояние регенерирующей печени крыс после 70%-й гепатэктомии. Установлено, что трансплантация ККФПЧ вызывала увеличение массы и скорости регенерации печени крыс через 3 сут после частичной гепатэктомии. Скорость включения ^{3}Н-тимидина в ДНК печени животных через 3 сут после трансплантации ККФПЧ увеличивалась в 2,5 раза по сравнению с контролем (частичная гепатэктомия и введение в селезенку среды криоконсервирования в объеме, равном объему суспензии). Частичная гепатэктомия приводила к 3-кратному увеличению продолжительности медикаментозного сна на протяжении 3-х суток эксперимента, а введение ККФПЧ нормализовало продолжительность сна уже на 2-е сутки. Содержание общего билирубина в контрольной группе снижалось, а в опытной через 2 сут резко возрастало. Повышение уровня билирубина был обусловлен стимуляцией эритропоэза после трансплантации ККФПЧ: количество эритроцитов в сыворотке крови крыс опытной группы значительно превышало контрольные значения. Полученные данные наводят на мысль о существовании двух независимых эффектов трансплантации ККФПЧ (один направлен на стимуляцию регенерации печени, другой — на стимуляцию эритропоэза), а также позволяют рассматривать трансплантацию эмбриональных и фетальных клеток печени как перспективный метод лечения печеночной недостаточности.

Вивчено вплив трансплантації у пульпу селезінки кріоконсервованих клітин фетальної печінки людини (ККФПЛ) на функціональний стан регенеруючої печінки щурів після 70-ї гепатектомії. Встановлено, що трансплантація ККФПЛ приводила до збільшення маси та швидкості регенерації печінки щурів через 3 доби після часткової гепатектомії. Швидкість включення ^{3}Н-тімідіну у ДНК печінки тварин через 3 доби після трансплантаціїККФПЛ підвищувалась у 2,5 рази у порівнянні з контролем(часткова гепатектомія і введення в селезінку середовища кріоконсервування у об'ємі, який дорівнює об'єму суспензії). Часткова гепатектомія приводила до 3-кратного збільшення тривалості медикаментозного сну на протязі 3-добового експерименту, а введення ККФПЛ нормалізувало тривалість сну вже на 2-у добу. Вміст загального білірубіну в контрольній групі знижувався, а в дослідній через 2 доби значно зростав. Підвищення рівня білірубіну було зумовлено стимуляцією еритропоезу після трансплантації ККФПЛ. Кількість еритроцитів у сироватці крові щурів досліної групи значно перевищувала контрольні значення. Отримані результати наводять на думку про існування двох незалежних ефектів трансплантації ККФПЛ (один спрямовано на стимуляцію регенерації печінки, другий — на стимуляцію еритропоезу), а також дають можливість розглядати трансплантацію ембріональних і фетальних клітин печінки як перспективний метод лікування печінкової недостатності.

The effect of cryopreserved human fetal liver cells (CHFLC) transplantation on rat liver regeneration after partial (70%) hepatectomy has been studied. Transplantation of CHFLC increased the liver weight and regeneration rate on the third day after partial hepatectomy. The rate of ^{3}H-thymidine incorporation in rats liver DNA on third day after CHFLC transplantation was in 2.5 times higher compare to control group (partial hepatectomy and intrasplenical injection of equal to cell suspension volume of the medium). Partial hepatectomy resulted in 3 times increase in the duration of hexenal-induced sleep for 3 days of experiments while CHFLS transplantation normalized time of sleep on the second day. The total bilirubin contens decreased weakly after partial hepatectomy in control group and sharply increased on the second day after CHFLC transplantation. The increase in bilirubin contens after CHFLC transplantation correlated with the increase in red blood cell number. The data shows that CHFLC transplantation stimulates both haemopoiesis and liver regeneration in rats. Thus, clinical application of fetal liver cell transplantation may be promising method for treatment of patients with liver failures.

В эмбриогенезе печень выполняет кроветворную функцию. Долевое содержание в ней стволовых кроветворных клеток значительно выше таких источников, как периферическая кровь, костный мозг и кордовая кровь [3]. В связи с этим клетки печени эмбрионов и плодов человека находят все более широкое применение в медицинской практике для лечения заболевания системы кроветворе-

In embryogenesis liver performs the haemopoietic function. Its share content of haemopoietic stem cells is considerably higher comparing with peripheral blood, bone marrow and cord blood [3]. In this connection the liver cells of human embryos and fetuses has gained a wide application in a medical practice for treatment of haemopoietic system diseases of various etiology [8]. At the same time not enough attention

Матеріал, захищений авторським правом

ния различной этиологии [8]. Вместе с тем мало внимания уделяется тому, что, наряду с гемопоэтическими клетками, фетальная печень содержит стромальные клетки — гепатобласты — общие предшественники гепатоцитов и билиарных клеток. Учитывая высокую пролиферативную активность, низкую иммуногенность и полипотентность эмбриональных и плодовых клеток [2], можно предположить эффективность их применения для лечения острой и хронической печеночной недостаточности.

Цель работы — изучение влияния трансплантации суммарной суспензии ККФПЧ на функциональное состояние регенерирующей печени крыс после 70%-й гепатэктомии.

Исследования проводили на самцах линии Вистар весом 150–200 г. Частичную гепатэктомию моделировали по методу Хиггинса и Андерсона [14]. Животным опытной группы одновременно с гепатэктомией в пульпу селезенки вводили суспензию $1 \cdot 10^7$ ККФПЧ, контрольной — равный объем среды криоконсервирования.

Клетки фетальной печени выделяли из эмбрионов 7–12 недель гестации, криоконсервировали под защитой 5%-го диметилсульфоксида по 3-этапной программе замораживания и хранили в жидком азоте. Образцы отогревали на водяной бане при 37 °С за 30 мин до трансплантации. Жизнеспособность суспензии ККФПЧ оценивали по окрашиванию трипановым синим.

Детоксикационную функцию печени изучали по продолжительности медикаментозного сна после введения гексенала (60 мг на 1 кг веса) через 24, 48 и 72 ч после гепатэктомии [12]. Уровень билирубина в сыворотке крови животных определяли спектрофометрически с помощью диагностического набора фирмы "Лахема".

Экспериментальных животных через 3-е суток забивали под наркозом, печень взвешивали и скорость регенерации определяли по формуле [17]

$$R = \frac{W_{reg} - W_{res}}{W_{ect}} \cdot 100\%,$$

где W_{reg} — масса регенерированной печени; W_{res} — масса части печени, оставшейся после гепатэктомии; W_{ect} — масса эктомированной печени.

Для определения пролиферативной активности клеток печени за 1 ч до декапитации крысам вводили внутрибрюшинно 1 МБк ^{3}Н-тимидина. Радиоактивность фракций ДНК определяли на сцинтилляторном счетчике Beckman (США), содержание нуклеотидов ДНК — спектрофотометрически [11].

Жизнеспособность деконсервированной суспензии ККФПЧ составляла не менее 60%. Операции по резекции печени и трансплантации ККФПЧ, проводившиеся под эфирным наркозом, не вызывали летальных исходов животных в контрольной и опытной группах. Активность животных реги-

is given to fact, that along with haemopoietic cells fetal liver contains stromal cells — hepatoblasts — the general progenitors of hepatocytes and biliar cells. Taking into account a high proliferatory activity, low immunogeneity and polypotency [2] their application efficiency for treatment of accute and chronic hepatic insufficiency can be assumed.

The aim of investigation was to study the influence of total CHFLC suspension transplantation on functional state of regenerating rat liver after 70% hepatectomy.

The experiments were carried-out in 150–200 g Wistar rats. Partial hepatectomy was modelled according to Higgins and Anderson method [14]. Simultaneously with hepatectomy in spleen of the experimental group animals the $1 \cdot 10^7$ CHFLC suspension was injected, in the control group animals the same volume of cryopreservation medium was intrasplenically injected.

Fetal liver cells were extracted from embryos of 7–12 weeks gestation term. Cryopreservation was carried-out using 5% dimethyl sulfoxide and 3-stage freezing and storage was conducted in liquid nitrogen. Samples were thawed on water bath at 37 °C 30 min prior to transplantation. CHFLC suspension viability was estimated with trypane blue staining.

Liver detoxication function was studied on the determination of the duration of medicinally induced sleep caused by hexenal injection (60 mg on 1 kg weight) in 24, 48 and 72 hrs after hepatectomy [12]. Bilirubin value in blood serum was determined spectrophotometrically using diagnostic kit (Lachema).

The experimental animals were after 3 days narcotized and killed, livers were weighed and the regeneration rate was determined using formula [17]

$$R = \frac{W_{reg} - W_{res}}{W_{ect}} \cdot 100\%,$$

where W_{reg} — mass of regenerated liver; W_{res} — mass of liver part, remained after hepatectomy; W_{ect} — mass of ectomized liver.

For the determining of liver cells proliferative activity in 1hr before decapitation in rats 1 MBk of ^{3}H-thymidine was intraperitoneally injected. Radioactivity of DNA fractions was determined with scintillation counter (Beckman); the DNA content was spectrophotometrically determined [11].

The viability of thawed CHFLC suspension was not less than 60%. Liver resection and CHFLC transplantation operations carried-out under ether narcosis did not cause the death of animals in the control and experimental group. The animals' activity was found in 30 min after operation. The animals began to eat and to drink after 4 hrs.

The liver mass in 3 days after hepatectomy in the control group (without CHFLC transplantation) was 3.4 ± 0.3 g, in the experimental group it was 4.1 ± 0.4 g. Liver regeneration extent after intrasplenical injection of CHFLC was $71 \pm 3\%$, that was reliably

Матеріал, захищений авторським правом

стрировалась спустя 30 мин после операции. Прием питья и пищи был отмечен через 4 ч.

Масса печени через 3 дня после гепатэктомии в контрольной группе (без трансплантации ККФПЧ) составляла 3,4 ± 0,3 г, а в опытной — 4,1 ± 0,4 г. При этом степень регенерации печени после введения ККФПЧ в селезенку составляла 71 ± 3% и была достоверно выше, чем в контрольной группе (56 ± 4%). Приведенные результаты соответствуют данным: скорость регенерации печени после 70%-й гепатэктомии достаточно высока и через 5–7 дней ее масса достигает исходных значений [10]. Более точную информацию о пролиферативной активности печени можно получить при определении включения меченых предшественников в ДНК. Через 3 дня после гепатэктомии скорость включения ^{3}Н-тимидина в ДНК печени животных контрольной группы составляла $(52 \pm 5{,}15) \cdot 10^3$ имп/мин на 1 мг ДНК. После трансплантации ККФПЧ она увеличивалась в 2,5 раза и составляла $(125{,}4 \pm 10{,}01) \cdot 10^3$ имп/мин на 1 мг ДНК. Данные по регенерации массы печени и включению ^{3}Н-тимидина в ДНК гепатоцитов свидетельствуют о том, что трансплантация ККФПЧ увеличивает скорость пролиферации клеток печени крыс после 70%-й гепатэктомии.

Параллельно с изучением пролиферативной активности печени определялась ее детоксикационная функция. Прижизненно детоксикационная активность печени может быть оценена по элиминации из русла крови ксенобиотиков, метаболизирующихся в печени. В качестве такого ксенобиотика использовали гексенал (1,5-диметил-5-(циклогексен-1-ил)-барбитурат натрия). Применение барбитуратов в медицинской практике основано на их свойстве вызывать состояние физиологического сна. Гексенал является барбитуратом с коротким сроком действия (20–30 мин), быстро разрушается в печени и выводится из организма в течение нескольких часов. Гидроксилирование гексенала осуществляется цитохром P_{450}-зависимой микросомальной системой оксигеназ печени, а последующее окисление — цитозольным ферментом печени с использованием НАДФ$^+$ или НАД$^+$ [4]. Результатом внутрибрюшинного введения гексенала интактным животным являлся сон продолжительностью 18 ± 2 мин (рис. 1). Частичная гепатэктомия приводила к 3-кратному увеличению продолжительности медикаментозного сна на протяжении 3-х суток. Трансплантация ККФПЧ не влияла на продолжительность сна через сутки после гепатэктомии, однако уже спустя 48 ч время сна снижалось до 21 ± 4 мин и не отличалось от исходного уровня. Через 3 дня продолжительность сна у гепатэктомированных животных, которым были трансплантированы ККФПЧ, составляла 19,8 ± 4,4 мин, а в контрольной группе (без трансплантации) — 63 ± 7 мин. Данные о продолжительности медикаментозного сна свидетельствуют о быстром восста-

higher than in the control group (56 ± 4%). The given results correspond to the following data: liver regeneration rate after 70% hepatectomy is quite high and after 5–7 days its mass reaches the starting level [10]. To obtain more exact information about liver proliferative activity we have determined the incorporation of labeled precursors into DNA. By the 3rd day after hepatectomy the rate of ^{3}H-thymidine incorporation into DNA of the control animals' liver was $(52 \pm 5.15) \cdot 10^3$ imp/min for 1 mg of DNA. After CHFLC transplantation it increased in 2.5 times and was $(125.4 \pm 10.01) \cdot 10^3$ imp/min for 1 mg of DNA. The data on liver mass regeneration and ^{3}H-thymidine incorporation into hepatocyte DNA suggest that CHFLC transplantation decreases the proliferation rate of rats liver cells after 70% hepatectomy.

Simultaneously with the study of liver proliferative activity we determined its detoxicative function. Liver detoxicative activity can be estimated in vivo by elimination of metabolising in liver xenobiotics out of blood channel. We used hexenal (sodium 1,5-dimethyl-5-(cyclohexen-1-yl)-barbiturate) as this xenobiotic. Application of barbiturates in medical practice is based on its ability to cause the physiological sleep. Hexenal is a barbiturate with a short validity (20–30 min), rapidly destroyed in liver and released out of an organism within several hours. Hydroxylation of hexenal is performed by cytochrome P_{450}-depending microsomal system of liver oxygenases, and the following oxidation is performed by liver cytosol enzyme using NADP$^+$ or NAD$^+$ [4]. Intraperitoneal injection of hexenal in intact animals resulted in sleep with duration of 18 ± 2 min (Fig. 1). Partial hepatectomy caused the reduction of sleep in 3 times within 3 days. The CHFLC transplantation did not affect the sleep duration by the 1st day after hepatectomy, but after 48 hrs it increased up to 21 ± 4 min and did not

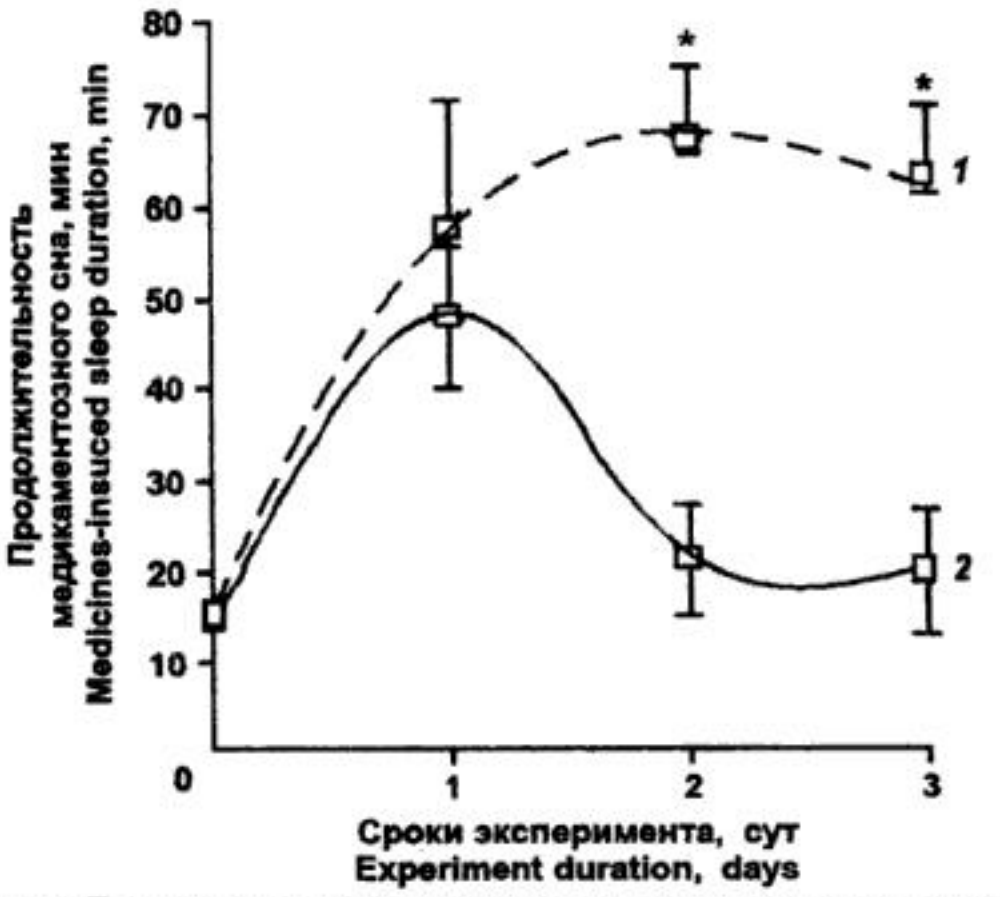


Рис. 1. Продолжительность медикаментозного сна у крыс после 70%-й гепатэктомии (*1*); 70%-й гепатэктомии и трансплантации ККФПЧ (*2*).

Fig. 1. Medicines-induced sleep duration of rats after 70%-hepatectomy (*1*); 70%-hepatectomy and CHFLC transplantation (*2*).

Матеріал, захищений авторським правом

новлении детоксикационной функции регенерирующей печени после трансплантации ККФПЧ.

Другим показателем функциональной активности печени является уровень билирубина в сыворотке крови [6]. Из рис. 2 видно, что частичная гепатэктомия не вызывала значительных изменений в содержании общего билирубина в сыворотке крови крыс в течение суток после операции. На 2-е сутки наблюдалось резкое изменение его уровня. Если в контрольной группе содержание общего билирубина снижалось и составляло 6,8 ± 2,3 мкмоль/л, то в опытной — резко возрастало до 82,0 ± 23,2 мкмоль/л. Через 3-е суток содержание билирубина в сыворотке крови крыс с трансплантированными ККФПЧ снижалось до уровня билирубина контрольных животных. При этом изменение содержания общего билирубина было в основном обусловлено изменением уровня непрямого билирубина, а содержание прямого билирубина не увеличивалось через 2 дня после трансплантации (не приведено). Снижение общего билирубина после частичной гепатэктомии согласуется с данными [10]. Учитывая, что билирубин образуется в процессе распада гемоглобина и других гемсодержащих ферментов (каталазы, пероксидазы, цитохромов и др.), а также порфиринов [6], которые синтезируются в эритробластах костного мозга и гепатоцитах, можно полагать, что снижение его уровня обусловлено удалением части печени и потерей крови во время операции. Причины резкого "всплеска" уровня билирубина на 2-е сутки после введения ККФПЧ требуют отдельного рассмотрения. Известно [3], что в печени плодов ранних сроков развития, выполняющей в основном кроветворную функцию, содержатся ростовые факторы, обеспечивающие дифференциацию стволовых кроветворных клеток в направлении эритропоэза. На основании этого нами было предположено, что описанный "всплеск" уровня билирубина после трансплантации ККФПЧ обусловлен стимуляцией эритропоэза. Из рис. 3 видно, что количество эритроцитов в сыворотке крови крыс опытной группы на 2-е сутки значительно превышало контрольные значения, а на 3-и снижалось, то есть демонстрировало динамику, сходную с уровнем билирубина. Достоверное увеличение количества эритроцитов отмечалось и на 7-е сутки после введения фетальных клеток. Оно можст быть объяснено стимуляцией ККФПЧ собственного эритропоэза у крыс, в то время как кратковременное увеличение количества эритроцитов на 2-е сутки обусловлено эритропоэзом фетальных клеток печени человека и их последующим разрушением иммунной системой хозяина, что и приводит к резкому возрастанию уровня билирубина (рис. 2). Вопрос о возможности временного функционирования фетальных клеток печени человека в организме крысы требует отдельного исследования, однако такую возможность нельзя полностью исключить, учитывая, что

Рис. 2. Концентрация билирубина в сыворотке у крыс после 70%-й гепатэктомии (*1*); 70%-й гепатэктомии и трансплантации ККФПЧ (*2*).

Fig. 2. Bilirubine concentration in rats' blood serum after 70%-hepatectomy (*1*); 70%-hepatectomy and CHFLC transplantation (*2*).

differ from initial level (Fig. 1). By the third day the sleep duration of hepatectomized animals with CHFLC transplantation was 19.8 ± 4.4 min, and in the control group (without transplantation) it was 63 ± 7 min. The data on medicinally induced sleep duration suggest for faster reduction of detoxicative function of regenerating liver after CHFLC transplantation.

Another index of liver functional activity is the bilirubine value in blood serum [6]. As it is seen from Fig. 2 the partial hepatectomy has not caused significant changes in total bilirubine content in rats blood serum during the first day after operation. By the second day the sharp change of its value was observed. Thus in the control group the total bilirubine content was reduced and reached the value of 6.8 ± 2.3 μM/l, and in experimental group it sharply decreases to the value of 82.0 ± 23.2 μM/l. By the third day the bilirubine content in blood serum of rats with transplanted CHFLC decreases to the bilirubine value of the control animals. The changes in total bilirubine content were generally caused by the changes in indirect bilirubine value, but the content of direct bilirubine was not decreased to the 2nd day after transplantation (not given). The decrease of total bilirubine value after partial hepatectomy corresponds to the data [10]. Bilirubine is formed in process of disintegration of haemoglobine, other haem-contained enzymes (catalase, peroxidase, cytochromes etc.) and porphyrines [6], which are synthesised in bone marrow erythroblasts and hepatocytes. Taking this into account, we can believe that bilirubine value decrease is caused by the removal of a part of liver and by blood loss during operation. The reasons of a sharp "burst" in bilirubine value by the second day after CHFLC injection require additional consideration. It is known [3] that early gestation fetal liver, which accomplishes generally haemopoietic function, contains growth factors, providing differentiation of stem cells towards erythropoiesis. Basing on this data we assume that described bilirubine value "burst" after CHFLC transplantation is caused by erythropoiesis stimulation.

Матеріал, захищений авторським правом

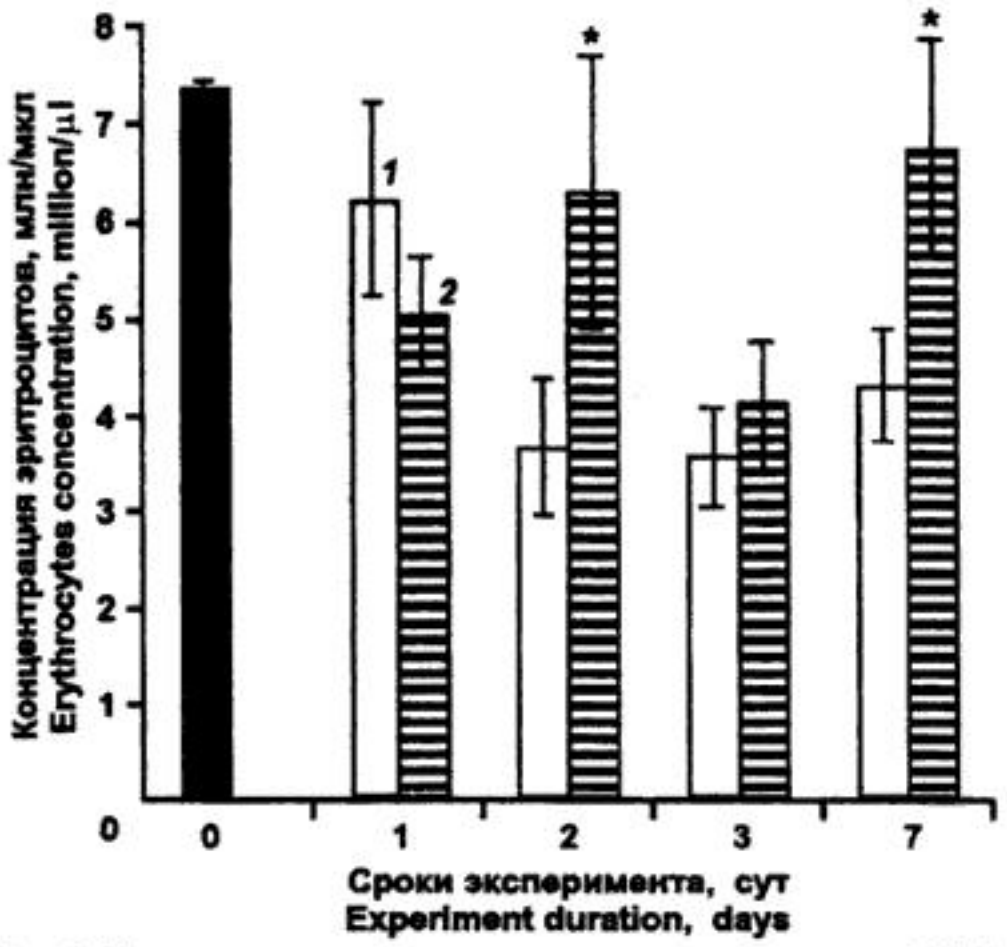


Рис. 3. Концентрация эритроцитов в крови у крыс после 70%-й гепатэктомии (*1*); 70%-й гепатэктомии и трансплантации ККФПЧ (*2*).

Fig. 3. Erythrocytes concentration in blood of rats after 70%-hepatectomy (*1*); 70%-hepatectomy and CHFLC transplantation (*2*).

в клетках эмбрионов и плодов раннего срока гестации, использованных в работе, еще слабо экспрессированы антигены главного комплекса гистосовместимости, что снижает скорость их отторжения. Так, фетальные гепатоциты, трансплантированные взрослым крысам, не только сохраняли жизнеспособность в селезенке не менее 10 недель, но и экспрессировали белки цитохром P_{450}-зависимой системы биотрансформации ксенобиотиков [15]. Кроме того, существует гипотеза, что регенерация печени сопровождается снижением иммунного статуса организма, а это способствует лучшему приживлению трансплантированных клеток [16].

Полученные в работе данные позволяют полагать о реализации двух независимых эффектов трансплантации ККФПЧ, направленных на стимуляцию эритропоэза и регенерацию печени.

Известно, что частичная гепатэктомия включает каскад биохимических реакций, обеспечивающий мобилизацию всех ресурсов организма на регенерацию печени [1]. При этом регенерация печени крыс после 70%-й гепатэктомии происходит исключительно за счет пролиферации дифференцированных гепатоцитов [10]. Дополнительная стимуляция регенерации печени под действием трансплантации ККФПЧ может быть обусловлена вовлечением в пролиферацию стволовых клеток печени крыс, обычно не участвующих в регенерации. При этом механизм стимулирующего действия ККФПЧ на регенерацию печени крыс, очевидно, связан с тем, что фетальные клетки продуцируют и выделяют большое количество ростовых факторов и других биологически активных соединений [13], способных ускорять регенерацию поврежденных тканей. В [7] показано, что введение гепатэктомированным животным экстракта из печени новорожденных крыс ускоряет процесс регенерации.

Fig. 3 shows that erythrocytes amount in blood serum of experimental group rats by the second day significantly exceeds the control values, and by the third day decreases, i.e. it demonstrate the dynamics similar to that for bilirubine. Significant decrease in erythrocytes amount was observed also by the seventh day after fetal cells injection. This can be explained by stimulation of rats' own erythropoiesis caused by CHFLC, while the short-term increase in erythrocytes amount by the second day is caused by erythropoiesis of human fetal liver cells and its following destroying by host immune system, that results in a sharp decrease in bilirubine value (Fig. 2). The possibility of temporary existing of human fetal liver cells in rat's organism requires the another investigation, but this opportunity can not be completely excluded, taking into account a weak expression of main histocompatibility complex antigens in cells of the early gestation term embryos and fetuses, that significantly decreases their rejection rate. So, fetal hepatocytes transplanted in adult rats have both kept their viability in spleen not less than 10 weeks, and expressed proteins of cytochrome P_{450}-dependent xenobiotics biotransformation system [15]. Besides there is a hypothesis that liver regeneration is accompanied by organism immune status reduction that promotes better engrafting of transplanted cells [16].

The obtained investigation data allows us to assume the realisation of two independent effects of CHFLC transplantation, directed to erythropoiesis stimulation and to liver regeneration.

It is known that partial hepatectomy starts the biochemical reaction cascade, which provides a mobilisation of all resources of an organism to liver regeneration [1]. Rats' liver regeneration after 70% hepatectomy occurs just for the account of differentiated hepatocytes proliferation [10]. Additional stimulation of liver regeneration by CHFLC transplantation can be caused by involving into proliferation of rat liver stem cells, that usually are not participating in regeneration. The mechanism of stimulating effect of human fetal liver cells is apparently connected to fetal cells' production and releasing of plenty of growth factors and another biologically active substances [13], which are capable to accelerate damaged tissues regeneration. It is shown [7] that injection in hepatectomized animals of the newborn rats liver extract accelerates the regeneration process. The obtained results show new possibilities for treatment of patients with liver insufficiency by means of transplantation of embryonic and fetal liver cells.

REFERENCES

1. *Belyayeva I. D.* Peculiarities of cells proliferation of rats' regenerating liver // Tsitologiya.– 1973.– 15, № 10.– P. 1297–1301.
2. *Vasilyev N. V., Kolyada T. V., Volyanskiy Yu. L. et al.* About the possible mechanisms of method of fetal cells and tissues therapeutical usage // Transplantation of fetal cells and human cells.– M., 1996.– P. 28–30.

Матеріал, захищений авторським правом

Полученные результаты открывают новые возможности для лечения больных с печеночной недостаточностью путем трансплантации эмбриональных и фетальных клеток печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Беляева И. Д. Особенности пролиферации клеток регенерирующей печени крыс // Цитология.– 1973.– 15, № 10.– С. 1297–1301.*
2. *Васильев Н. В., Коляда Т. В., Волянский Ю. Л. и др.* О возможных механизмах метода терапевтического использования фетальных клеток и тканей // Трансплантация фетальных клеток и клеток человека.– М., 1996.– С. 28–30.
3. *Грищенко В. И., Лобынцева Т. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени.– Киев: Наук. думка, 1988.– 188 с.
4. *Деннис В. Парк.* Биохимия чужеродных соединений.– М.: Медицина, 1973.– 225 с.
5. *Журбин Г. У.* Биохимические изменения в регенерирующей печени животных // Укр. биохим. журн.– 1970.– 42, № 1.– С. 113–129.
6. *Марри Р., Гренер Д., Мейес П., Родуэлл В.* Биохимия человека. Т. 1 / Пер. с англ.– М.: Мир, 1993.– 384 с.
7. *Проскурякова И. С.* Влияние экстракта из печени крыс в ранние часы после частичной гепатэктомии // Пробл. общей патологии хронических процессов в клинике и эксперименте.– Новосибирск, 1977.– С. 96–103.
8. *Репин В. С., Сухих Г. Т.* Медицинская клеточная биология.– М.: БЭБиМ, 1998.– 199 с.
9. *Скакун Н. Н., Саратиков А. С.* Желчеобразование и желчегонные средства.– Томск: Изд-во Томского ун-та, 1977.– С. 96–103.
10. *Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М.* Регенерация печени у млекопитающих.– Л.: Медицина, 1966.– 205 с.
11. *Спирин А. С.* Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия.– 1958.– 23, № 4.– С. 656–662.
12. *Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А.* Проблемы нормы в токсикологии.– М.: Медицина, 1991.– С. 224–225.
13. *Чертков И. Л., Фриенштейн А. Я.* Клеточные основы кроветворения.– М.: Медицина, 1997.– С. 55–66.
14. *Higgins G. H., Anderson R. H.* Experimental pathology of the liver restoration of the liver of white rat following partial swegical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P. 186–188.
15. *Kato K., Kasai S., Onodera K. et al.* Developmental expression of cytochrome P450S within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes // Cell Transplant.– 1996.– 5 (Suppl. 1).– P. S27–S30.
16. *Yazigi N. A., Carrick T. L., Bucuvalas J. C. et al.* Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration // Transplantation.– 1997.– 27, № 64 (6).– P. 816–820.
17. Child C. G., Barr D., Halswarde G. K. Liver regeneration following portal-caval transposition in dogs // Ann. Surg.– 1953.– 136.– P. 136–600.

Поступила 05.09.2000

3. *Grischenko V. I., Lobyntseva T. S., Votyakova I. A., Shereshkov S. I.* Hemapoietic cells of embryonic liver.– Kiev: Naukova Dumka, 1988.– 188 p.
4. *Park D. V.* Biochemistry of alien compounds.– M.: Medizina, 1973.– 225 p.
5. *Zhurbin G. U.* Biochemical changes in regenerating animals' liver // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 1970.– 42, № 1.– P. 113–129.
6. *Marry P., Grener D., Meyes P., Rodwell W.* Human biochemistry. V. 1.– M.: Mir, 1993.– 384 p.
7. *Proskuryakova I. S.* Influence of rat liver extract in the first hours after partial hepatectomy // Problems of general pathology of chronic processes in clinics and in experiment.– Novosibirsk, 1977.– P. 96–103.
8. *Repin V. S., Sukhikh G. T.* Medical cell biology.– M.: Bibl. of Exp. Biol. And Med, 1998.– 199 p.
9. *Skakun N. N., Saratikov A. S.* Bile formation and chologogic means.– Tomsk: Tomsk University Publishing, 1977.– P. 96–103.
10. *Sidorova V. F., Ryabina Z. A., Leykina E. M.* Liver regeneration in mammals.– L.: Medizina, 1966.– 205 p.
11. *Spirin A. S.* Spectrophotometrical determining of total amount of nucleic acids // Biokhimia.– 1958.– 23, № 4.– P. 656–662.
12. *Trakhtenberg I. M., Sova R. E., Sheftel V. O., Onikiyenko F. A.* Problems of the norm in toxicology.– M.: Medizina, 1991.– P. 224–225.
13. *Chertkov I. L., Frienshtein A. Ya.* Cellular bases of haemopoiesis.– M.: Medizina, 1997.– P. 55–66.
14. *Higgins G. H., Anderson R. H.* Experimental pathology of the liver restoration of the liver of white rat following partial swegical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P. 186–188.
15. *Kato K., Kasai S., Onodera K. et al.* Developmental expression of cytochrome P450S within intrasplenically transplanted fetal hepatocytes // Cell Transplant.– 1996.– 5 (Suppl. 1).– P. S27–S30.
16. *Yazigi N. A., Carrick T. L., Bucuvalas J. C. et al.* Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration // Transplantation.– 1997.– 27, № 64 (6).– P. 816–820.
17. Child C. G., Barr D., Halswarde G. K. Liver regeneration following portal-caval transposition in dogs // Ann. Surg.– 1953.– 136.– P. 136–600.

Accepted in 05.09.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.44/447

UDC 57.043: 612.44/447

Влияние димексида на секретирующую способность тироцитов новорожденных поросят

Т. П. БОНДАРЕНКО, С. В. ЛУГОВОЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Dimethyl Sulfoxide Effect on Thyrocyte Secreting Ability of Newborn Piglets

T. P. BONDARENKO, S. V. LUGOVOJ

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

Исследован уровень базальной секреции T_3 и T_4 культуры клеток щитовидной железы новорожденных поросят в зависимости от концентрации ДМСО и двух разных режимов инкубации с криопротектором.

Досліджено рівень базальної секреції T_3 та T_4 культури клітин щитовидної залози новонароджених поросят у залежності від концентрації ДМСО та двох різних режимів інкубації з кріопротектором.

The level of T_3 and T_4 basal secretion of cell culture of new born piglets' thyroid gland, depending on DMSO concentration and two different incubational regimens with cryoprotectant, was investigated.

На сегодняшний день в Украине отмечается рост количества больных с различной патологией щитовидной железы. Значительная часть этих больных страдает гипотиреозом и нуждается в заместительной гормональной терапии, которая не лишена существенных недостатков: невозможность поддерживать гормональный гомеостаз, развитие при длительном применении гормональных препаратов гормонозависимости и гормонорезистентности. В связи с этим получил признание новый перспективный метод лечения — ксенотрансплантация органной культуры щитовидной железы. В экспериментальной клинической практике накоплен значительный опыт трансплантации нативных культур [5, 6, 9]. Однако этот метод имеет ограниченное применение из-за необходимости выращивать каждому конкретному пациенту отдельную культуру, а также неоднозначности ответа на наличие стерильности (некоторые микроорганизмы проявляются только на 14-е сутки). Решить эту проблему можно при создании низкотемпературного банка трансплантационного материала. Первоочередной задачей при разработке метода низкотемпературного хранения биологических объектов является определение оптимальных концентраций криопротекторов, обеспечивающих как структурную, так и функциональную сохранность эндокринной ткани. Цель данного исследования — изучение гормоносекретирующей функции органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят в зависимости от условий введения криопротектора и его концентрации.

Nowadays the growth of a number of patients with different pathology of thyroid gland is noted. A significant part of these patients suffers from hypothyreosis and needs a substitutive hormonal therapy, having such disadvantages as the impossibility to maintain hormonal homeostasis, development of hormone-dependency and hormone-resistance during a long-term application of hormonal preparations. In this connection a new perspective method of treatment — the xenotransplantation of thyroid gland organ culture was recognized. In experimental clinic practics [5, 6, 9] there is a considerable experience in native culture transplantation. However this method has a limited application due to the necessity to cultivate for each patient an individual culture, as well as due to the ununiformity of the response to the safety (some microorganisms are manifested only by the 14th day). This problem may be solved when creating the low temperature bank of transplantational material. A primary task when developing the method of low temperature storage of biological objects is to determine the optimal concentrations of cryoprotectants, providing both sructural and functional integrity of endocrine tissue. The aim of this investigation was to study a hormone-secreting function of newborn piglet's thyroid gland organ culture depending on the conditions of cryoprotectant introduction and its concentration.

Newborn piglet's thyroid gland organ culture (the 5th day of culturing) served as the investigation object. Basal secretion of hormones was estimated according to the level of T_3, T_4 content in a cultural medium when adding into DMSO medium under 3, 5

Матеріал, захищений авторським правом

Объектом исследования служила органная культура щитовидной железы новорожденных поросят (5-е сутки культивирования). Базальная секреция гормонов оценивалась по уровню содержания T_3, T_4 в культуральной среде при добавлении в среду ДМСО 3-х, 5-и и 7%-й концентрации. Также исследован уровень базальной секреции при двух режимах инкубации:

1) добавление ДМСО при 37 °С с последующей инкубацией в течение 1 ч при той же температуре;

2) добавление ДМСО при 0 °С с инкубацией в течение 15 мин при 0 °С, затем инкубация 1 ч при 37 °С.

Уровень содержания T_3, T_4 в среде инкубации определялся радиоиммунологическим методом при помощи наборов РИА-T_3,T_4-СТ.

Как видно из рисунка *а*, при минимальной концентрации криопротектора (3%) секреция гормонов по сравнению с контрольными образцами снижалась на 29% для T_3 и на 16% для T_4 в условиях добавления ДМСО при 0 °С. Увеличение концентрации криопротектора до 5 и 7% при тех же условиях инкубации способствовало сохранению уровня секреции T_4 на неизменном уровне, тогда как для T_3 при 5%-й концентрации ДМСО уровень секреции возрастал на 17%, а при использовании 7%-й концентрации ДМСО секреция T_3 достигала уровня контроля.

В условиях добавления ДМСО при 37 °С (рисунок, *б*) установлено, что 3%-я концентрация криопротектора способствовала некоторому увеличению секреции T_3 по сравнению с контролем. Повышение концентрации до 5% сопровождалось увеличением в 1,3 раза секреции T_3 и в 1,5 раза T_4. При последующем росте концентрации криопротектора до 7% мы отмечали примерно одинаковое угнетение секреции для T_3 и T_4 по сравнению с контролем на 12–14%.

and 7% concentrations. The level of basal secretion under two regimens of incubation was also investigated:

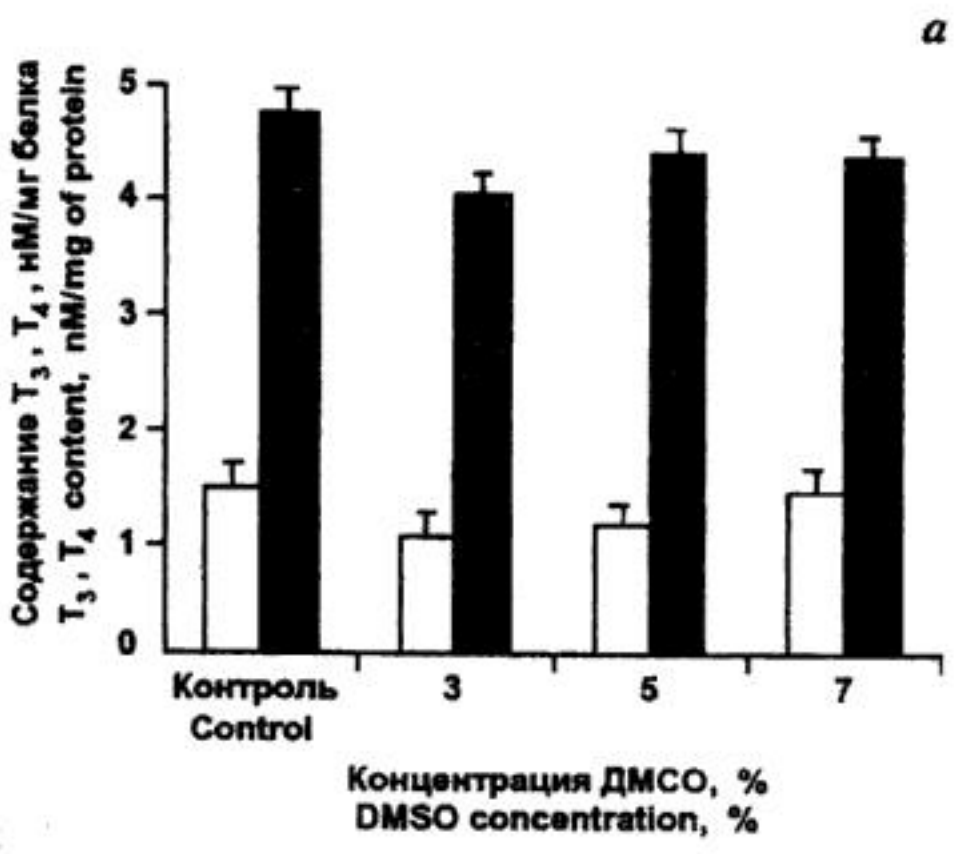
1) DMSO addition at 37 °C with following incubation within 1 hr at the same temperature;

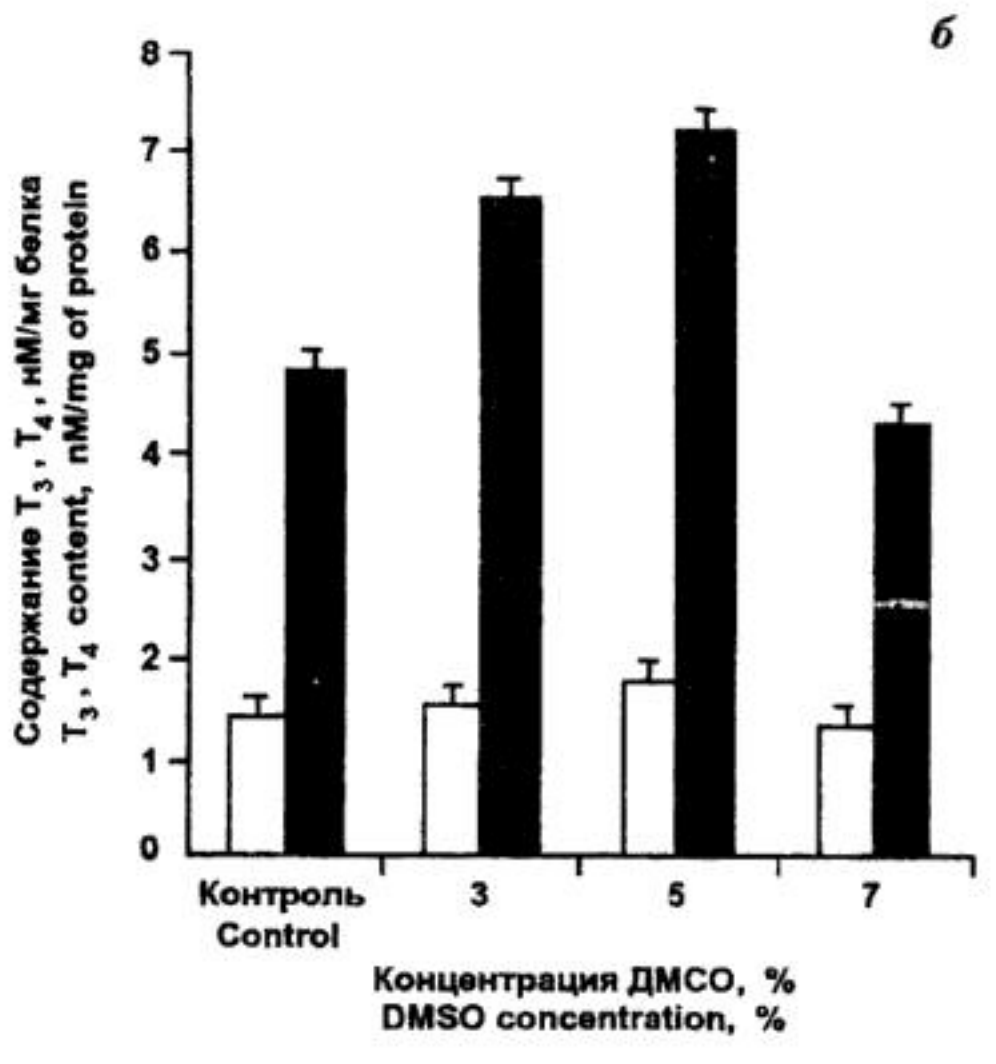
2) DMSO addition at 0 °C with a 15 min incubation at 0 °C, then the incubation during 1 hr at 37 °C.

The level of T_3, T_4 content in the incubation medium was determined using a radioimmunological method by means of RIA-T_3, T_4-ST kits.

As it is seen from the Figure *a*, under a minimum cryoprotectant concentration (3%) the hormone secretion in comparison with the control samples decreased by 29% for T_3 and by 16% for T_4 under conditions of DMSO adding at 0 °C. An increase in cryoprotectant concentration up to 5 and 7% under the same incubation conditions contributed to the preservation of secretion level for T_3 an invariable level, meanwhile for T_4 under a 5% concentration of DMSO the level of secretion increased by 17% and when using DMSO of a 7% concentration T_3 secretion reached the control level.

Under DMSO adding conditions at 37 °C (Figure, *б*) it was established, that a 3% concentration of cryoprotectant contributed to some increase in T_4 secretion in comparison with the control. An increase in the concentration up to 5% was accompanied by the secretion augmentation in 1.3 times for T_3 and in 1.5 times for T_4. During following augmentation of a cryoprotectant concentration we observed an approximately equal suppression of secretion for T_3 and T_4 in comparison with the control by 12–14%.





Уровень базальной секреции T_3, T_4. Добавление ДМСО при 0 °С (*а*) и при комнатной температуре (*б*) с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °С: □ – T_3; ■ – T_4.

The level of T_3, T_4 basal secretion. DMSO adding at 0 °C (*a*) and room temperature (*б*) with the following incubation during 1 hr at 37 °C: □ – T_3; ■ – T_4.

Матеріал, захищений авторським правом

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что секретирующая способность тироцитов меньше всего изменяется при использовании 7%-й концентрации ДМСО, добавляемого в среду инкубации при 0 °С.

Полученные данные коррелируют с данными о влиянии различных концентраций ДМСО на активность катепсина Д — лизосомального фермента, ответственного за протеолиз тиреоглобулина. По данным [4, 10], ДМСО в концентрациях от 1% до 10% оказывал выраженный стимулирующий эффект на активность катепсина Д во фрагментах тиреоидной паренхимы, который по мере роста концентрации преобразовывался в ингибирующий. В нашем случае наблюдалась более высокая чувствительность секреторной функции органной культуры к изменению концентрации криопротектора по сравнению с таковой в срезах тиреоидной паренхимы (мы наблюдали ингибирующий эффект уже при 7%-й концентрации ДМСО). Возможно, это связано с тем, что в органной культуре происходит более полное и более равномерное насыщение ткани криопротектором, чем во фрагментах тиреоидной паренхимы.

Некоторое снижение уровня секреции в образцах, инкубированных при 0 °С, может быть связано с изменением барьерных свойств клеточной мембраны. При околонулевых температурах происходит стабилизация белков цитоскелета [3], что способствует сохранению барьерных характеристик клеточной мембраны. Кроме того, известно, что ДМСО, оказывая дегидратирующий эффект на клетку в целом и на мембрану в частности, также может привести к стабилизации белков цитоскелета за счет увеличения их концентрации в единице объема внутриклеточного растворителя. В результате этого происходит угнетение трансмембранного транспорта тиреоглобулина из просвета фолликула в тироциты. Косвенным подтверждением этому может служить наблюдаемое нами изменение соотношения секреции фракций T_3 и T_4. При дефиците поступления йодидов в организм включаются эволюционно сформированные адаптационные механизмы, переводящие щитовидную железу в более экономичный режим функционирования за счет относительного увеличения синтеза фракции T_3, так как биологическая активность трийодотиронина в 8–10 раз выше активности тироксина [1, 2, 7, 8].

Таким образом, ДМСО, оказывая многогранное и разнонаправленное действие на различные этапы биосинтеза тиреоидных гормонов, не проявляет выраженного ингибирующего эффекта на гормоносекретирующую функцию органотипической культуры щитовидной железы.

Исходя из полученных данных, мы считаем, что оптимальным режимом эквилибрации является применение 7%-го ДМСО с последующей инкубацией при 0 °С. Несмотря на то, что наибольший

Basing on the results obtained we can conclude that a secreting ability of thyrocytes changes in the least extent when using DMSO of 7% concentration, added into the incubation medium at 0 °C.

The data obtained correlate with those on the effect of various DMSO concentrations on the activity of cathepsin D-lysosomal enzyme, responsible for a thyroglobulin proteolysis. According to the data [4, 10], the activity of cathepsin D in thyroid parenchyma fragments, DMSO in the concentrations from 1% to 10% caused a manifested stimulating effect on the activity of enzyme, which with the concentration increase was transformed into an inhibiting one. In our case we observed a higher sensitivity of organ culture secretory function to the change in the cryoprotectant concentration in comparison with the same in thyroid parenchyma sections (we observed an inhibiting effect even at a 7% DMSO concentration). Probably it is related to the fact that in an organ culture there is a more complete and uniform tissue saturation with the cryoprotectant than in thyroid parenchyma fragments.

Some decrease in the secretion level in the samples, being incubated at 0 °C can be related to the change in barrier properties of a cellular membrane. At subzero temperatures the stabilization of cytoskeletal proteins occurs [3], that contributes to the preservation of cellular membrane barrier characteristics. Besides, it is known that DMSO, causing a dehydrating effect on a cell in the whole and a membrane, in particular, can also result in cytoskeletal proteins stabilization due to an increase in their concentration in a unit of intracellular solvent volume. As a result a suppression of thyroglobulin transmembrane transport from a follicle lumen into thyrocytes occurs. The observed by us change in T_3 and T_4 secretion ratio can serve as an indirect confirmation. At the deficiency of the iodide coming into an organism, the evolutionarily formed adaptive mechanisms, transferring thyroid gland into more economic functioning regimen due to an increase in synthesis of T_3 fraction, are triggered, since a biological activity of triiodinothyronine in 8–10 times higher, than thyroxin activity [1, 2, 7, 8].

Thus, DMSO, causing a versatile and multiple effect on different stages of thyroid hormone biosynthesis, does not show a manifested inhibiting effect on hormone-secreting function of organ-typical thyroid gland culture.

Issuing from the data obtained, we consider that the application of a 7% DMSO with the further incubation at 0 °C is an optimal regimen of the equilibration. In spite of the fact that the highest level of the secretion was obtained in the samples with a 5% DMSO and being incubated at 37 °C, we do not consider the given regimen as an optimal one, since a high functional activity of the tissue, being under non-physiological conditions, results in an accelerated expenditure of substrates, ions, macroergs, that can unfavorably affect its further preservation.

Матеріал, захищений авторським правом

уровень секреции был получен в образцах с 5%-м ДМСО и инкубированных при 37 °С, мы не считаем данный режим оптимальным, так как высокая функциональная активность ткани, находящейся в нефизиологических условиях, приводит к ускоренному расходу субстратов, ионов, макроэргов, что может неблагоприятно отразиться на ее дальнейшей сохранности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Балаболкин М. И., Калинин А. П., Селищева А. П.* Дисгенез щитовидной железы.– Ташкент, 1982.– 232 с.
2. *Балаболкин М. И.* Достижения в изучении биосинтеза тиреоидных гормонов // Пробл. эндокринологии.– 1987.– № 4.– С. 23–26.
3. *Белоус А. М., Бондаренко В. А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 256 с.
4. *Грищенко В. И., Чуйко В. А., Пушкарь Н. С.* Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка.– 1993.– 242 с.
5. *Дроздович І. І., Бала І. А.* Морфофункціональна характеристика ксенотрансплантату органної культури щитовидної залози при експериментальному гіпотиреозі // Сучасні проблеми клінічної та експериментальної трансплантології: Тез. доп.– Київ, 1995.– С. 70–71.
6. *Славнов В. М., Марков В. В., Гульчій М. В.* Визначення життєздатності трансплантатів органних культур щитовидної залози у хворих на гіпотиреоз // Сучасні проблеми клінічної та експериментальної трансплантології: Тез. доп.– Київ, 1995.– С. 167–168.
7. *Теппермен Дж., Теппермен Х.* Физиология обмена веществ и эндокринной системы.– М.: Мир, 1989.– 656 с.
8. *Туракулов Я. Х., Бабаев Т. А., Саатов Т. Г.* Йодпротеины щитовидной железы.– Ташкент, 1974.– 263 с.
9. *Турчин І. С.* Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія.– 1996.– 1, № 2.– С. 6–13.
10. *Чуйко В. А., Утевский А. М.* Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.– Киев: Наук. думка.– 1985.– 216 с.

Поступила 04.07.2000

REFERENCES

1. *Balabolkin M. I., Kalinin A. P., Selischeva A. P.* Dysgenesis of thyroid gland.– Tashkent, 1982.– 232 p.
2. *Balabolkin M. I.* Achievements in the study of thyroid hormone biosynthesis // Problemy endokrinologii.– 1987.– № 4.– P. 23–26.
3. *Belous A. M., Bondarenko V. A.* Structural changes in biological membranes during cooling.– Kiev: Naukova dumka, 1982.– 256 p.
4. *Grischenko V. I., Chujko V. A., Pushkar N. S.* Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.– Kiev: Naukova Dumka, 1993.– 242 p.
5. *Drozdovich I. I., Bala I. A.* Morphofunctional characteristics of a thyroid gland organe culture xenotransplant at an experimental hypothyreosis // Current problems of clinincal and experimental transplantology: Abstracts of reports.– Kyiv, 1995.– P. 70–71.
6. *Slavnov V. M., Markov V. V., Gulchij M. V.* Determination of viability of thyroid gland organ culture transplants in patients with hypothyreosis // Current problems of clinical and experimental transplantology: Abstracts of reports.– Kyiv, 1995.– P. 167–168.
7. *Teppermen D., Teppermen H.* Physiology of metabolism and endocrine system.– M.: Mir, 1989.– 656 p.
8. *Tarakulov Ya. Kh., Babayev T. A., Saatov T. G.* Thyroid gland iodine proteins.– Tashkent, 1974.– 263 p.
9. *Turchin I. S.* Problem of cell and tissue cultures transplantation of glands of inner secretion to the patients with different forms of endocrinopathy // Endokrinologiya.– 1996.– I, № 2.– P. 6–13.
10. *Chujko V. A., Utevsky A. M.* Biochemistry of cryopreserved thyroid gland.– Kiev: Naukova Dumka, 1985.– 216 p.

Accepted in 04.07.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 579.873.7

UDC 57.043: 579.873.7

Влияние условий хранения на свойства криоконсервированной и лиофилизированной культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12

А. А. ЦУЦАЕВА, А. Е. АНАНЬИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Storage Conditions on the Properties of Cryopreserved and Lyophilized *Streptomyces fradiae* 25Ab12 Culture

A. A. TSUTSAYEVA, A. E. ANANYINA

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

Проведены исследования по изучению влияния условий хранения на морфофункциональные свойства культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12 — продуцента антибиотика тилозина. Показано, что на свойства культуры после криоконсервирования и лиофилизации в период хранения оказывают влияние температура, а также условия самих процессов криоконсервирования и лиофилизации. В частности, состав суспензионной среды, скорость охлаждения образцов, форма культуры (споровая, вегетативная) и время хранения.

Проведено дослідження щодо вивчення впливу умов зберігання на морфофункціональні властивості культури *Streptomyces fradiae* 25Ab12 — продуцента антибіотика тилозину. Показано, що на властивості культури після кріоконсервування і ліофілізації у період зберігання впливають температура, а також умови процесів кріоконсервування і ліофілізації, зокрема, склад суспензійного середовища, швидкість охолодження зразків, форма культури (спорова, вегетативна) і час зберігання.

The investigation, considering the effect of storage conditions on the morphofunctional properties of *Streptomyces fradiae* 25Ab12 culture, that is the producent of tylosin antibiotic has been conducted. It was shown, that both the temperature and conditions of cryopreservation and lyophilization processes. In particular, composition of suspension medium, cooling rate of the samples, culture form (spore, vegetative) and time of storage affected the properties of culture after cryopreservation and lyophilization after storage.

В успешном развитии производства антибиотиков и других биологически активных веществ существенную роль играет возможность поддержания и сохранения культур стрептомицетов — продуцентов антибиотиков при длительном хранении без изменения их исходных свойств [4]. Наиболее распространенными эффективными способами длительного хранения микроорганизмов являются криоконсервирование и лиофилизация [7, 8].

Перевод биологических объектов в состояние глубокого холодового анабиоза и хранение при температуре –196 °С позволяют сохранить без изменения исходных свойств культуры микроорганизмов в течение неограниченного срока. Достигнуть такого эффекта удается ингибицией метаболических процессов в клетках путем замораживания. Изменение свойств и гибель микробных клеток могут происходить на этапах криоконсервирования и отогрева [1]. Хранение при температурах выше 0 °С использовали как этап технологического процесса.

При лиофилизации состояние ангидробиоза достигается замораживанием клеток с последующим их обезвоживанием при умеренно низких температурах. Но абсолютное обезвоживание с целью пол-

The possibility of maintaining and storage of streptomyces, producents of antibiotics, under long-term storage without the change of their initial properties plays a significant role in a successful development of the production of antibiotics and other biologically active substances [4]. Cryopreservation and lyophilization are the most widespread and efficient methods for long-term storage of microorganisms [7, 8].

Biological objects transferring into the state of deep cold anabiosis and storage under –196 °C allowed to keep the properties of microorganisms culture within unlimited time. This effect can be achieved by the inhibition of metabolic processes in cells by means of freezing. The change of properties and death of microbial cells can occur at the stages of freeze-thawing [1]. Storage under the temperatures higher than 0 °C was used as the stage of technological process.

Under lyophilization the state of anhydrobiosis is achieved by the freezing of cells with their further dehydration under moderately low temperatures. However an absolute dehydration with the aim of complete inhibition of metabolic processes can cause the cell death. Due to this fact the process of lyophilization is stopped under the certain values of residual humidity, indices of which are individual for each type

Матеріал, захищений авторським правом

ного ингибирования метаболических процессов может вызвать гибель клеток. По этой причине процесс лиофилизации прекращают при определенных значениях остаточной влажности, значения которой индивидуальны для каждого вида биологического объекта [7]. Учитывая показатели остаточной влажности, гибель и повреждение микробных клеток могут происходить как при лиофилизации и регидратации образцов, так и в процессе хранения культур микроорганизмов. Необходимыми условиями хранения лиофилизированных культур являются: отсутствие в образцах кислорода и хранение их при пониженных температурах [3, 7].

Цель исследования — изучение степени сохранности морфофункциональных свойств культуры *S. fradiae* 25Ab12 — продуцента антибиотика тилозина (споровая и вегетативная) в зависимости от условий криоконсервирования, лиофилизации и хранения.

Споровую культуру *S. fradiae* 25Ab12 выращивали при температуре 28 °С в течение 10 сут на твердой регламентной питательной среде СР-15, в состав которой входили: соевая мука, кукурузный экстракт, меласса, картофельный крахмал, $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $MgSO_4$, $CaCO_3$ и агар-агар.

Для криоконсервирования культуру смывали со скошенной агаровой среды дистиллированной водой и доводили концентрацию клеток в суспензии до $1 \cdot 10^8$ кл/мл. Полученную суспензию разливали в металлические контейнеры емкостью 1 мл. Замораживали споровую культуру погружением в жидкий азот.

Вегетативную культуру *S. fradiae* 25Ab12 выращивали на качалках со скоростью вращения 260 об/мин в термостатированной комнате при температуре 28 °С в течение 48 ч на жидкой питательной регламентной среде, в состав которой входили: соевая мука, кукурузный экстракт, $CaCO_3$, NaCl и соевое масло.

Клетки двухсуточной вегетативной культуры в ростовой среде с титром $1 \cdot 10^7$ кл/мл в контейнерах емкостью 1 мл охлаждали в программном замораживателе УОП-6 (производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) со скоростью 10 °С/мин до температуры –70 °С с последующим погружением в жидкий азот (–196 °С).

Количество жизнеспособных клеток определяли по числу сформировавшихся макроколоний на твердой питательной регламентной среде СР-15 в течение 10 сут при температуре 28 °С [4].

После замораживания контейнеры со споровой и вегетативной культурой отогревали на водяной бане при температуре 28 °С. Интактную споровую и вегетативную культуру, а также образцы после охлаждения-отогрева хранили при температуре 20 и 4 °С. Часть замороженных образцов оставляли на хранение в жидком азоте. Период наблюдения — 30 сут. Отбор проб производили на 5-, 10-, 15- и 30-е сутки.

of biological object [7]. Taking into consideration the values of residual humidity, the death and damage of microbial cells can occur both under lyophilization and rehydration of the samples and during the process of microorganisms culture storage. The absence of oxygen in the samples and their storage under decreased temperatures are necessary storage conditions of lyophilized cultures [3, 7].

The aim of given work was to study the integrity degree of morphofunctional properties of *Streptomyces fradiae* 25Ab12 – producent of tylosin antibiotic (spore and vegetative form) depending on the conditions of cryopreservation, lyophilization and storage.

Spore culture of *S. Fradiae* 25Ab12 was grown under 28 °C temperature within 10 days on a solid regulated CP-15 nutritive medium, which comprised Soya meal, corn extract, melassa, potatoes starch $(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $MgSO_4$, $CaCO_3$, agar-agar.

For cryopreservation culture was washed-out from inclined agar medium by a distilled water and reached the cell concentration in suspension up to $1 \cdot 10^8$ cells/ml. The obtained suspension was put into 1ml metal containers. Spore culture was frozen by immerging into liquid nitrogen.

Vegetative culture *S. Fradiae* 25Ab12 was grown on rockers at rotation rate 260 rot/min in termostated room under 28 °C temperature within 48 hrs on a liquid regulated nutritive medium, which comprised Soya meal, corn extract, $CaCO_3$, NaCl and Soya butter.

Cell of two-day vegetative culture in a growth medium with $1 \cdot 10^7$ cells/ml titer in 1 ml containers were cooled by UOP-6 programmable freezer (production of Special Designing Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology of the National Academy of Sciences of the Ukraine) with 10 °C/min rate down to the temperature of –70 °C with further immerging into liquid nitrogen (–196 °C).

The number of viable cells was evaluated by the quantity of formed macrocolonies on a solid CP-15 nutritive regulated medium within 10 days under the temperature of 28 °C [4].

After the containers freezing with spore and vegetative culture were thawed on a water bath under the temperature of 28 °C. Both intact spore and vegetative culture and the samples just after freeze-thawing were stored under the temperature of 20 and 4 °C. Some frozen samples were kept in liquid nitrogen. Observation period made 30 days. Selection of the samples was done to the 5th, 10th, 15th and 30th day.

Lyophilization of spore and vegetative cultures was carried-out by means of UZV-4 freeze-thawing device (production of the Special Design Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology of the National Academy of Sciences of the Ukraine). A liquid regulated inoculating medium (medium 1) and the same medium with addition of thiourea under 1% final concentration (medium 2) were used as protective media. 10-day's spore culture

Матеріал, захищений авторським правом

Лиофилизацию споровой и вегетативной культуры проводили на опытной установке замораживания-высушивания УЗВ-4 (производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины). В качестве защитных сред использовали жидкую регламентную посевную среду (среда 1) и эту же среду с добавлением тиомочевины в конечной концентрации 1% (среда 2). Десятисуточную споровую культуру смывали со скошенной агаровой среды дистиллированной водой, осаждали центрифугированием со скоростью 4 тыс. об/мин в течение 15 мин, элюат сливали и клетки ресуспендировали в средах 1 и 2 (титр $1 \cdot 10^8$ кл/мл). Двухсуточную вегетативную культуру осаждали центрифугированием со скоростью 4 тыс. об/мин в течение 15 мин, элюат сливали и клетки ресуспендировали в защитных средах 1 и 2 (титр $1 \cdot 10^7$ кл/мл).

Для лиофилизации использовали пенициллиновые флаконы, в которые разливали по 1 мл полученные суспензии споровой и вегетативной культуры в защитных средах. Образцы замораживали со скоростью 1 °С/мин на полках камеры сушки. Остаточное давление в камере при сублимации соответствовало 0,013–0,018 Па. Конечная температура замораживания образцов в камере составляла –20 °С. Остаточная влажность их после лиофилизации соответствовала 1–3%. После окончания сушки флаконы укупоривали резиновыми пробками в атмосфере сухого азота, завальцовывали металлическими колпачками, заливали парафином и хранили при температуре 20, 4, –10, –25 и –75 °С. Время наблюдения — 1 год, пробы отбирали через 3, 6, 9 и 12 мес.

Добавлением во флаконы дистиллированной воды в объеме, равном исходному объему суспензии, проводили регидратацию лиофилизированных образцов при комнатной температуре.

Биосинтез белка и нуклеиновых кислот (НК) изучали по активности включения меченых предшественников ^{3}H-тимидина, ^{3}H-уридина и ^{14}C-гидролизата белков хлореллы. При определении интенсивности включения радиоактивных предшественников использовали миллипоровые фильтры, активность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике ABAC-SL-40 Intertechnique (Франция) по методу Кеннела [5].

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента–Фишера, достоверность различий получена на уровне значимости 0,95 [2].

Установлено, что количество жизнеспособных споровых клеток, хранившихся при температуре 20 °С, снижалось через 10 сут и оставалось на этом уровне в течение всего периода наблюдения. На 30-е сутки их количество составляло 68,3% от контроля (табл. 1).

Если споровые суспензии хранились при 4 °С, количество жизнеспособных клеток не изменялось в течение всего срока хранения.

was washed-out from inclined agar medium by distilled water, precipitated by means of centrifuging with the rate of 4 thousands rot/min within 15 min, eluate was poured out and cells were resuspended in 1 and 2 media ($1 \cdot 10^8$ cells/ml titer). Two-day's vegetative culture was precipitated by means of centrifuging with the rate of 4 thousands rot/min within 15 min, eluate was poured out and cells were resuspended in 1 and 2 media ($1 \cdot 10^7$ cells/ml titer).

The obtained suspensions of spore and vegetative culture in protective media were poured into 1 ml Penicillin vessels, used for lyophilization. Samples were frozen with the rate of 1 °C/min on the chamber shelves of lyophilizing device. Residual pressure in the chamber was under sublimation corresponded to 0.013–0.018 Pa. Final temperature of the samples' freezing in the chamber made –20 °C. Their residual humidity after lyophilization corresponded to 1–3%. After lyophilization finishing the vessels were hermetically sealed by rubber corks in the atmosphere of dry nitrogen and forge-rolled by metal caps, poured by paraffin and stored under the temperature of 20, 4, –10, –25 and –75 °C. Observation time — 1 year, samples were selected in 3, 6, 9 and 12 months.

Rehydration of lyophilized samples was done under a room temperature by adding into the vessels distilled water in the volume, equal to an initial volume of the suspension.

Biosynthesis of protein and nucleic acids (NA) was investigated on the activity of inclusion of ^{3}H-thymidin, ^{3}H-uridin and ^{14}C-hydrolysate labeled precursors of chlorella proteins. During the estimation of the intensity of radioactive precursors inclusion, millipore filters were used, activity was measured by means of ABAC-SL-40 liquid scintillating counter, Intertechnique (France) by Kennel method [5].

Statistical processing of the results was conducted according to the Student's–Fisher's method, statistical significance of the differences was obtained at 0.95 significance level [2].

It was established, that the number of viable spore cells, stored under the temperature of 20 °C decreased in 10 days and remained at this level within a whole observation period. To the 30th day their number made 68.3% of the control (Table 1).

The number of viable cells did not change within a whole term of storage if spore suspension was stored under 4 °C.

The number of vegetative cells, stored under the temperature of 20 °C was lower in comparison with the control even after the 5 days' storage and remained at this level up to the finishing of the term of observation.

After the storage of cellular suspension of vegetative culture under the temperature of 4 °C, viability decrease in the samples in comparison with the control, beginning from the 15th day, was noted.

Viability of the spore culture cells, cryopreserved according to an optimal program and stored within

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1 **Table 1**

Сохранность клеток в суспензиях споровой и вегетативной культуры в зависимости от температуры хранения

Cell integrity in the suspensions of spore and vegetative culture depending on storage temperature

Время хранения, сут Time of storage, days	Количество жизнеспособных клеток в суспензиях Number of viable cells in the suspensions			
	споровой культуры после хранения при температуре, °С of spore culture after the storage under temperature, °С		вегетативной культуры после хранения при температуре, °С of vegetative culture after the storage under temperature, °С	
	20	4	20	4
5	$(0,629 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(0,764 \pm 0,04) \cdot 10^8$	$0,49 \pm 0,05 \cdot 10^7$*	$0,64 \pm 0,02 \cdot 10^7$
10	$(0,668 \pm 0,01) \cdot 10^8$*	$(0,749 \pm 0,02) \cdot 10^8$	$0,483 \pm 0,02 \cdot 10^7$*	$0,585 \pm 0,04 \cdot 10^7$
15	$(0,637 \pm 0,03) \cdot 10^8$*	$(0,734 \pm 0,02) \cdot 10^8$	$0,467 \pm 0,03 \cdot 10^7$*	$0,386 \pm 0,03 \cdot 10^7$*
30	$(0,572 \pm 0,02) \cdot 10^8$*	$(0,716 \pm 0,02) \cdot 10^8$	$0,474 \pm 0,1 \cdot 10^7$*	$0,356 \pm 0,07 \cdot 10^7$*
Контроль Control	$0,838 \pm 0,03 \cdot 10^8$		$0,71 \pm 0,04 \cdot 10^7$	

Примечание. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после хранения и контролем, достоверность различий $p < 0,05$.

Note. * — the level of confident probability between average values after storage and the control ones, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

Число вегетативных клеток. хранившихся при температуре 20 °С, было ниже по сравнению с контролем уже после 5 дней хранения и оставалось на таком уровне до окончания срока наблюдения.

После хранения суспензии клеток вегетативной культуры при температуре 4 °С отмечалось снижение жизнеспособности в образцах по сравнению с контролем, начиная с 15-х суток.

Жизнеспособность клеток споровой культуры, криоконсервированных по оптимальной программе и хранившихся в течение 30 сут в жидком азоте при температуре –196 °С, достоверно оставалось на исходном уровне (табл. 2). Хранение при 4 °С клеток споровой культуры, замороженных и сразу отогретых, не приводило к значительному снижению количества жизнеспособных клеток в течение всего периода наблюдения.

Начиная с 10 суток хранения при 20 °С споровой культуры, после охлаждения-отогрева отмечалось снижение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (интактная культура) в течение всего периода наблюдения. Хранение в жидком азоте вегетативной культуры после замораживания обеспечивало высокую сохранность жизнеспособных клеток (табл. 3).

Как показано в табл. 3, достоверных различий в количестве жизнеспособных клеток вегетативной культуры сразу после охлаждения-отогрева и хранения при температуре 4 °С по сравнению с контролем не отмечалось в течение 30 сут. После охлаждения-отогрева и хранения при 20 °С их количество снижалось с 10-х по 30-е сутки. К концу срока наблюдения сохранные клетки составляли 56,4%.

30 days in a liquid nitrogen under the temperature of –196 °C was statistically remained at initial level (Table 2). Storage of the spore culture cells under 4 °C, thawed just after freezing did not result in a considerable decrease of the number of viable cells within a whole period of observation.

Beginning from the 10th day of storage of spore culture under 20 °C after cooling-thawing a reduction

Таблица 2 **Table 2**

Жизнеспособность клеток споровой культуры после охлаждения-отогрева в зависимости от температуры хранения

Viability of spore culture cells just after freeze-thawing depending on storage temperature

Время хранения, сут Time of storage, days	Количество жизнеспособных клеток споровой культуры после хранения при температуре, °С Number of viable cells of spore culture after storage under the temperature, °С		
	20	4	–196
5	$(0,574 \pm 0,04) \cdot 10^8$	$(0,622 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$0,682 \pm 0,03 \cdot 10^8$
10	$(0,459 \pm 0,01) \cdot 10^8$*	$(0,44 \pm 0,02) \cdot 10^8$	$0,678 \pm 0,1 \cdot 10^8$
15	$(0,327 \pm 0,1) \cdot 10^8$*	$(0,49 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$0,68 \pm 0,25 \cdot 10^8$
30	$(0,244 \pm 0,2) \cdot 10^8$*	$(0,42 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$0,676 \pm 0,31 \cdot 10^8$
Контроль Control	$0,689 \pm 0,01 \cdot 10^8$		

Примечание. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после хранения и контролем, достоверность различий $p < 0,05$.

Note. * — the level of confident probability between average values after storage and the control ones, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

of the number of viable cells was noted in comparison with the control (intact culture) within a whole period of observation. Storage of vegetative culture in liquid nitrogen after freezing provided a high integrity of viable cells (Table 3).

As the Table 3 demonstrated, no statistically significant differences in the number of viable cells of vegetative culture just after cooling-thawing and storage under 4 °C in comparison with the control were noted within 30 days. After cooling-thawing and storage under 20 °C their number decreased from the

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3

Жизнеспособность клеток вегетативной культуры после охлаждения-отогрева в зависимости от температуры хранения

Table 3

Viability of vegetative culture cells just after freeze-thawing depending on storage temperature

Время хранения, сут Time of storage, days	Количество жизнеспособных клеток после хранения при температуре, °С Number of viable cells after storage under the temperature, °С		
	20	4	–196
5	$(0,67 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(0,63 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$0,68 \pm 0,02 \cdot 10^7$
10	$(0,517 \pm 0,01) \cdot 10^7$*	$(0,61 \pm 0,03) \cdot 10^7$	$0,677 \pm 0,03 \cdot 10^7$
15	$(0,434 \pm 0,04) \cdot 10^7$*	$(0,62 \pm 0,08) \cdot 10^7$	$0,683 \pm 0,03 \cdot 10^7$
30	$(0,388 \pm 0,02) \cdot 10^7$*	$(0,58 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$0,682 \pm 0,03 \cdot 10^7$
Контроль Control	$0,688 \pm 0,02 \cdot 10^7$		

Примечание. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после хранения и контролем, достоверность различий $p < 0,05$.

Note. * — the level of confident probability between average values after storage and the control ones, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

Количество жизнеспособных споровых и вегетативных клеток культуры *S. fradiae* 25Ab12 после охлаждения-отогрева и хранения при 20 °С было достоверно ниже, чем в суспензиях интактных клеток, хранившихся в аналогичных условиях.

Замораживание по оптимальным программам и хранение споровой и вегетативной формы культуры *S. fradiae* 25Ab12 не приводило к изменению морфологии и культуральных свойств, но оказывало влияние на протекание биосинтетических процессов в микробных клетках. В табл. 4 представлены данные уровня биосинтеза нуклеиновых кислот и белка после охлаждения-отогрева с последующим хранением при 4 °С.

Уровень биосинтеза ДНК, РНК и белка в клетках споровой культуры после замораживания-отогрева был выше, чем в контроле. Активность течения биосинтеза белка в клетках вегетативной культуры после замораживания-отогрева с 10-х по 30-е сутки. К концу срока наблюдения процент жизнеспособных клеток составил 56,4%.

Количество жизнеспособных клеток споровой и вегетативной культуры *S. fradiae* 25Ab12 после охлаждения-отогрева и хранения при 20 °С было достоверно ниже, чем в суспензиях интактных клеток, хранившихся в аналогичных условиях.

Замораживание по оптимальным программам и хранение споровой и вегетативной культуры *S. fradiae* 25Ab12 не приводило к изменению морфологии и культуральных свойств, но оказывало влияние на протекание биосинтетических процессов в микробных клетках. Данные по уровню биосинтеза нуклеиновых кислот и белка после охлаждения-отогрева с последующим хранением при 4 °С представлены в табл. 4.

Таблица 4

Уровень синтеза нуклеиновых кислот и белка в клетках споровой и вегетативной культуры после охлаждения-отогрева и хранения

Культура	Условия хранения	Уровень синтеза $\bar{x} \pm S\bar{x}$, имп/мин		
		ДНК	РНК	Белок
Споровая	Контроль	7 917 ± 86,64	12 511 ± 12	130 231 ± 68,4
	Криоконсервирование	9 209,5 ± 126,3*	17 693 ± 98,4*	193 420,5 ± 78,6*
	2-е суток хранения при 4 °С	8 620,1 ± 93*,**	17 197,6 ± 21,2*,**	190 325,8 ± 84,2*,**
Вегетативная	Контроль	11 186 ± 97,6	12 864 ± 58,4	429 265,5 ± 36,5
	Криоконсервирование	11 851,5 ± 31,8*	20 058 ± 76,8*	332 262,5 ± 92,8*
	2-е суток хранения при 4 °С	9 990,4 ± 76,2*,**	17 871,7 ± 32*,**	284 749 ± 69,5*,**

Примечания. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после хранения и после охлаждения-отогрева, достоверность различий $p < 0,05$; ** — уровень доверительной вероятности между средними значениями после хранения и контролем, достоверность различий $p < 0,05$.

The number of viable cells of spore and vegetative culture *S. Fradiae* 25Ab12 after cooling-thawing and storage under 20 °C was significantly lower, than in the suspensions of intact cells, stored under analogous conditions.

Freezing according to optimal programs and storage of spore and vegetative culture *S. Fradiae* 25Ab12 did not result in the change of morphology and cultural characteristics, however did not affect the duration of biosynthetic processes in microbial cells. The data of biosynthesis level of nucleic acids and protein after cooling-thawing with following storage under 4 °C are presented in Table 4.

Table 4

Synthesis level of nucleic acids and protein in the cells of spore and vegetative culture after cooling-warming and storage

Culture	Storage conditions	Synthesis level $\bar{x} \pm S\bar{x}$, imp/min		
		DNA	RNA	Protein
Spore	Control	7 917 ± 86.64	12 511 ± 12	130 231 ± 68.4
	Cryopreservation	9 209.5 ± 126.3*	17 693 ± 98.4*	193 420.5 ± 78.6*
	2-days' storage under 4 °C	8 620.1 ± 93*,**	17 197.6 ± 21.2*,**	190 325.8 ± 84.2*,**
Vegetative	Control	11 186 ± 97.6	12 864 ± 58.4	429 265.5 ± 36.5
	Cryopreservation	11 851.5 ± 31.8*	20 058 ± 76.8*	332 262.5 ± 92.8*
	2-days' storage under 4 °C	9 990.4 ± 76.2*,**	17 871.7 ± 32*,**	284 749 ± 69.5*,**

Notes. * — the level of confident probability between the average values after storage and cooling-warming, statistical significance of the differences $p < 0.05$, ** — the level of confident probability between the average values after storage and the control, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

The level of DNA, RNA and protein biosynthesis in the cells of spore culture after cooling-warming was higher, than in the control. Activity of protein biosynthesis in the cells of vegetative culture after freeze-thawing was inhibited, and the level of DNA, RNA biosynthesis increased in comparison with the control.

Indices of biosynthetic processes in the cells of spore culture, thawed just after freezing and stored within two days under the temperature of 4 °C, remained quite a high in comparison with the control, but decreased comparing with the data, obtained after freeze-thawing.

Матеріал, захищений авторським правом

ния-отогрева ингибировалась, а уровень биосинтеза ДНК и РНК по сравнению с контролем возрастал.

Показатели биосинтетических процессов в клетках споровой культуры, отогретой сразу после замораживания и хранившейся в течение 2-х суток при температуре 4 °С, оставались высокими по сравнению с контролем, но снижались по сравнению с данными, полученными после замораживания-отогрева.

Уровень биосинтеза ДНК и белка в клетках вегетативной культуры, отогретой сразу после замораживания и хранившейся в течение 2-х суток при температуре 4 °С, снижался как по сравнению с контролем, так и с показателями, полученными после замораживания-отогрева. Но уровень биосинтеза РНК в клетках вегетативной культуры, отогретой после охлаждения и хранившейся при температуре 4 °С в течение 2-х суток, оставался выше, чем в клетках исходной культуры. В то же время отмечалась ингибиция РНК этих образцов по сравнению с показателями, полученными сразу после замораживания-отогрева.

После лиофилизации споровой культуры в среде 1 жизнеспособные клетки составляли 59,9% от контроля, а в среде 2 — 74,3%.

Установлено, что в процессе хранения при 4 °С достоверно снижалось количество жизнеспособных клеток в культуре, лиофилизированной в среде 1, в течение всего срока наблюдения (табл. 5). В условиях хранения при –10, –25, –75 °С вышеуказанных образцов достоверное снижение количества жизнеспособных клеток отмечалось по истечении 9 мес и оставалось на этом уровне до одного года.

Хранение споровой культуры, лиофилизированной в среде 2, при –10, –25, –75 °С обеспечивало более высокий процент жизнеспособных клеток, чем в образцах, лиофилизированных в среде 1 на протяжении 12 мес. После 9 мес хранения выше-

The level of DNA and protein biosynthesis in the cells of vegetative culture, thawed after freezing and stored within two days under the temperature of 4 °C, decreased both in comparison with the control and the indices, obtained after freeze-thawing. However the level of RNA biosynthesis in the cells of vegetative culture, thawed after cooling and stored under the temperature of 4 °C within 2 days remained higher, than in the cells of initial culture. At the same time inhibition of the RNA of these samples in comparison with the indices, obtained just after freeze-thawing was noted.

After lyophilization of spore culture in the medium 1, the percentage of viable cells was 59.9% of the control, and in the medium 2 — 74.3%.

It was established, that during the storage under 4 °C the number of viable cells in the culture, lyophilized in the medium 1 considerably decreased within the whole observation term (Table 5).

Under the storage conditions of the mentioned above samples, a statistical decrease of the number of viable cells was noted in 9 months and remained at this level up to 1 year.

Storage of spore culture, lyophilized in the medium 2 at –10, –25 and –75 °C provided a higher percentage of viable cells, than in the samples lyophilized in the medium 1 within 12 months. After 9 months' storage of the samples, mentioned above, under 4 °C a statistically significant decrease of the number of viable cells, which did not change to final observation term, was noted.

After lyophilization of vegetative culture in protective medium 1 the number of viable cells made 40.7% of the control, in the medium 2 this percentage was 51.4%.

Storage of vegetative culture, lyophilized in the medium 1 under 4 °C caused a statistically significant decrease of viable cells within the whole observation period (Table 6).

Таблица 5 **Table 5**

Жизнеспособность лиофилизированной споровой культуры в зависимости от условий и времени хранения

Viability of lyophilized spore culture depending on the conditions and time of storage

Защитная среда Protective medium	Время хранения, мес Time of storage, months	Количество жизнеспособных клеток, %, при температуре, °С Number of viable cells, %, under temperature, °С			
		4	–10	–25	–75
1	3	77,5 ± 3,2*	85,2 ± 4,3	84,5 ± 2,1	87,6 ± 3,2
	6	77,2 ± 5,4*	86,7 ± 7,5	87,2 ± 1,1	86,7 ± 2,2
	9	69,2 ± 3,2*	74,0 ± 6,5*	77,2 ± 4,3*	75,5 ± 5,4*
	12	69,4 ± 5,3*	75,2 ± 6,5*	76,1 ± 0,6*	72,6 ± 3,2*
2	3	70,6 ± 16,5	115,2 ± 24,9	89,8 ± 27,6	128,7 ± 26,5
	6	87,1 ± 28,5	101,8 ± 32,8	107,1 ± 24,0	122,3 ± 28,8
	9	52,1 ± 5,1*	114,3 ± 14,1	120,5 ± 17,2	118,8 ± 25,5
	12	45,1 ± 3,1*	101,07 ± 13,1	103,2 ± 34,0	118,9 ± 1,1

Примечание. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после лиофилизации и в процессе хранения, достоверность различий $p < 0,05$.

Note. * — level of confident probability between average values after lyophilization during the storage, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

Матеріал, захищений авторським правом

указанных образцов при 4 °С отмечалось достоверное снижение количества живых клеток, не изменяющееся до конечного срока наблюдения.

После лиофилизации вегетативной культуры в защитной среде 1 количество жизнеспособных клеток составляло 40,7% от контроля, в среде 2 — 51,4%.

Хранение вегетативной культуры, лиофилизированной в среде 1, при 4 °С вызывало достоверное снижение количества жизнеспособных клеток на протяжении всего периода наблюдения (табл. 6).

Снижалась жизнеспособность клеток вегетативной культуры в процессе хранения при –10 °С после 9 мес, при –25 и –75 °С — после 12 мес. При хранении образцов вегетативной культуры, лиофилизированной в среде 2, при –10, –25 и –75 °С достоверного снижения количества жизнеспособных клеток не отмечалось на протяжении одного года. При температуре хранения 4 °С сохранность вышеуказанных образцов была высокой в течение 9 мес, но после года хранения процент жизнеспособных клеток был достоверно ниже по сравнению с контролем.

Активность течения биосинтеза нуклеиновых кислот и белка в клетках споровой культуры после лиофилизации возрастала по сравнению с контролем (табл. 7).

Показатели биосинтетических процессов в клетках споровой культуры, хранившейся после лиофилизации при 4 °С в течение 2-х суток, достоверно снижались по сравнению с данными, полученными как сразу после лиофилизации, так и по сравнению с контролем. Только уровень биосинтеза белка оставался выше контрольного.

Viability of vegetative cell culture during their storage under –10 °C decreased after 9 months, under the temperature of –25 and –75 °C this index decreased after 12 months' storage.

When storing the samples of vegetative culture, lyophilized in the medium 2, under –10, –25 and –75 °C no statistically significant decrease of the number of viable cells was noted within 1 year. Under the storage temperature of 4 °C the integrity of the samples, mentioned above was high within 9 months, however after 1 year storage the percentage of viable cells was statistically lower in comparison with the control.

Biosynthesis activity of nucleic acids and protein in the cells of spore culture after lyophilization increased in comparison with the control (Table 7).

Indices of the biosynthesis processes in the cells of spore culture, stored after lyophilization under 4 °C within two days, statistically decreased both in comparison with the data, obtained just after lyophilization and in comparison with the control. However the level of protein biosynthesis remained higher than the control.

The level of DNA and RNA biosynthesis in the cells of vegetative culture after lyophilization increased, the level of protein biosynthesis remained at an initial level.

In 2 days of storage of the samples of lyophilized vegetative culture under 4 °C a statistical reduction of the level of metabolic processes both in comparison with the control and the data, obtained just after lyophilization,

Таблица 6 **Table 6**

Жизнеспособность клеток лиофилизированной вегетативной культуры в зависимости от условий и времени хранения

Viability of the cells of lyophilized vegetative culture depending on the conditions and time of storage

Защитная среда Protective medium	Время хранения, мес Time of storage, months	Количество жизнеспособных клеток, %, при температуре, °С Number of viable cells, %, under temperature, °С			
		4	–10	–25	–75
1	3	67,3 ± 19,8*	91,4 ± 26,7	94,0 ± 13,8	95,9 ± 53,5
	6	34,1 ± 10,1*	53,5 ± 13,9	91,2 ± 29,5	95,1 ± 19,4
	9	11,5 ± 3,68*	24,7 ± 3,7*	84,0 ± 41,0	82,0 ± 19,3
	12	13,8 ± 2,76*	23,0 ± 2,76*	41,5 ± 1,8*	41,5 ± 2,3*
2	3	95,4 ± 0,9	95,0 ± 20,1	96,6 ± 11,2	95,2 ± 20,1
	6	96,7 ± 8,9	95,9 ± 17,9	98,9 ± 15,6	98,8 ± 17,9
	9	79,5 ± 13,4	95,1 ± 13,4	96,6 ± 15,6	98,9 ± 15,5
	12	70,3 ± 11,3*	93,8 ± 4,5	92,8 ± 11,2	97,4 ± 11,3

Примечание. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями после лиофилизации и в процессе хранения, достоверность различий $p < 0,05$.

Note. * — level of confident probability between average values after lyophilization during the storage, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

Таблица 7

Уровень синтеза ДНК, РНК и белка в клетках споровой и вегетативной культуры после лиофилизации и хранения

Культура	Условия хранения	Уровень синтеза $\bar{x} \pm S\bar{x}$, имп/мин		
		ДНК	РНК	Белок
Споровая	Контроль	5 168,8 ± 27,0	18 597,3 ± 36,0	13 074 ± 14,4
	Лиофилизация	6 793,5 ± 18,6*	18 856 ± 18,1*	43 181,5 ± 27,6*
	2-е суток хранения при 4 °С	4 271,6 ± 41,4*,**	14 278,5 ± 14,3*,**	31 321,4 ± 15,2*,**
Вегетативная	Контроль	1 575,4 ± 31,5	1 936,6 ± 17,5	16 639 ± 29,0
	Лиофилизация	1 720,3 ± 12,0*	2 115,4 ± 10,0*	16 735,1 ± 7,0
	2-е суток хранения при 4 °С	1 254 ± 6,0*,**	1 369,8 ± 9,2*,**	5 967 ± 16,7*,**

Примечания. * — уровень доверительной вероятности между средними значениями сразу после лиофилизации и хранения, достоверность различий $p < 0,05$; ** — уровень доверительной вероятности между средними значениями до лиофилизации и после хранения, достоверность различий $p < 0,05$.

Матеріал, захищений авторським правом

Уровень биосинтеза ДНК и РНК в клетках вегетативной культуры после лиофилизации возрастал, уровень биосинтеза белка оставался на исходном уровне.

По истечении 2-х суток хранения образцов лиофилизированной вегетативной культуры при температуре 4 °С наблюдалось достоверное снижение уровня метаболических процессов как по сравнению с контролем, так и по сравнению с данными, полученными сразу после лиофилизации. Результаты свидетельствуют о том, что криоконсервирование обеспечивает высокую сохранность клеток споровой и вегетативной культуры *S. fradiae* 25Ab12 в течение длительного периода при хранении образцов в жидком азоте.

Стимуляция процессов метаболизма в клетках споровой и вегетативной культуры после криоконсервирования и лиофилизации, очевидно, обусловлена ответной реакцией на стрессорное воздействие факторов, возникающих на этапах криоконсервирования и лиофилизации, а также одним из проявлений процессов репарации.

Снижение жизнеспособности культуры *S. fradiae* 25Ab12 при хранении в условиях 4 и 20 °С объясняется тем, что во всех клетках популяции, кроме зрелых спор, очевидно, развиваются нелетальные повреждения.

При лиофилизации споровой и вегетативной культуры *S. fradiae* 25Ab12 в среде 2 отмечалась более высокая жизнеспособность. Введение в среду антиоксиданта тиомочевины позволило повысить устойчивость лиофилизированных микроорганизмов на этапах их хранения в широком диапазоне температур, что можно объяснить снижением активности течения процессов перекисного окисления, приводящих к гибели микробных клеток.

Table 7

The level of DNA, RNA and protein synthesis in the cells of spore and vegetative culture after lyophilization and storage

Culture	Storage conditions	Synthesis level $\bar{x} \pm S\bar{x}$, imp/min		
		DNA	RNA	Protein
Spore	Control	5 168.8 ± 27.0	18 597.3 ± 36.0	13 074 ± 14.4
	Lyophilization	6 793.5 ± 18.6*	18 856 ± 18.1*	43 181.5 ± 27.6*
	2 days' storage under 4 °C	4 271.6 ± 41.4*,**	14 278.5 ± 14.3*,**	31 321.4 ± 15.2*,**
Vegetative	Control	1 575.4 ± 31.5	1 936.6 ± 17.5	16 639 ± 29.0
	Lyophilization	1 720.3 ± 12.0*	2 115.4 ± 10.0*	16 735.1 ± 7.0
	2 days' storage under 4 °C	1 254 ± 6.0*,**	1 369.8 ± 9.2*,**	5 967 ± 16.7*,**

Notes. * — the level of confident probability between the average values just after lyophilization and storage, statistical significance of the differences $p < 0.05$, ** — the level of confident probability between the average values before lyophilization and storage, statistical significance of the differences $p < 0.05$.

was observed. These results testify, that cryopreservation provides a high integrity of cells of spore and vegetative culture within a long-term period during the samples storage in liquid nitrogen.

Stimulation of the metabolism processes in the cells of spore and vegetative culture after cryopreservation and lyophilization, is obviously stipulated both by the response to the stress effect of the factors, appeared at the stages of cryopreservation and lyophilization, and one of the manifestations of the reparation processes [6].

Viability decrease of *S. fradiae* 25Ab12 culture during the storage under the temperature of 4 and 20 °C can be explained by the fact, that, obviously, in all cells of the population except mature spores, nonlethal damages developed.

When lyophilizing spore and vegetative culture of *S. fradiae* 25Ab12 in the medium 2 a higher viability was noted. Introduction of thiourea antioxidant allowed to increase the stability of lyophilized microorganisms at the stages of their storage in a wide spectrum of the temperatures, that can be explained by the decrease in the activity of lipid peroxidation processes, resulted in the death of microbial cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Актуальные* проблемы криобиологии / Под ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981.– 608 с.
2. *Ашмарин И. П., Воробьев А. А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях.– Л.: Медгиз, 1962.– 180 с.
3. *Бланков Б. И., Клебанов Д. Л.* Применение лиофилизации в микробиологии.– М.: Медгиз, 1961.– 263 с.
4. *Егоров Н. С.* Основы учения об антибиотиках.– М.: Высш. шк., 1986.– С. 157–161.
5. *Кеннел Д.* Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка // Методы исследования нуклеиновых кислот.– М.: Мир, 1970.– С. 138–144.
6. *Холодовой* стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1991.– 176 с.
7. *Heckly R. I.* Preservation of microorganism // Adv. Appl. Microbiol.– 1978.– 24.– P. 1–53.
8. *Smith D., Onions A. H. S.* The preservation and maitenance of living fungi.– Kew Servey, England: Common Wealth Mycological Institut Publ, 1983.– 176 p.

Поступила 06.06.2000

REFERENCES

1. *Actual* Problems of Cryobiology // Ed. by N. S. Pushkar, A. M. Belous.– Kiev: Naukova dumka, 1981.– 608 p.
2. *Ashmarin I. P., Vorobyev A. A.* Statistical methods in microbiological investigations.– L.: State Publishing House of medical literature, 1962.– 180 p.
3. *Blankov B. I., Klebanov D. L.* Application of lyophilization in microbiology.– M.: Medical State Publishing House, 1961.– 263 p.
4. *Egorov N. S.* Grounds of the study about antibiotics.– M.: Vyschaya shkola, 1986.– P. 157–161
5. *Kennel D.* Usage of filters for division of radioactive RNA, DNA and protein // Methods for nucleic acids investigation.– M.: Mir, 1970.– P. 138–144.
6. *Cold* stress and biological systems / Ed. by A. A. Tsutsaeva.– Kiev: Naukova dumka, 1991.– 176 p.
7. *Heckly R. I.* Preservation of microorganism // Adv. Appl. Microbiol.– 1978.– 24.– P. 1–53.
8. *Smith D., Onions A. H. S.* The preservation and maitenance of living fungi.– Kew Servey, England: Common Wealth Mycological Institut Publ, 1983.– 176 p.

Accepted in 06.06.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 599.75: 591.146: 57.043

UDC 599.75: 591.146: 57.043

Влияние температуры и времени хранения на качество молозива коров

Б. П. САНДОМИРСКИЙ, С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, Е. С. ГАЛЬЧЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Temperature and Time of Storage on Bovine Colosrum Quality

B. P. SANDOMIRSKY, S. E. GALCHENKO, E. S. GALCHENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Изучались такие показатели качества молозива коров, как *pH*, кислотность, а также интенсивность перекисного окисления липидов в зависимости от температуры и времени хранения (20, 4, –12, –196 °С). Выявлено, что замораживание и хранение при температурах ниже 0 °С до 28 сут не приводят к достоверному изменению изученных показателей. Установлены граничные сроки хранения при температурах выше 0 °С. Показана информативность хемилюминесцентного метода изучения пероксидации липидов молозива.

Вивчались такі показники якості молозива корів, як *pH*, кислотність, а також інтенсивність перекисного окислення ліпідів у залежності від температури і терміну зберігання (20, 4, –12, –196 °С). Виявлено, що заморожування та зберігання при температурах нижче 0 °С до 28 діб не приводять до достовірної зміни вивчених показників. Установлено граничні терміни зберігання при температурах вище 0 °С. Показана інформативність хемілюмінесцентного методу вивчення пероксидації ліпідів молозива.

Such characteristics of colostrum quality as *pH*, acidity, as well as the intensity of lipid peroxidation depending on temperature and storage time (20, 4, –12, –196 °C) were studied. It was revealed that freezing and storage under subzero temperatures up to 28 days did not result in a statistical significant change in the studied indices. The deadline terms of storage under above-zero temperatures were established. An informative ability of chemiluminescent method of the studying of colostrum lipid peroxidation was demonstrated.

Загрязненность продуктов радионуклидами, пестицидами, тяжелыми металлами и другими токсикантами, несбалансированное питание являются причинами ухудшения здоровья, в частности, нарушений иммунного статуса, развития заболеваний органов пищеварения. Люди, которые проживают на радиационно загрязненных территориях, имеют иммунологические и цитогенетические нарушения в организме [3]. Повышение качества пищи должно способствовать устранению обменных нарушений и нормализации минерального и витаминного обменов. Во всем цивилизованном мире употребляют, кроме непосредственно пищевых продуктов, так называемые пищевые добавки, содержащие биологически активные вещества, которые могут либо влиять на отдельные органы и системы, либо в целом изменять адаптационные и иммунные процессы в организме.

В Украине уже давно ведутся разработки продуктов питания и пищевых добавок (их называют продуктами и добавками специального назначения), которые могут минимизировать негативное влияние на организм человека вредных факторов среды. Одной из таких высокоэффективных пищевых добавок может быть молозиво коров. Считается, что оно инициирует более 50 биологических процессов [12, 13], является мощным иммуностимулирующим фактором. В его состав входят специфические иммуноглобулины, которые передают пассивный иммунитет. В молозиве содержатся ферменты лизоцим, ксантиноксидаза, лактопероксидазы [2, 4, 5], обладающие бактерицидным и бактериостатическим действием [5]. Содержащийся в нем лактоферрин имеет противовоспалительные и антиоксидантные свойства, участвует в обмене ве-

The contamination of products by radionuclides, pesticides, hard metals and other toxicants, unbalanced nutrition are the causes of health aggravation, in particular, immune status impairments, development of diseases of digestive organs. People, living in contaminated with radiation territories, have immunological and cytogenetic impairments in the organism [3]. The food quality improvement should contribute to the removal of metabolic disorders and to the normalization of mineral and vitamin metabolism. In all civilized community in addition to food-stuffs the so-called nutrient additives are taken, which contain biologically active substances, which are rather able affect some organs and systems or change in the whole the adaptation and immune processes in an organism.

The developments of food products and additives (called as specially designed products and additives), which can minimize the negative effect of environmental factors to a human organism, have been performed within many years in Ukraine. Bovine colostrum can be one of such highly efficient nutrient additives. One considers that it initiates more than 50 biological processes [12, 13] and is a powerful immune stimulating factor. It comprises specific immunoglobulins, transferring a passive immunity. Colostrum contains enzymes of lisozymes, xantinoxidase, lactoperoxidase [2, 4, 5], having bactericide and bacteriostatic effect [5], containing in it lactoferrin has the anti-inflammatory and antioxidant properties, participates in metabolism, regulation of cellular proliferation, immune response [8, 9].

Матеріал, захищений авторським правом

ществ, регуляции клеточной пролиферации, иммунном ответе [8, 9].

В состав молозива входят витамины A, C, D, E, тиамин, рибофлавин, биотин [11], а также различные аминокислоты, среди них есть незаменимые, из минералов — кальций, магний, натрий, йод, марганец, фосфор и т.д.

В клинической практике молозиво эффективно при различных заболеваниях, в том числе иммунодефицитах, артритах, аллергиях, воспалениях, диабете, диарее, токсикозах [13, 14]. Молозиво используется как в жидком виде, так и в виде сублимационно высушенного порошка. Для успешного его применения необходимо создать запасы, что связано с проблемой хранения. Некоторое время (от получения до замораживания или лиофилизации) молозиво может храниться при положительных температурах. Если оно предназначено для использования в жидком виде, то возможно хранение в замороженном состоянии при умеренно низких температурах. При этих же температурах или в жидком азоте молозиво может храниться до его сублимационного высушивания. В данной работе мы изучали влияние хранения молозива коров 2–3-х суток лактации при различных температурах на его качество (в этот период показатели качества относительно стабильны). В первые сутки и в течение 4–5-х суток эти показатели претерпевают значительные изменения и к 6–7-м суткам приближаются к показателям молока [8]. При этом молозиво характеризуется более высоким содержанием белка и жира, а также сухого вещества по сравнению с молоком. Значительная часть белка представлена иммуноглобулинами [12].

Использовалось молозиво со следующими показателями качества: плотность–1,175 ± 0,010 г/мл, кислотность — 50,1 ± 2,4 °Т, *pH* — 6,30 ± 0,06, содержание жира — 5,6 ± 0,4%, белка — 8,1 ± 0,3%, сухого вещества — 15,5 ± 1,2%, золы — 0,907 ± 0,057%, класс чистоты — 1. Такие показатели качества молозива, как плотность, кислотность, *pH*, содержание жира, белка, сухого вещества и золы, а также класс чистоты определяли в соответствии с методами, описанными в [6]. Плотность молозива измеряли с помощью ареометров типа ИСП.А1, а *pH* иономером И-121. Кислотность определяли методом титрования 0,1 молярным раствором NaOH и выражали в градусах Тернера (°Т), содержание жира — кислотным методом, который основан на выделении жира из молочных продуктов под действием концентрированной серной кислоты и изоамилового спирта с последующим центрифугированием и измерением объема выделившегося жира. Количество белка определяли колориметрическим методом, основанном на способности белков молозива при *pH* ниже изоэлектрической точки связывать кислые красители, образуя с ними нерастворимый комплекс. При этом оптическая плотность раствора красителя уменьшается пропорционально количеству белка. В качестве красителя использовали кислотный сине-черный. Содержание сухого вещества и зольность определяли высушиванием и сжиганием навески молозива и взвешиванием сухого остатка и золы соответственно, класс чистоты — фильтрованием молозива через ватные фильтры.

Характер перекисных процессов изучали хемилюминесцентным методом. Хемилюминесценцию

Colostrum comprises vitamins A, C, D, E, thiamine, riboflavin, biotin, as well as different aminoacids, including unchangeable ones, among minerals — calcium, magnesium, sodium, iodine, manganese, phosphorus etc.

In clinical practice colostrum is efficient at various diseases, including immune deficiencies, arthritis, allergies, inflammations, Diabetes, diarrhea, toxicosis [13, 14]. Colostrum is used both in a liquid state and as a powder, frozen-dried by means of sublimation. For its successful application it is necessary to create the stocks, that is related to the problem of storage. Certain time (from procurement to freezing or freeze-drying) colostrum can be stored under positive temperatures. If it is designated for usage in a liquid state, the storage in a frozen state is possible under moderately low temperatures. Colostrum can be stored under the same temperatures or in a liquid nitrogen up to its freeze-drying by means of sublimation. In this work we studied the storage effect of bovine colostrum of the 2nd-3rd day of lactation on its quality under various temperatures (in this period the quality indices are relatively stable). In the first days and within the 4th-5th day these indices considerably change and by the 6th-7th day approach to the milk indices [8]. Thereat colostrum is characterized by the higher content of protein and fat, as well as a dry substance in comparison with the milk. A significant part of protein is presented by immunoglobulins [12].

We used colostrum with the following quality indices: density — 1.175 ± 0.010 g/ml, acidity — 50.1 ± 2.4 °T, *pH* — 6.30 ± 0.06, fat content — 5.6 ± 0.4%, protein — 8.1 ± 0.3%, dry substance — 15.5 ± 1.2, ash — 0.907 ± 0.057%, the purity grade — 1. Such indices of colostrum quality as density, acidity, *pH*, content of fat, protein, dry substance and ash, as well as the purity class were determined according to the methods described in the [6]. One measured colostrum density by means of areometers of ISP. A type, and *pH* — using I-121 ionometer. Acidity was determined using the method of titration by 0.1 molar solution of NaOH and expressed in Turner degrees (°T), fat content was detected using an acid method, based on the fat isolation from milk products under the effect of concentrated sulphuric acid and isoamyl alcohol with following centrifugation and measurement of isolated fat volume. Protein number was found out using a colorimetric method, based on the capability of colostrum protein at *pH* lower than isoelectric point to bind acid dyes, forming with them a non-soluble complex. Thereat an optical density of dye solution reduces proportionally to the protein quantity. As a dye we used an acidic blue black one. The content of dry substance and ash were determined by drying and burning of colostrum loading and weighing of a dry residual and ash correspondingly, the purity grade — by colostrum filtering through cotton-wool filters.

Матеріал, захищений авторським правом

индуцировали, добавляя в ячейку хемилюминометра, содержащую 1 мл дистиллированной воды и 100 мкл молозива, 100 мкл раствора Fe^{++} или H_2O_2. Конечная концентрация Fe^{++} – 10^{-3} моль, H_2O_2 – 0,5%. Светосумму хемилюминесценции измеряли в течение 10 и 30 с соответственно и выражали в условных единицах.

Для замораживания контейнеры с молозивом помещали в морозильную камеру холодильника (–12 °С) или погружали в жидкий азот (–196 °С). Хранили молозиво при 4 °С в бытовом холодильнике, а при 20 °С – в комнатных условиях.

При хранении молозива как при положительных, так и отрицательных температурах происходят различные биохимические процессы, изменяющие *pH* и кислотность, что может быть вызвано наличием в нем микроорганизмов. В свою очередь изменение *pH* приводит к нарушению конформации белковых молекул или их денатурации и, следовательно, к потере их биологической активности. Таким образом, контроль этих показателей в процессе хранения молозива является необходимым.

В табл. 1 представлены данные по изменению *pH* молозива в зависимости от температуры и срока хранения. Как видно из представленных данных, хранение молозива при –12 и –196 °С в течение 28 сут не приводит к изменению *pH*. При температурах хранения 20 и 4 °С *pH* достоверно отличается от контроля через 7 и 14 сут соответственно. Дальнейшее хранение молозива при этих температурах приводит к его скисанию. Это связано, по-видимому, с тем, что при околонулевых положительных температурах интенсивность метаболизма молочнокислых бактерий снижена и в связи с этим *pH* молозива снижается менее быстро, чем при комнатной температуре. Кислотность молозива во время хранения до 28 сут при отрицательных температурах также не изменяется (табл. 2). Однако во время хранения при положительных температурах этот показатель изменяется более значительно (относительно контроля), чем *pH*. Так, если через 14 сут хранения при 4 °С *pH* молозива уменьшается примерно на 8%, то кислотность увеличивается на 58%. Это свидетельствует о том, что в молозиве происходят более глубокие и разнообразные биохимические изменения по сравнению с теми, которые

The character of peroxide processes was studied by means of chemiluminescence method, which was induced by adding 100 μl of Fe^{++} or H_2O_2 solution into a cell of chemiluminometer and 100 ml of colostrum. A final concentration of Fe^{++} was 10^{-3} M, H_2O_2 – 0.5%. The total light sum of chemiluminescence was measured within 10 and 30 s correspondingly and expressed in conditional units.

For freezing the containers with colostrum were placed into a refrigerator's freezing chamber (–12 °C) or immersed into a liquid nitrogen (–196 °C). Colostrum was stored at 4 °C in domestic refrigerator and at 20 °C – under room conditions.

During colostrum storage both under positive and negative temperatures there are different biochemical processes, changing *pH* and acidity, that can be caused by the microorganism presence in it. In its turn the change in *pH* results in the disorder of conformation of protein molecules or their denaturation and consequently in the lost of their biological activity. Thus, it is necessary to control these indices during the process of colostrum storage.

The data on the change in colostrum *pH*, depending on the temperature and storage term are presented in the Table 1. As it is seen from the data presented, the storage of colostrum at –12 and –196 °C during 28 days does not result in *pH* change. Under temperatures of storage of 20 and 4 °C *pH* does not significantly differ from the control in 7 and 14 days, correspondingly. Further colostrum storage under these temperatures results in its souring. It is related to the fact, that under about zero positive temperatures the metabolism intensity of lactobacilli is reduced and in this connection the colostrum *pH* decreases less quickly than at room temperature. Colostrum acidity during the storage up to 28 days under negative temperatures does not also change (Table 2). However during the storage under positive temperatures this index changes more significantly (regarding to the control), than *pH*. So, if in 14 days of storage

Таблица 1 **Table 1**

Изменение *pH* молозива в зависимости от температуры и срока хранения

The change in the colostrum *pH* depending on the temperature and storage term

Температура хранения, °С Temperature of storage, °С	Срок хранения, сут Storage term, days			
	7	14	21	28
20	5,15 ± 0,10*	—	—	—
4	6,27 ± 0,10	5,81 ± 0,07*	—	—
–12	6,28 ± 0,12	6,29 ± 0,13	6,30 ± 0,09	6,31 ± 0,07
–196	6,30 ± 0,11	6,29 ± 0,11	6,31 ± 0,10	6,31 ± 0,06

Примечания. *pH* молозива при получении (контроль) равен 6,29 ± 0,06; * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Notes. *pH* of colostrum during obtaining (the control) is equal to 6.29 ± 0.06; * — the differences are statistically significant in comparison with the control, $p < 0.05$.

Таблица 2 **Table 2**

Кислотность молозива (°Т) в зависимости от температуры и срока хранения

Colostrum acidity (°T) depending on the temperature and storage term

Температура хранения, °С Temperature of storage, °С	Срок хранения, сут Storage term, days			
	7	14	21	28
20	92 ± 8*	—	—	—
4	50 ± 5	76 ± 7*	—	—
–12	48 ± 4	51 ± 7	51 ± 5	53 ± 7
–196	52 ± 5	54 ± 6	52 ± 7	52 ± 6

Примечания. Кислотность молозива при получении (контроль) равна 48 ± 6; * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Notes. Colostrum acidity during obtaining (the control) is equal to 48 ± 6; * — the differences are statistically significant in comparison with the control, $p < 0.05$.

Матеріал, захищений авторським правом

влияют на изменение *pH*, т.е. кислотность по сравнению с *pH* является более чувствительным показателем качества молозива и отражает более широкий спектр биохимических изменений в продукте.

Так как содержание жира в молозиве составляет около 5,6%, то при контакте ненасыщенных жирных кислот липидов с кислородом воздуха возможно их перекисное окисление. Органолептически это проявляется в прогоркании жиров [6]. Однако изменения в липидах начинаются намного раньше, чем определенные стандартным методом, но могут быть выявлены хемилюминесцентным методом, который является наиболее чувствительным при изучении перекисных процессов в липидах [7].

В норме жировые глобулы молозива окружены белковой оболочкой, которая защищает их от контакта с внешними веществами, в том числе и с кислородом. Кроме того, молозиво содержит антиоксиданты, например токоферолы, а также лактоферрины, которые являются хелаторами железа и таким образом предотвращают развитие цепных реакций перекисного окисления, для разветвления которых необходимы ионы двухвалентного железа [1, 10].

В табл. 3 и 4 представлены данные интенсивности хемилюминесценции молозива, индуцированной двухвалентным железом и перекисью водорода соответственно. Первый показатель отражает интенсивность перекисных процессов в липидах, светосумма хемилюминесценции пропорциональна количеству свободных радикалов. Второй показатель отражает устойчивость липидов к перекисному окислению. В этом случае светосумма прямо пропорциональна доступности липидов для окислителя и обратно пропорциональна мощности антиоксидантных систем. Биохимические изменения в белках, протекающие во время хранения, могут приводить к тому, что изоляция липидов белками станет менее надежной. Возможно также уменьшение количества антиоксидантов. Как видно из табл. 3, 4, показатели перекисного окисления липидов во время хранения молозива при отрицательных температурах остаются на уровне контроля до 28 сут. На 7-е сутки хранения молози-

the colostrum *pH* reduces approximately by 8%, the acidity increases by 58%. This fact testifies that deeper and more versatile changes in comparison with those, which affect *pH* change, occur in colostrum, i.e. the acidity in comparison with *pH* is more sensitive colostrum quality index and reflects more wide spectrum of biolchemical changes in the product.

As fat content in colostrum makes about 5.6%, when contacting non-saturated lipid fat acids with air oxygen their peroxidation is possible. It manifests by an organoleptic way in rancidity [6]. However the changes in lipids begin much earlier and can be find out by chemiluminescent method, which is more sensitive when studying peroxide processes in lipids [7].

In the norm colostrum's fat globules are surrounded with protein cover, which protects them against the contact with external substances, including oxygen. Besides, colostrum contains the antioxidants, for example tocopherols, as well as lactoferrins, which are the iron chelating agents and by such a way prevent the development of chain reactions of peroxidation, for which branching the ions of bivalent iron are necessary [1, 10].

In the Table 3 and 4 there are the data of the intensity of colostrum chemiluminescence, induced by a bivalent iron and hydrogen peroxide, correspondingly. The first index reflects the intensity of peroxide processes in lipids, the light-sum of chemiluminescence is proportionally to the number of free radicals. The second index reflects the resistance of lipid to peroxidation. In this case the light-sum is directly proportional to the lipid availability for an oxidant and inversely proportional to antioxidant system power. Biochemical changes in proteins, proceeding during the storage, can result in the fact, that the isolation of lipids by proteins will be less reliable. A decrease in the antioxidant number is also possible. As it is seen from the Tables 3 and 4, the indices of lipid peroxidation during colostrum storage under negative temperatures remain at the control level up to

Таблица 3 **Table 3**

Светосумма хемилюминесценции молозива (усл. ед), индуцированной Fe^{++}, в зависимости от температуры и срока хранения

Total light sum of colostrum chemiluminescence (relative units), induced by Fe^{++} depending on temperature and storage term

Температура хранения, °C Temperature of storage, °C	Срок хранения, сут Storage term, days			
	7	14	21	28
20	$91 \pm 5^*$	—	—	—
4	$40 \pm 3^*$	$90 \pm 4^*$	—	—
–12	24 ± 2	24 ± 2	25 ± 2	30 ± 3
–196	20 ± 3	21 ± 1	20 ± 1	19 ± 4

Примечания. Светосумма хемилюминесценции молозива при получении (контроль) равна 20 ± 3. * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Notes. Total light sum of colostrum chemiluminescence during obtaining (the control) is equal to 20 ± 3; * — the differences are statistically significant in comparison with the control, $p < 0.05$.

Таблица 4 **Table 4**

Светосумма хемилюминесценции молозива (усл. ед.), индуцированной H_2O_2, в зависимости от температуры и срока хранения

Total light sum of colostrum chemiluminescence (relative units), induced by H_2O_2 depending on temperature and storage term

Температура хранения, °C Temperature of storage, °C	Срок хранения, сут Storage term, days			
	7	14	21	28
20	$1\,877 \pm 107^*$	—	—	—
4	$856 \pm 40^*$	$1\,578 \pm 69^*$	—	—
–12	389 ± 27	399 ± 15	434 ± 33	447 ± 29
–196	364 ± 23	360 ± 28	388 ± 26	394 ± 15

Примечания. Светосумма хемилюминесценции молозива при получении (контроль) равна 359 ± 31. * — различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Notes. Total light sum of colostrum chemiluminescence during obtaining (the control) is equal to 359 ± 31; * — the differences are statistically significant in comparison with the control,

Матеріал, захищений авторським правом

ва при 20 °С показатели хемилюминесценции так же, как *pH* и кислотность, отличаются от таких же показателей контроля. Однако во время хранения молозива при 4 °С интенсивность хемилюминесценции, индуцированной двухвалентным железом, отличается от контроля уже к 7-м суткам хранения, что свидетельствует о развитии процесса перекисного окисления в липидах. Можно отметить, что к этому моменту *pH* и кислотность остаются на уровне контроля, т.е. хемилюминесцентным методом изменения в липидах при хранении молозива выявляются в более ранние сроки, чем при использовании традиционных методов оценки качества молокопродуктов.

Таким образом, из представленных результатов можно сделать вывод, что хранение молозива коров при отрицательных температурах до 28 сут не приводит к неблагоприятным изменениям исследованных показателей его качества. Продолжительность хранения при положительных температурах ограничена несколькими днями. При этом изменения в липидах продукта хемилюминесцентным методом выявляются в более ранние сроки, и метод может быть использован как экспресс-метод оценки качества молозива в процессе его хранения или переработки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белизи С., Назарова И. А., Климова И. А. и др.* Антиоксидантные свойства лактоферрина из женского молока // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1999.– № 5.– С. 523–525.
2. *Вершигора А. Е.* Общая иммунология.– Киев: Вища шк., 1989.– 736 с.
3. *Возіянов О. Ф.* Чорнобиль — по десяти роках // Журн. АМН України.– 1996.– 2, № 2.– С. 187–190.
4. *Денисова И. И., Крашенюк А. И., Ажицкий Г. Ю. и др.* Выделение и очистка лактопероксидазы из коровьего молока // Вопр. мед. химии.– 1986.– № 1.– С. 116–119.
5. *Лабанская А. С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 394 с.
6. *Молоко.* Молочные продукты и консервы молочные.– М.: Изд-во стандартов, 1989.– 448 с.
7. *Проблема* анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика.– 1986.– 18.– 136 с.
8. *Саидов Г. А.* Сравнительная оценка айширской, голландской и холмогорской пород по составу молозива, молока и качеству сыра: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Дубровицы, 1980.– 19 с.
9. *Сухарев А. Е., Николаев А. А., Николаева Н. Н., Сухарева Н. А.* Лактоферрин и продукты деградации фибриногена в слюне // Лаб. дело.– 1991.– № 5.– С. 20–24.
10. *Якубовская Р. И., Немцова Е. Р., Коханова И. Д. и др.* Лактоферрин человека: получение высокоочищенных препаратов из молока женщин, некоторые физико-химические свойства и распределение в нормальных и опухолевых тканях // Вопр. мед. химии.– 1986.– 32, № 6.– С. 75–79.
11. *Bouda J.* Vitamins E and C in the blood plasma of cows and their calves fed from buskets // Acta Veterinaria Brno.– 1980.– 49, № 1, 2.– P. 53–58.
12. *Clark D. G., Wyatt K.* Colostrum, Life's First Food: the ultimate anti-aging, weight-loss and immune supplement.– CNR Publications, Salt Lake City, 1996.– 176 p.
13. *Ogra P. L., Losonsky G. A., Fishaut M.* Colostrum derived immunity and maternal neonatal interaction // Annals of NY of Sciences.– 1983.– 409.– P. 82–92.
14. *Ungar A., Ward D., Fayer F., Quinn K.* Cessation of Cyptosporidium- associated diarrhea in an AIDS patient after oral treatment with hyperimmune bovine colostrum // Gastroenterology.– 1990.– 98.– P. 486–489.
15. *Wilson N., James J.* Immune system breakthrough: colostrum // J. Longevity.– 1998.– 4, № 2.– P. 48–51.

Поступила 28.11.2000

28 days. On the 7th day of colostrum storage at 20 °C the indices of chemiluminescence, as well as *pH* and acidity differ from those of the control. However during colostrum storage at 4 °C the chemiluminescence intensity, induced by bivalent iron differs from the control even by the 7th storage day, that testifies to the development of peroxidation process in lipids. We can note, that by this moment *pH* and acidity remain at the control level, i.e. using the chemiluminescence method the changes in lipids at colostrum storage are revealed in earlier terms, than using traditional methods for milk product quality estimation.

Thus, from the results presented we can conclude that the bovine colostrum storage under negative temperatures up to 28 days does not result in the changes of the studied indices of its quality. The storage duration under positive temperatures is limited by some days. Thereat using the chemiluminescence method the changes in the product lipids are revealed in earlier terms and this method can be used as an express-method for colostrum quality estimation during its storage or processing.

REFERENCES

1. *Belizi S., Nazarova I.A., Klimova I.A. et al.* Antioxidant properties of lactoferrin from woman's milk // Bulleten' eksperimental'noj biologii i meditsiny.– 1999.– № 5.– P. 523–525.
2. *Vershigora A. E.* General Immunology.– Kiev: Vyscha shkola, 1989.– 736 p.
3. *Voziyanov O. F.* Chernobil — in ten years // Journal of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine.– 1996.– 2, № 2.– P. 187–190.
4. *Denisova I. I., Krashenyuk A. I., Azhitsky G. Yu. et al.* Isolation and purification of lactoperoxidase from bovine milk // Voprosy meditsinskoj khimii.– 1986.– № 1.– P. 116–119.
5. *Labanskaya A. S.* Microbiology with the technique of microbiological investigations.– M.: Meditsina, 1978.– 394 p.
6. *Milk.* Milk and canned miik products.– M.: Edition of Standards, 1989.– 448 p.
7. *Problem* of analysis of lipid peroxidation endogenous products // Itogi nauki i tekhniki. Ser. Biofizika.– 1986.– 18.– 136 p.
8. *Saidov G. A.* Comparative estimation of Ayrshire, Holland and Kholmogorskaya cow breeds by the composition of colostrum, milk and cheese quality: Abstr. Thesis... Candidate Biol. Sci.– Dubrovitsy, 1980.– 19 p.
9. *Sukharev A. E., Nikolayev A. A., Nikolayeva N. N., Sukhareva N. A.* Lactoferrin and products of fibrinogen degradation in saliva // Laboratornoye delo.– 1991.– № 5.– P. 20–24.
10. *Yakubovskaya R. I., Nemtsova E. R., Kokhanova I. D. et al.* Human lactoferrin: obtaining of highly purified preparations from female milk, some physical and chemical properties and distribution in normal and humoral tissues // Voprosy meditsinskoy khimii.– 1986.– 32, № 6.– P. 75–79.
11. *Bouda J.* Vitamins E and C in the blood plasma of cows and their calves fed from buskets // Acta Veterinaria Brno.– 1980.– 49, № 1, 2.– P. 53–58.
12. *Clark D. G., Wyatt K.* Colostrum, Life's First Food: the ultimate anti-aging, weight-loss and immune supplement.– CNR Publications, Salt Lake City, 1996.– 176 p.
13. *Ogra P. L., Losonsky G. A., Fishaut M.* Colostrum derived immunity and maternal neonatal interaction // Annals of NY of Sciences.– 1983.– 409.– P. 82–92.
14. *Ungar A., Ward D., Fayer F., Quinn K.* Cessation of Cyptosporidium- associated diarrhea in an AIDS patient after oral treatment with hyperimmune bovine colostrum // Gastroenterology.– 1990.– 98.– P. 486–489.
15. *Wilson N., James J.* Immune system breakthrough: colostrum // J. Longevity.– 1998.– 4, № 2.– P. 48–51.

Accepted in 28.11.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.441.-02: 616.441-089.87: 617-089.843 UDC 616.441.-02: 616.441-089.87: 617-089.843

Влияние аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы на гормональный и иммунный статус больных постоперационным гипотиреозом

Ю. И. КАРАЧЕНЦЕВ, И. А. ЛЯХ

Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского АМН Украины, г. Харьков

В. А. МАКЕДОНСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Allotransplantation Effect of Cryopreserved Thyroid Gland Tissue on Hormonal and Immune Status of Patients with Postoperative Hypothyrosis

Yu. I. KARACHENTSEV, I. A. LYAKH

Institute for Problems of endocinic pathology named by V. Ya. Danilevskii of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov

V. A. MAKEDONSKAYA

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

Изучены гормональные и иммунные показатели больных постоперационным гипотиреозом до и в различные сроки после аллотрансплантации криоконсервированной ткани щитовидной железы (ЩЖ). Отмечены продолжительный клинический эффект трансплантации, нормализация гормонального тиреоидного статуса. Не выявлено специфического влияния аллотрансплантации на иммунный статус организма реципиента.

Вивчено гормональні та імунні показники хворих постопераційним гіпотиреозом до і в різні терміни після алотрансплантації кріоконсервованої тканини щитовидної залози (ЩЗ). Відзначено тривалий клінічний ефект трансплантації, нормалізація гормонального тиреоїдного статусу. Не виявлено специфічного впливу алотрансплантації на імунний статус організму реципієнта.

Hormonal and immune indices of the patients with postoperative hypothyrosis before and after different terms after allotransplantation of cryopreserved thyroid gland tissue (TG) were studied. Long-term clinical transplantation effect, normalization of hormone thyroid status were noted. No specific allotransplantation effect on the immune status of a recipient's organism was noted.

В современных условиях возрос интерес клиницистов к пересадке желез внутренней секреции как к альтернативному методу лечения, так как заместительная гормональная терапия далеко не всегда эффективна из-за возникновения рефрактерности к вводимым извне гормонам или развития побочных реакций. Трансплантация является физиологическим методом коррекции гормональной недостаточности, когда уровень секреции гормонов соответствует необходимой потребности в них [1, 4].

Ориентируясь на опыт Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины в создании технологии и аппаратного обеспечения криоконсервирования биологических объектов и на клинические исследования, проведенные в Институте проблем эндокринной патологии АМН Украины, разработан метод лечения гипотиреоза путем

Under present conditions the attention of clinicians' to endocrine glands transplantation as an alternative treatment method increased, since substitutive hormone therapy is not always efficient due to the appearance of refractory response to the hormones introduced, or development of side effects. Transplantation is physiological method of hormone insufficiency correction, when the level of hormone secretion corresponds to their necessity [1, 4].

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, assuming the experience in the creation of technology and apparatus providing of bioobjects cryopreservation, as well as to clinical investigations, carried-out at the Institute for Problems of Endocrine Pathologies of the Academy of Medical Sciences of the Ukraine, elaborated the method for hypothyrosis

Матеріал, захищений авторським правом

ауто- и аллотрансплантации деконсервированной ткани ЩЖ человека, длительно хранившейся в условиях низкотемпературного банка [3, 4]. Была обоснована клиническая эффективность аутотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ у больных различными формами первичного гипотиреоза [3, 8].

Цель данного исследования — изучение эффективности аллотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ у больных постоперационным гипотиреозом

Проведено клиническое, гормональное, иммунологическое обследование 50 больных в возрасте 25–50 лет, ранее оперированных с диагнозом диффузный токсический зоб (ДТЗ) и смешанный зоб, с постоперационным гипотиреозом средней тяжести до и в различные сроки после аллотрансплантации криоконсервированной ткани ЩЖ.

До поступления в клинику больным проводили заместительную терапию. До госпитализации доза L-тироксина у 35 больных составляла 150–200, у 15 — более 200 мкг/сут. Однако полной компенсации гипотиреоза достичь не удавалось.

В качестве аллотрансплантата использовали тиреотоксически измененную ткань ЩЖ, полученную после ее субтотальной резекции у больных ДТЗ. Ткань ЩЖ подвергалась гистологическому и бактериологическому исследованию.

Из кортикального слоя железы выкраивали 8–10 пластинок в виде прямоугольников размерами 2–2,5 и 1–1,5 см, толщина пластинок составляла 0,2–0,3 см. Вес каждой пластинки — около 1 г. Заготовленные пластинки ЩЖ помещали во фторопластовые пакеты с консервирующей средой, которая содержала 100 г жидкости Хенкса, 1 мг йодистого калия (стабилизатора биосинтеза тиреоидных гормонов) и 10 г криопротектора димексида. Пакеты с трансплантатом в консервирующей среде герметизировали и после 45-минутной экспозиции при температуре 0 °С замораживали до –196 °С со скоростью 5–7 °С/мин.

Криоконсервированная ЩЖ хранилась в условиях сверхнизкой температуры (–196 °С) до момента, когда возникала необходимость в трансплантации. При гистологическом исследовании ткани особое внимание обращалось на степень выраженности лимфоидно-плазмоцитарной инфильтрации и структурных признаков возбуждения функции ЩЖ.

Для трансплантации отбирали железы больных более молодого возраста с менее продолжительным анамнезом тиреотоксикоза и с меньшими сроками антитиреоидной терапии, а также наиболее выраженными структурными признаками возбуждения их функции и минимальной степенью лимфоплазмоцитарной инфильтрации.

Для подбора пар донор–реципиент был создан банк криоконсервированных ЩЖ потенциальных доноров. В настоящее время в низкотемпературном

treatment by auto- and allotransplantation of human frozen-thawed TG tissue [3, 8], stored for a long time under conditions of low temperature bank [3, 4].

The aim of given work was to study the efficiency of allotransplantation of TG cryopreserved tissue in patients with postoperative hypothyrosis.

Clinical, hormonal, immunological investigation of 50 patients of 25–50 years, operated earlier with the diagnosis of diffuse toxic goiter (DTG) and goiter combined with postoperative hypothyrosis of an average severity before and with various terms after allotransplantation of cryopreserved TG tissue was carried-out.

Before clinical treatment the patients were subjected to substitutive therapy. Before hospitalization in 35 patients L-thyroxin dosage made 150–200, in 15 — more than 200 μg/day. However a complete hypothyrosis compensation was not achieved.

Thyrotoxically changed TG tissue, obtained after its subtotal resection in the patients with DTG, was used as allotransplant. TG tissue was subjected to histological and bacteriological investigation.

From eight to ten 2–2.5 and 1–1.5 cm rectangles like plates were cut out from the cortical gland layer, plate thickness made 0.2–0.3 cm. The weight of each plate was about 1 g. The TG-prepared plates were put into fluoroplastic packets with the preserving medium, containing 100 g of the Hanks' medium, 1 mg of potassium iodide (stabilizer of thyroid hormones biosynthesis) and 12.5 g of DMSO. Bagswith transplant in the preserving medium were sealed and after 10–15 min exposure under 0 °C temperature were frozen down to –196 °C with 5–7 °C/min rate.

Cryopreserved TG was stored under the conditions of ultra-low temperature (–196 °C) up to the moment of the necessity for transplantation. Under tissue histological investigation a special attention was paid to the level of manifestation of lymphoid-plasmocyte infiltration and structural signs excitation of TG function.

Glands from younger patients with shorter term of thyrotoxicosis anamnesis and less terms of antithyroid therapy, as well as more manifested structural signs of their function excitation and minimum degree of lympho-plasmatic infiltration, were selected. The bank of cryopreserved TG was created. Nowadays there are more than 2 500 samples of cryopreserved TG tissue in the low-temperature bank.

The selection of donor–recipient couples is carried-out basing on the matching of blood group and rhesus-factor, as well as on HLA system by three locuses (A, B, C).

Allotransplantation of cryopreserved TG was conducted to 50 patients with postoperative hypothyrosis under a local infiltrational anesthesia into subcutaneous fat of anterior abdominal wall. 6–10 plates of TG tissue were put into the channel.

Clinical, hormone and immunological control was carried-out before allotransplantation and in 1, 3, 6 and 12 months after it.

Матеріал, захищений авторським правом

банке находится более 2 500 образцов криоконсервированной ткани ЩЖ.

Подбор пар донор–реципиент осуществляется на основании совпадения группы крови и резус-фактора, а также по системе HLA по трем локусам (A, B, C).

Аллотрансплантация криоконсервированной ЩЖ была проведена 50 больным постоперационным гипотиреозом под местной инфильтрационной анестезией в подкожную клетчатку передней брюшной стенки. В ложе укладывали 6–10 пластинок ткани ЩЖ донора.

Клинический, гормональный и иммунологический контроль осуществляли до аллотрансплантации и через 1, 3, 6 и 12 мес после нее.

Содержание трийодтиронина (T_3), тироксина (T_4), тиреотропного гормона (ТТГ) определяли с помощью наборов "SPAK-T_3", "SPAK-T_4" "Pia-mat-NSH".

Для изучения антитиреоидных антител использовали иммуноферментный метод. Состояние клеточного иммунитета определяли методом розеткообразования по Фримелю [6], антигены системы HLA – стандартным двухступенчатым микролимфоцитотоксическим методом с применением панели типирующих сывороток Санкт-Петербургского НИИ гематологии и переливания крови, который позволяет распознать 16 аллелей локуса А, 21 аллель локуса В и 4 аллели локуса С главного комплекса гистосовместимости.

Статистическая обработка полученных данных проведена методом вариационной статистики с применением критериев Стьюдента–Фишера [2].

В результате проведенного исследования у всех больных после аллотрансплантации отмечено неосложненное течение постоперационного периода. Наблюдалось постепенное уменьшение явлений гипотиреоза. Все больные выписаны из клиники на 12–15-е сутки после операции с положительным лечебным эффектом, выразившемся в уменьшении явлений гипотиреоза. К моменту выписки у всех больных исчезла брадикардия, значительно уменьшились отеки, сухость кожи, сонливость, отмечена четкая тенденция к снижению веса, повысилась общая активность. При выписке больным не назначали прием тиреоидных гормональных препаратов.

При изучении эффективности аллотрансплантации криоконсервированной тиреоидной паренхимы у больных с постоперационным гипотиреозом отмечено, что уже через 4–6 мес после операции происходят значительное повышение уровня тиреоидных гормонов и снижение уровня тиреотропина до нормальных значений в плазме крови. Эта тенденция сохраняется до 1 года после трансплантации тиреоидной паренхимы (табл. 1).

Показатели индексов антител к тиреоглобулину (ТГ) и микросомальному антигену (МС) были относительно низкими ($0{,}310 \pm 0{,}019$ и $0{,}472 \pm 0{,}025$ соответственно), так как для аллотрансплантации ЩЖ подбирались больные с постоперационным гипотиреозом с минимальным напряжением гуморального антитиреоидного иммунитета. После аллотрансплантации не отмечено увеличение содержания в плазме крови циркулирующих антител к ТГ и МС (табл. 2).

Triiodinethyronine (T_3), thyroxin (T_4), thyrotropic hormone (TTH) content was evaluated by means of "Pia-mat-NSH", "SPAK-T_3", "SPAK-T_4" sets.

Immune-enzyme method was used for antithyroid antibodies investigation. The state of cellular immunity was measured by the method of rosettes formation according to Frimel [6], antigens of HLA system – by the standard two-step microlymphocytotoxic method using the panel of typing serums of R&D Institute for Hematology and Blood Transfusion (St. Peterburg), allowing to identify 16 alleles of A locus, 21 alleles of B locus and 4 alleles of C locus of the main histocompatibility complex.

Statistical processing of the obtained data was carried-out by the method of variation statistics using the Student–Fisher's criteria [2].

In the result of the investigation conducted, not-complicated course of postoperative period was observed for all patients after allotransplantation. Step by step reduction of hypothyrosis phenomena was observed. All patients were discharged from clinics to the 12th–15th day after operation with positive therapeutic effect, manifested in the decrease of hypothyrosis phenomena. Bradycardia was absent in all patients to the moment of discharge, edema, xeroderma, sleepiness significantly decreased. A straight tendency to the weight reduction was noted, patients' activity of patients increased. To the time of patients' discharge hormone thyroid preparations were not prescribed.

When studying the efficiency of cryopreserved thyroid parenchyma allotransplantation in patients with postoperative hypothyrosis it was noted, that just in 4–6 months after operation a significant increase of the level of thyroid hormones and reduction of thyrotropin level down to normal values in blood plasm, occurred. This tendency kept to 1 year after thyroid parenchyma transplantation (Table 1).

Antibodies indices to TG and microsome antigen (MA) were relatively low (0.31 ± 0.019 and 0.472 ± 0.025, correspondingly), because for TG allotransplantation the patients with postoperative hypothyrosis with minimum tension of humoral antithyroid immunity were selected. After allotransplantaion no increase of circulating antibodies to TG and MA in blood plasm was noted (Table 2).

A positive clinical dynamics of hypothyrosis allowed to unprescribe for the patients the substitutive hormone therapy within first 6 months after discharge, in 1 year in 62% of patients the level of thyroid hormones and thyrotropin in a blood plasm was in the limits of normal values. It should be noted, that when prescribing the thyroid preparations during hypothyrosis manifestation the dosage of substitutive therapy was by 2–3 times lower, than before transplantation.

When studying cellular immunity in patients under study, a significant decrease ($P < 0.05$) of

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1 **Table 1**

Динамика изменения гормональных показателей у больных постоперационным гипотиреозом после аллотрансплантации криоконсервированной ЩЖ

Dynamics of the change of hormone indices in patients with postoperative hypothyrosis after allotransplantation of cryopreserved TG

Группа больных Patients group	Исследуемый срок Term of investigation	Количество больных Patients number	Статистический показатель Statistical index	Гормональные показатели Hormone indices		
				T_3, нмоль/л T_3, nmol/l	T_4, нмоль/л T_4, nmol/l	ТТГ, мМЕ/л ТТН, mMU/l
1	Контроль Control	40	$X \pm S_x$	1,25 ± 0,024	108,60 ± 3,63	5,00 ± 0,30
2	До трансплантации Before transplantation	50	$X \pm S_x$ P_{1-2}	0,80 ± 0,06 < 0,05	40,66 ± 4,82 < 0,001	24,44 ± 2,32 < 0,001
3	1 мес после трансплантации 1 month after transplantation	48	$X \pm S_x$ P_{2-3}	1,30 ± 0,40 < 0,05	75,30 ± 6,13 < 0,02	10,22 ± 1,38 < 0,01
4	3 мес после трансплантации 3 months after transplantation	45	$X \pm S_x$ P_{2-4}	1,45 ± 0,42 < 0,05	68,40 ± 4,28 < 0,02	8,12 ± 1,42 < 0,01
5	6 мес после трансплантации 6 months after transplantation	42	$X \pm S_x$ P_{2-5}	1,50 ± 0,12 < 0,05	65,69 ± 3,39 < 0,02	6,14 ± 2,12 < 0,01
6	1 год после трансплантации 1 year after transplantation	39	$X \pm S_x$ P_{2-6}	1,48 ± 0,34 < 0,02	60,69 ± 2,28 < 0,02	4,01 ± 0,12 < 0,01

Примечание. *P* — достоверность различия между сравниваемыми группами.

Note: *P* — statistical significance of differences in compared groups.

Положительная клиническая динамика гипотиреоза позволила первые полгода после аллотрансплантации не назначать больным заместительную гормональную терапию. Через год у 62% пациентов уровень тиреоидных гормонов и тиротропина в плазме крови находился в пределах нормальных величин. Во всех наблюдениях отмечен эффект трансплантации, позволивший большей части больных обходиться без заместительной гормональной терапии. Следует отметить, что в случаях назначения тиреоидных препаратов при манифестации гипотиреоза доза заместительной терапии была в два-три раза ниже, чем до трансплантации.

При изучении клеточного иммунитета у исследуемых больных отмечалось достоверное ($P < 0,05$) снижение по отношению к показателям здоровых людей общих Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-супрессоров (табл. 3).

Через год после аллотрансплантации нормализация показателей количественного содержания Т-лимфоцитов имела место у 78% больных.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлен положительный эффект аллотрансплантации криоконсервированной ЩЖ у

Таблица 2 **Table 2**

Уровень антител к ТГ и МС в разные сроки после аллотрансплантации

Antibodies level to TG and MS in various terms after allotransplantation

Группа больных Patients group	Исследуемый срок Term of investigation	Количество больных Patients number	Статистический показатель Statistical index	Показатель индекса антител Antibodies index	
				к ТГ to TG	к МС to MS
1	До трансплантации Before transplantation	50	$X \pm S_x$	0,310 ± 0,019 $n = 24$	0,472 ± 0,025 $n = 26$
2	1 мес после трансплантации 1 month after transplantation	48	$X \pm S_x$ P_{1-2}	0,290 ± 0,015 < 0,1 $n = 28$	0,422 ± 0,037 < 0,1 $n = 24$
3	3 мес после трансплантации 3 months after transplantation	45	$X \pm S_x$ P_{1-3}	0,258 ± 0,018 < 0,1 $n = 22$	0,402 ± 0,031 < 0,1 $n = 21$
4	6 мес после трансплантации 6 months after transplantation	42	$X \pm S_x$ P_{1-4}	0,236 ± 0,033 < 0,1 $n = 23$	0,306 ± 0,028 < 0,1 $n = 20$
5	1 год после трансплантации 1 year after transplantation	39	$X \pm S_x$ P_{1-5}	0,297 ± 0,021 < 0,1 $n = 16$	0,319 ± 0,020 < 0,1 $n = 18$

Примечание. *P* — достоверность различия между сравниваемыми группами.

Note. *P* — statistical significance of differences in compared groups.

T-lymphocytes, T-helpers, T-suppressors in respect of the indices for health people, was noted (Table 3).

In a year after allotransplantation, the normalization of the indices of qualitative T-lymphocytes composition occurred in 78% of patients with posttransplantational hypothyrosis.

Thus, in the result of the investigation conducted a positive effect of cryopreserved TG allotransplantation in patients with postoperative hypothyrosis was revealed. No autoimmunizing effect of TG was noted.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3

Table 3

Показатели клеточного иммунитета больных постоперационным гипотиреозом до и в различные сроки после аллотрансплантации

Indices of cell immunity in patients with postoperative hypothyrosis before and in various terms after allotransplantation

Группа больных Patients group	Исследуемый срок Term of investigation	Количество больных Patients number	Статистический показатель Statistical index	Т-лимфоциты, относительное количество, % T-lymphocytes, relative number, %			Отношение Т-хелперов к Т-супрессорам Ratio of T-helpers to T-suppressors
				общие total	супрессоры suppressors	хелперы helpers	
1	Контроль Control	34	$X \pm S_x$	70,90 ± 2,20	17,42 ± 1,00	49,51 ± 2,70	2,84 ± 0,19
2	До трансплантации Before transplantation	30	$X \pm S_x$ P_{1-2}	55,60 ± 3,3 > 0,1	12,00 ± 1,02 < 0,02	40,50 ± 2,80 > 0,1	4,09 ± 0,53 < 0,05
3	1 мес после трансплантации 1 month after transplantation	30	$X \pm S_x$ P_{1-3} P_{2-3}	71,75 ± 5,31 > 0,1 > 0,1	14,82 ± 1,21 < 0,1 < 0,1	50,25 ± 4,54 > 0,1 > 0,1	3,39 ± 0,38 > 0,1 > 0,1
4	3 мес после трансплантации 3 months after transplantation	28	$X \pm S_x$ P_{1-4} P_{2-4}	68,50 ± 4,50 > 0,1 > 0,1	16,75 ± 1,36 > 0,1 < 0,05	55,00 ± 4,00 > 0,1 > 0,1	3,28 ± 0,87 > 0,1 > 0,1
5	6 мес после трансплантации 6 months after transplantation	25	$X \pm S_x$ P_{1-5} P_{2-5}	75,00 ± 4,00 > 0,1 < 0,1	16,50 ± 1,50 > 0,1 < 0,05	48,00 ± 4,58 > 0,1 > 0,1	2,86 ± 0,28 > 0,1 < 0,05
6	1 год после трансплантации 1 year after transplantation	24	$X \pm S_x$ P_{1-6} P_{2-6}	70,60 ± 3,80 > 0,1 > 0,1	19,20 ± 2,29 > 0,1 < 0,02	51,20 ± 1,32 > 0,1 > 0,1	2,66 ± 0,26 > 0,1 < 0,01

Примечание. *P* — достоверность различия между сравниваемыми группами.

Note. *P* — statistical significance of differences in compared groups.

больных с постоперационным гипотиреозом. Не отмечено ее аутоиммунизирующего действия.

Установлено, что аллотрансплантация криоконсервированной ЩЖ является физиологически адекватным методом лечения постоперационного гипотиреоза и может быть альтернативой заместительной гормональной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Анастасий Л. В., Малижев В. О.* Проблемы и пути их преодоления при аллотрансплантации эндокринных органов и клеток // Трансплантология.– 2000.– 1, № 1.– С. 138–140.
2. *Закс Л.* Статистическое оценивание.– М.: Статистика, 1976.– 180 с.
3. *Македонская В. А.* Криоконсервация и трансплантация ЩЖ // Сб. науч. тр. "Актуальные вопросы курортологии".– Харьков, 1998.– С. 56.
4. *Пушкарь Н. С., Чуйко Б. А., Утевский А. М., Цариковская Н. Г.* Консервация и трансплантация эндокринных органов и тканей.– Харьков, 1981.– 36 с.
5. *Пушкарь Н. С., Утевский А. М., Чуйко Б. А. и др.* Аутотрансплантация криоконсервированной (–196 °С) тиреоидной паренхимы как метод лечения гипотиреоза // Пробл. эндокринологии.– 1984.– 30, № 5.– С. 42–46.
6. *Фримель Д. А.* Иммунологические методы исследования.– М.: Медицина, 1987.– С. 46–54.
7. *А. с. 935050* СССР. Способ консервирования щитовидной железы человека / Н. С. Пушкарь, А. М. Утевский, Б. А. Чуйко, А. Ю. Петренко, Н. Г. Цариковская. Заявлено 10.11.78. Опубл. 15.06.82. БИ, 1982, № 22.– С. 26.
8. *Shimizu K., Nasahama M., Kitamuza V. et al.* Autotransplantation of cryopresirved thyroid tissues for the treatment of irreversible postoperative hypothyroid raves disease. Report of the first Cfse// Thyroidol Clin. Exp. 1997.- 9.- P. 23-26.

Поступила 23.01.2001

It has been established, that allotransplantation of cryopreserved TG is physiologically adequate treatment method and can be an alternative of substitutive hormone therapy at postoperative hypothyrosis.

REFERENCES

1. *Anastasiy L. V., Malizhev V. O.* Problems and ways of their overcoming under allotransplantation of endocrine organs and cells // Transplantology.– 2000.– 1, № 1.– P. 138–140.
2. *Zaks L. Statistical estimation.– M.: Statistika, 1976.– 180 p.*
3. *Makedonskaya V. A.* Cryopreservation and transplantation of thyroid gland // Collection of scientific works "Actual questions of health resortion".– Kharkov, 1998.– P. 56.
4. *Pushkar N. S., Chuyko B. A., Utevsky A. M., Tsarikovskaya N. G.* Preservation and transplantation of endocrine organs and tissues.– Kharkov, 1981.– 36 p.
5. *Pushkar N. S., Utevsky A. M., Chuyko B. A. et al.* Autotransplantation of cryopreserved (–196 °C) thyroid parenchyma as the method for hypothyrosis treatment // Problemy endokrinologii.– 1984.– 30, № 5.– P. 42–46.
6. *Frimel D. A.* Immunological methods for investigations.– M.: Meditsina, 1987.– P. 46–54.
7. *Author's Certificate* 935050 USSR. The way of human thyroid gland preservation / N. S. Pushkar, A. M. Utevskiy, B. A. Chuyko, A. Yu. Petrenko, N. G. Tsarikovskaya. Accepted in 10.11.78. Published 15.06.82. BI, 1982, № 22.– P. 26.
8. *Shimizu K., Nasahama M., Kitamuza V. et al.* Autotransplantation of cryopreserved thyroid tissues for the treatment of irreversible postoperative hypothyroid raves disease. Report of the first CFSE // Thyroidol Clin. Exp.– 1997.– 9.– P. 23–26.

Accepted in 23.01.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 611.013.68: 618.12-002-08

UDC 615.361.014.41: 611.013.68: 618.12-002-08

Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении женщин с хроническими сальпингоофоритами

Ю. А. МОШКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Application of Cord Blood Cryopreserved Serum for Treating Women with Chronic Salpingo-Oophoritis

Yu. A. MOSHKO

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

Изучали положительную динамику клинико-иммунологических показателей при использовании биопрепарата криоконсервированной сыворотки кордовой крови на 2-м этапе комплесного лечения женщин с хроническими неспецифическими сальпингоофоритами.

Вивчали позитивну динаміку клініко-імунологічних показників при використанні біопрепарату кріоконсервованої сироватки кордової крові на 2-му етапі комплексного лікування жінок з хронічними неспецифічними сальпінгоофоритами.

We studied a positive dynamics of clinical and immunological indices when using the biopreparation of cord blood cryopreserved serum at the 2nd stage of a combined treatment of women with chronic non-specific salpingo-oophoritis.

Первое место в структуре гинекологической патологии занимают воспалительные заболевания внутренних половых органов, причем у 42,8–72% больных воспалительный процесс локализуется в области придатков матки. В последние годы во всех странах мира наметилась тенденция к увеличению доли больных с хроническими формами воспаления [1, 5, 11].

Традиционные методы лечения хронических сальпингоофоритов не всегда позволяют добиться полной реабилитации больных, так как в большинстве случаев они базируются на использовании антибактериальных препаратов, в то время как в патогенезе хронических воспалительных заболеваний внутренних женских половых органов микроорганизм-возбудитель не играет уже ведущей роли, но остаются последствия воспалительной альтерации ткани — спайки, рубцы, трофические нарушения, которые поддерживают болевые ощущения, влияют на менструальную и генеративную функции. Явления иммунодефицита, которыми сопровождается хронический воспалительный процесс, в значительной степени определяют его течение и исход. Поэтому в лечении хронических воспалительных заболеваний придатков матки большое значение имеют средства, действие которых направлено на повышение естественной неспецифической защиты организма и иммунологической реактивности, в том числе биологические препараты, так называемые "биогенные стимуляторы" [1, 5, 6].

Развитие криобиологии в течение последних лет позволило разработать методы консервации различных биологических объектов, создать целый

Inflammatory diseases of internal genital organs take the first place in the structure of gynaecological pathology, moreover in 42.8–72% of patients an inflammatory process is localized in an uterine appendages area. Recently there is the worldwide tendency to the augmentation of the patients number with chronic forms of inflammation [1, 5, 11].

Traditional methods of chronic salpingo-oophoritis treatment do not always permit to achieve a complete rehabilitation of patients, since in the majority of cases they are based on the usage of antibacterial preparations, meanwhile in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases of internal female genital organs a microorganism-pathogene does not pay a leading role, but there are the consequences of tissue inflammatory alteration such as commissures, cicatrices, trophic disorders, which maintain painful sensations, disorder menstrual and generative functions. The immunodeficient phenomena, accompanying a chronic inflammatory process, determine in a significant extent its course and outcome. Therefore the means, which action is directed to an increase in natural non-specific protection of an organism and immunological reactivity, including biological preparations, so-called "biogenic stimulators", are of importance when treating chronic inflammatory diseases of uterine appendages [1, 5, 6].

Cryobiology development within a recent decade allowed to develop the methods of preservation of various biological objects, to create the number of biological preparations, which usage in clinical practice considerably increased the efficiency of therapy for many diseases [3, 4].

Матеріал, захищений авторським правом

ряд биологических препаратов, использование которых в клинической практике значительно повышает эффективность терапии многих заболеваний [3, 4].

Максимально сохраняя нативность тканей и органов длительное время, с помощью криобиологических технологий удалось получить принципиально новые биогенные стимуляторы, гораздо более эффективные по сравнению с "переживающими" тканями, предложенными основоположником тканевой терапии В. П. Филатовым [3].

Цель данной работы — изучение эффективности применения разработанного нами нового биологического препарата (криоконсервированной сыворотки кордовой крови) в комплексной терапии хронических неспецифических сальпингоофоритов [2].

Проведено клинико-иммунологическое обследование 74 больных хроническими неспецифическими сальпингоофоритами и 30 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста с сохраненными менструальной и генеративной функциями (контрольная группа).

На нарушения менструального цикла жаловались 69 (93,2%) больных, из них 58 (78,4%) связывали эти изменения с началом воспаления придатков матки. У 64,9% больных наблюдалась альгодисменорея, у 23,0% — гиперполименорея, у 29,7% — олигоопсоменорея. У 29 (39,2%) женщин было первичное и у 36 (50,8%) — вторичное бесплодие.

С помощью ультразвукового исследования аппаратами "Aloka SSD-256" (линейный датчик) и "1100-FLEXUS" (секторальный датчик) на протяжении менструального цикла определяли формирование и рост фолликула, наличие и время наступления овуляции.

Общее количество Т-лимфоцитов определяли методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК), "активных" Т-лимфоцитов (Еа-РОК) — с помощью теста "активного" розеткообразования. Методом теофиллинчувствительности Т-клеток исследовали уровень Т-хелперов (ТфР-Е-РОК), Т-супрессоров (ТфЧ-Е-РОК) и их индивидуальное соотношение. Количество В-лимфоцитов (ЕАС-РОК) оценивали методом розеткообразования с эритроцитами барана, обработанными антителами и комплементом, концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови — методом одномерной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по Manchini G. [7, 10].

Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови использовали тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), спонтанный и индуцированный 0,01%-м раствором иммуностимулятора тималина (цитохимический вариант НСТ-теста), и определяли параметры фагоцитарной реакции по отношению к микробной тест-культуре (суточной культуре *Staphilococcus epidermidis*) [7, 10].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

When maximally preserving the nativity of tissues and organs for a long time by means of cryobiological technologies we managed to obtain the principally new biogenic stimulators, much more efficient in comparison with the "surviving" tissues, which were proposed by V. P. Filatov, the founder of tissue therapy [3].

The aim of this work was to study the application efficiency of the developed by us new biological preparation (cord blood cryopreserved serum) in a combined therapy of chronic non-specific salpingo-oophoritis [2].

A clinical and immunological examination of 74 patients with chronic non-specific salpingo-oophoritis and 30 healthy non-pregnant women of reproductive age with kept menstrual and generative functions (the control group) was carried-out.

Menstrual cycle disorders were observed in 69 (93.2%) patients, 58 of them (78.4%) explained these changes by the beginning of the uterine appendages inflammation. Algodismenorrhea was observed in 64.9% of patients, hyperpolymenorrhea — in 23.0%, oligoopsomenorrhea — in 29.7%. The primary infertility was noted in 29 (39.2%) women and the secondary in 36 (50.8%) ones.

The follicle formation and growth, the presence and time of the ovulation coming were determined during a menstrual cycle using an ultrasound examination by the devices "Aloka SSD-256" (line detector) and "1100-FLEXUS" (sector detector).

A total number of T-lymphocytes was found out by the method of a spontaneous rosette-formation with ram erythrocytes (E-RFC), "active" T-lymphocytes (Ea-RFC) by means of "active" rosette-formation test. The level of T-helpers (TR-E-RFC), T-suppressors (TS-E-RFC) and their individual ratio were investigated using the method of T-cells theophyllinum sensitivity. B-lymphocyte number (EAC-RFC) was estimated using the rosette-formation method with ram erythrocytes, treated by antibodies and a complement, the immunoglobulins concentration in blood serum was evaluated by the method of a radial immune diffusion in an agar gel according to the Manchini G. [7, 10].

In order to estimate a phagocytic activity of blood neutrophiles we used the test of nitroblue tetrasolium recovery (NBT-test), spontaneous and induced by a 0.01% solution of immunostimulator thymalinum (a cytochemical version of NBT-test), and the determination of phagocytic reaction parameters in respect to a microbial test-culture (a day culture Staphilococcus epidermidis) [7, 10]. Statistical processing of the results obtained was performed according to the Student–Fisher's method.

A combined therapy of the disease was carried-out by stages. All 74 patients obtained the first stage of treatment (at the disease aggravation stage under gynaecological clinic conditions), which comprised: an etiotropic antibacterial treatment taking into consideration the results of bacteriological study, sensiti-

Матеріал, захищений авторським правом

Традиционно комплексную терапию заболевания осуществляли по этапам. Первый этап лечения (на стадии обострения заболевания), который прошли все 74 больные, включал: этиотропное антибактериальное лечение с учетом результатов бактериологического исследования, чувствительности выявленного возбудителя к антибиотикам; обязательный прием нистатина или леворина в среднетерапевтических дозах; проведение медикаментозной детоксикации; инфузионную и десенсибилизирующую терапию; применение спазмолитиков, ненаркотических анальгетиков и ингибиторов простагландинов; витаминотерапию [2].

На 2-м этапе лечения (курс реабилитационной терапии), который проводился спустя 4–8 недель после первого, в стадии клинической ремиссии, больные были разделены на две клинические группы. Сравниваемые группы больных были сопоставимы по возрасту и клиническим проявлениям заболевания.

Первая группа (36 больных) получала традиционное лечение: ненаркотические анальгетики; седативные препараты; витамины; адаптогены растительного происхождения в сочетании с витамином С (стабилизатор мембран лизосом фагоцитов); иммунотерапию (гипериммунная стафилококковая плазма, стафилококковый гамма-глобулин, аутовакцина, нуклеинат натрия), физиотерапевтические процедуры. В комплексную терапию этой группы больных был включен белковый препарат полибиолин, изготавливаемый из сыворотки донорской и ретроплацентарной крови человека, относящийся к группе биостимулирующих препаратов преимущественно с противовоспалительным действием. Разовую дозу (0,5 г сухого вещества) полибиолина растворяли в 5 мл 0,5%-го раствора новокаина и вводили внутримышечно ежедневно в течение 10 дней [6, 9].

Вторую клиническую группу составили 38 больных хроническими неспецифическими сальпингоофоритами, которые на втором этапе лечения получали криоконсервированную сыворотку кордовой крови. Перед применением ее отогревали на водяной бане при температуре 36 °С и вводили по 1 мл с 2 мл 2%-го раствора новокаина внутримышечно через день (на курс лечения – 5 инъекций) [2].

Оценка ближайших результатов комплексного лечения, включающего полибиолин, показала, что хронический болевой тазовый синдром сохранялся у 14 (38,9%) женщин, у 3-х (8,3%) в течение 1,5–2 мес температура тела повышалась до 37,1–37,2 °С. При бимануальном исследовании установлено, что анатомические изменения в придатках матки сохранились у 19 (52,8%) больных. Лишь у 3-х (8,3%) из 20 (55,6%) была восстановлена подвижность матки.

Все больные 2-й группы отмечали исчезновение болей внизу живота и гипертермии, улучшение общего самочувствия, сна, аппетита, повышение общей работоспособности. Анатомические изменения в придатках матки сохранились лишь у 2-х (5,3%) больных, у 20 (52,6%) из 22-х (57,9%) была восстановлена подвижность матки.

Среднестатистические показатели иммунограммы больных до и после 2-го этапа лечения представлены в таблице.

Как видно из приведенных данных, у больных хроническими неспецифическими сальпингоофо-

vity of a revealed pathogene to antibiotics; an obligatory taking of nystatin or levorin in average therapeutic doses; performance of medicamental detoxication; infusional and desensitizing therapy; the application of spasmolytic means, non-narcotic analgetic means and prostaglandin inhibitors; vitamin therapy [2].

At the 2nd stage of treatment (rehabilitative therapy course), which was performed 4–8 weeks later after the first one, at the stage of clinical remission, the patients were divided in two clinical groups. The groups of patients were compared according to age and disease clinical manifestations.

The first group (36 patients) received a traditional treatment such as non-narcotic analgetic means; sedative preparations; vitamins; adaptogenes of plant origin, combined with vitamin C (stabilizer of membranes of phagocyte lysosomes); immune therapy (hyperimmune staphylococcic plasm, staphylococcic gamma-globulin, autovaccine, sodium nucleinate); physiotherapeutic procedures. We included in a combined therapy of this group of patients a protein preparation polybiolin, produced from serum of donor and retroplacental human blood, and relating to the group of biostimulating preparations, namely with an antiinflammatory action. A single dose (0.5 g of dry substance) of polybiolin was dissolved in 5 ml of a 0.5% novocaine solution and daily introduced intramuscularly within 10 days [6, 9].

The second clinical group comprised 38 patients with chronic non-specific salpingo-oophoritis, who received a cryopreserved serum of cord blood at the second stage of treatment. Before application it was thawed on water bath at the temperature of 36 °C and introduced intramuscularly by 1 ml with 2 ml of a 1% novocaine solution in a day (per 5 injections for the treatment course) [2].

The estimation of recent results of a combined treatment, including polybiolin, demonstrated that a chronic painful pelvic syndrome remained in 14 (38.9%) women, in 3 ones (8.3%) within 1.5–2 months there was an increase in body temperature up to 37.1–37.2 °C. At bimanual examination it as established, that anatomic changes in uterine appendages were kept in 19 (52.8%) patients. Only in 3 (8.3%) women from 20 (55.6%) the uterus mobility was recovered.

All patients of the second group noted the disappearance of pains in abdomen lower part and hyperthermia, they felt better, there was the improvement in sleep, appetite, an increase in common working capacity. Anatomic changes in uterine appendages remained only in 2 (5.3%) patients, in 20 (52.6%) women from 22 ones (57.9%) the uterus mobility was recovered.

An average statistical indices of patients' immunograms before and after the second treatment stage are presented in the Table.

As it is seen from the data presented, in the patients with chronic non-specific salpingo-oophoritis at the sage of clinical remission a considerable decrease

Матеріал, захищений авторським правом

Показатели иммунограммы больных хроническими неспецифическими сальпингоофоритами в стадии клинической ремиссии до и после 2-го этапа лечения

Indices of patients' immunograms with chronic non-specific salpingo-oophoritis at the stage of clinical remission before and after the 2nd stage of treatment

Исследуемые показатели Studied indices	Здоровые женщины Healthy women ($n = 30$)	До лечения Before treatment ($n = 74$)	После лечения / After treatment	
			Группа 1 / Group 1 ($n = 36$)	Группа 2 / Group 2 ($n = 38$)
Общие Т-лимфоциты (Е-РОК), % Total T-lymphocytes (E-RFC), %	64,4 ± 2,2	52,3 ± 1,2*	54,6 ± 1,7*	62,3 ± 2,1**
"Активные" Т-лимфоциты (Еа-РОК), % "Active" T-lymphocytes (Ea-RFC), %	34,3 ± 1,8	26,8 ± 1,6*	29,5 ± 1,8	34,0 ± 2,2
Т-хелперы (ТфР-Е-РОК) T-helpers (TR-E-RFC)	43,9 ± 1,0	28,1 ± 1,2*	31,4 ± 1,3*	42,7 ± 1,5**
Т-супрессоры (ТфЧ-Е-РОК), % T-suppressors (TS-E-RFC), %	20,4 ± 2,0	24,2 ± 1,5*	22,3 ± 1,7	19,6 ± 1,7
Индивидуальные соотношения Тх/Тс Individual ratios of Th/Ts	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*	2,2 ± 0,2**
В-лимфоциты (ЕАС-РОК), % B-lymphocytes (EAC-RFC), %	17,7 ± 0,9	27,1 ± 1,1*	24,8 ± 1,2*	18,1 ± 1,3**,***
Ig A, г/л IgA, g/l	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2*	2,4 ± 0,2*	1,4 ± 0,3***
Ig M, г/л IgM, g/l	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1*	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1***
Ig G, г/л IgG, g/l	12,5 ± 0,6	20,5 ± 2,4*	17,6 ± 1,5*	12,9 ± 1,9***
НСТ-тест спонтанный, % HCT-spontaneous test, %	16,9 ± 0,9	9,6 ± 0,9*	10,9 ± 1,5*	16,7 ± 1,6**
НСТ-тест индуцированный, % HCT-induced test, %	21,8 ± 1,0	15,3 ± 1,4*	16,8 ± 1,6*	20,9 ± 1,9**
Фагоцитарное число, % Phagocytic number, %	72,5 ± 2,3	51,9 ± 2,4*	54,4 ± 2,4*	69,9 ± 4,3**
Фагоцитарный индекс Phagocytic index	9,1 ± 0,3	4,9 ± 0,2*	5,3 ± 1,4*	9,3 ± 0,3
Показатель завершенности фагоцитоза, % Index of phagocytosis completion, %	66,2 ± 2,4	58,2 ± 2,3*	60,4 ± 2,2	65,9 ± 2,2**

Примечания. * — достоверность различий по отношению к норме $p < 0,05$; ** — достоверность различий между 1-й и 2-й группой после лечения $p < 0,05$; *** — результаты исследований спустя 3 мес после лечения.

Notes. * — a statistically significance of differences in respect to the norm $p < 0.05$; ** — a statistically significance of differences between the first and second groups after treatment $p < 0.05$; *** — the investigation results after 3 months of treatment.

ритами в стадии клинической ремиссии отмечается (по сравнению с контрольной группой) значительное уменьшение количества общих и "активных" Т-лимфоцитов, что указывает на снижение не только их количества, но и функциональной активности. Снижение содержания общих Т-лимфоцитов сопровождалось угнетением их хелперной активности и повышением активности Т-супрессоров, что привело к стойкому достоверному снижению соотношения хелперов и супрессоров. Уменьшение количества Т-лимфоцитов при снижении их функциональной активности и хелперно-супрессорного соотношения является признаком угнетения клеточного звена иммунитета у этих больных.

Наблюдаемое нами некоторое увеличение содержания иммуноглобулинов А и М, а также выраженное повышение концентрации иммуноглобулина G, наряду с повышенным количеством В-клеток, свидетельствовало о дисфункции гуморального звена иммунной системы. По-видимому, снижение контролирующего влияния Т-системы иммунитета приводит к гиперфункции В-клеток.

Об угнетении функциональной активности клеточных факторов неспецифической защиты организма у женщин с хроническими рецидивирующими воспалительными заболеваниями придатков

in a number of total and "active" T-lymphocytes is observed, that points to the reduction not only of their number, but functional activity. A decrease in the content of total T-lymphocytes was accompanied by the suppression of their helper activity and an increase in T-suppressor activity, that resulted in a stable statistically significant reduction of the helper and suppressor ratio. A decrease in T-lymphocyte number during the reduction of their functional activity and a helper-suppressor ratio is the sign of the immunity cellular link suppression in these patients.

A certain increase we observed in the content of immunoglobulins A and M, as well as a manifested increase in the immunoglobulin G concentration, along with an augmented B-cell number, testified to the immune system humoral link dysfunction. Apparently the reduction of a controlling effect of the immunity T-system results in B-cell hyperfunction.

Statistically significant ($p < 0.05$) decrease in all indices of blood neutrophil phagocytic activity testifies to the suppression of a functional activity of cellular factors of an oganism's non-specific protection in women with chronic relapsing inflammatory diseases of uterine appendages.

Матеріал, захищений авторським правом

матки свидетельствует достоверное ($p < 0,05$) снижение всех показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови.

Таким образом, у больных хроническими неспецифическими сальпингоофоритами в стадии клинической ремиссии наблюдается иммунодефицитное дисфункциональное состояние иммунной системы.

При проведении иммунологического исследования сразу после окончания курса лечения (в течение 10 дней) выявлено, как видно из таблицы, что у больных 2-й группы увеличилось количество общих и "активных" Т-лимфоцитов; повышение уровня Т-хелперов, наряду со снижением уровня Т-супрессоров, привело к достоверной нормализации соотношения Тх/Тс и показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Содержание В-лимфоцитов, иммуноглобулинов А, М и G оставалось несколько повышенным и снизилось до нормальных значений спустя 3 мес после лечения. К. А. Лебедев, И. Д. Понякина считают, что нормализация относительного количества В-клеток указывает на полное окончание воспалительного процесса, в то время как повышение числа В-лимфоцитов при снижении уровня Т-клеток свидетельствует о его наличии [8].

При исследовании иммунного статуса у больных 1-й группы сразу после окончания курса лечения (в течение 10 дней) выявлено, что у всех женщин несколько повысилось количество общих (до нижней границы нормы) и "активных" Т-лимфоцитов. Повышение уровня Т-хелперов до нормы привело к незначительному увеличению соотношения Тх/Тс. Уровень Т-супрессоров снизился незначительно. Отмечалось и некоторое улучшение показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови.

На основании данных ультразвукового исследования и измерения базальной температуры тела на протяжении 3–6 мес мы сделали вывод о восстановлении овуляции у 16 (42,1%) из 18 (47,4%) больных 2-й группы и у 4-х (11,1%) из 16 (44,4%) больных 1-й группы, у которых ранее наблюдалась стойкая ановуляция.

Катамнестическое наблюдение за больными 2-й клинической группы в течение 1–1,5 лет после проведенного курса лечения с использованием криоконсервированной сыворотки кордовой крови выявило, что ни у одной из них не наблюдалось повторных обострений основного заболевания, у 28 (73,7%) из 35 (92,1%) женщин с гипо- или гипер-менструальным синдромом нормализовались продолжительность менструаций и количество крови, теряемой во время месячных. У 23 (60,5%) из 26 (68,4%) женщин с наблюдавшейся ранее альгодисменореей исчезли боли во время менструаций.

Изучение катамнеза у больных 1-й клинической группы в течение данного промежутка времени показало, что случаи однократного обострения воспалительного процесса были у 8 (22,2%) больных, двухкратного – у 4-х (11,1%); под влиянием проведенного лечения ни у одной больной не возникло нарушений менструальной функции, у 11 (30,6%) из 22 (61,1%) женщин с альгодисменореей уменьшился болевой синдром.

Беременность наступила у 7 (18,4%) из 19 (50,0%) женщин 2-й группы с первичным и у 9 (23,7%) из 16 (45,0%) со вторичным бесплодием. У

Thus, in patients with chronic non-specific salpingo-oophoritis at the stage of a clinical remission an immune deficient dysfunctional state of the immune system is observed.

When carrying-out an immunological investigation just after the treatment course completion (within 10 days) it was revealed, as it is seen in the Table, that in the second group patients there was an increase in total and "active" T-lymphocytes; an augmentation of T-helper level, along with a decrease in T-suppressor level resulted in a statistically significant normalization of Th/Ts ratio and the indices of blood neutrophil phagocytic activity. The content of B-lymphocytes, immunoglobulins A, M and G remained slightly increased and reduced to normal values 3 months later after the treatment. K. A. Lebedev, I. D. Ponyakina believe, that the normalization of a relative number of B-cells points to a complete termination of an inflammatory process, meanwhile the augmentation of B-lymphocyte number during the reduction of T-cell level testifies to its presence [8].

When investigating an immune status in the patients of the first group just after the treatment course completion (within 10 days) it was revealed, that in all women there was a slight increase in a number of total (up to a lower limit of the norm) and "active" T-lymphocytes. An increase in T-helper level up to the norm resulted in a slight augmentation of the Th/Ts ratio. The level of T-suppressors slightly reduced. A certain improvement of phagocytic activity indices of blood neutrophils was noted.

Basing on the data of an ultrasound examination and a body basal temperature measurement during 3–6 months we concluded on the ovulation recovery in 16 (42.1%) from 18 (47.4%) patients of the second group and in 4 (11.1%) of 16 (44.4%) patients of the first one, in which a stable anovulation was observed earlier.

A catamnestic observation of patients of the second clinical group during 1–1.5 years after performing the treatment course, using cord blood cryopreserved serum revealed, that no repeated aggravations of the main disease were revealed in these women, in 28 (73.7%) of 35 (92.1%) women with hypo- or hypermenstrual syndrome there was the normalization of menstruation duration and blood amount, lost during the menstruations. In 23 (60.5%) of 26 (68.4%) women with observed earlier algodismenorrhea, there were no pains during menstruations.

The study of catamnesis in patients of the first clinical group during this time period demonstrated, that the cases of a single aggravation of an inflammatory process were observed in 8 (22.2%) patients, a repeated one – in 4 (11.1%) patients; there were no menstrual function disorders in all women under the effect of the performed treatment; in 11 (30.6%) of 22 (61.1%) women with algodismenorrhea an decrease in a painful syndrome was observed.

Матеріал, захищений авторським правом

8 из них беременность закончилась нормальными родами, одной женщине в сроке родов было произведено кесарево сечение в связи со смешанным ягодичным предлежанием плода, у 7 беременность прогрессирует. В 1-й группе беременность наступила у 1-й (2,8%) из 10 (27,8%) женщин с первичным и у 2-х (5,6%) из 20 (55,6%) со вторичным бесплодием; 2 женщины родили в срок здоровых детей, у одной беременность прогрессирует.

Таким образом, у большинства больных 1-й клинической группы после 2-го этапа комплексной терапии, включающей прием полибиолина, сохранялись признаки вялотекущего воспалительного и спаечного процессов в малом тазу, хронический болевой тазовый синдром, нарушения функции яичников, сниженная иммунологическая реактивность организма.

При использовании на 2-м этапе лечения нового биостимулятора (криоконсервированной сыворотки кордовой крови) наблюдаются стойкий анальгезирующий и противовоспалительный эффекты, а также, что особенно важно, нормализация нарушенных функций иммунной системы больных, восстановление овуляции. Следовательно, криоконсервированная сыворотка кордовой крови сохраняет эссенциальные вещества, содержащиеся в плацентарной крови, в активном состоянии и физиологических соотношениях, в результате чего данный биопрепарат оказывает иммуностимулирующее действие, обладает выраженной клинической эффективностью.

The pregnancy occurred in 7 (18.4%) of 19 (50.0%) women of the second group with a primary sterility and in 9 (23.7%) of 16 (45.0%) women with a secondary one. In 8 of them the pregnancy resulted in normal labor, a cesarean section was done to 1 woman due to a combined breech presentation, in 7 women the pregnancy is in progress. In the first group the pregnancy occurred in 1 (2.8%) of 10 (27.8%) women with a primary sterility, and in 2 (5.6%) of 20 (55.6%) with the secondary one; 2 women gave birth to healthy children in term, the pregnancy is in progress in one woman.

Thus, in he majority of patients of the first clinical group after the second stage of a combined therapy, including the polybiolin taking, the signs of a flacid inflammatory and adhesive processes in small pelvic, a chronic painful pelvic syndrome, disorders of an ovarian function, a decreased immunological reactivity of an organism, were kept.

When using a new biostimulator (cord blood cryopreserved serum) at the second stage of treatment we observed a stable analgetic and anti-inflammatory effects, as well as, that is particularly important, the normalization of impaired functions of the patients' immune system, the ovulation recovery. Consequently, a cryopreserved serum of cord blood preserves the essential substances, containing in placental blood in active state and physiological ratios, as the result this biopreparation causes an immune stimulating effect, possesses a manifested clinical efficiency.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андрєєв О. С.* Деякі сучасні аспекти епідеміології, клініки та лікування ускладнень гнійного сальпінгоофориту // Педіатрія, акушерство та гінекологія.– 1999.– № 2.– С. 116–119.
2. *Грищенко В. І., Прокопюк О. С., Ліпіна О. В., Савченко Ю. О.* Заготівля, кріоконсервування сироватки і плазми кордової крові та їх клінічне застосування: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 11 с.
3. *Грищенко В. И., Сандомирский Б. П.* Концепция клеточной терапии // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 3–6.
4. *Грищенко В. И., Юрченко Т. Н., Прокопюк О. С. и др.* Низкотемпературное хранение эмбриональных и фетоплацентарных тканей в Украинском банке биологических объектов // Международ. мед. журн.– 1999.– 5, № 2.– С. 113–114.
5. *Дубоссарская З. М., Миляновский А. И., Коляденко В. Г.* Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов.– Киев: Здоров'я, 1991.– С. 115–118.
6. *Жукова О. С., Гайструк В. В., Кіналь Н. М.* Застосування полібіоліну в комплексній терапії хронічних запальних захворювань внутрішніх статевих органів жінок // Педіатрія, акушерство та гінекологія.– 1983.– № 3.– С. 55–58.
7. *Лебедев К. А., Понякина И. Д.* Иммунограмма в клинической практике.– М.: Наука, 1990.– 223 с.
8. *Лабораторные* методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 368 с.
9. *Миндюк М. В., Логинский В. Е., Криворучко Р. А. и др.* Полибиолин и показания к его клиническому применению: Метод. рекомендации.– Львов, 1988.– 15 с.
10. *Оценка* иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-Морского Флота: Метод. пособие / Под ред. Г. В. Гембицкого.– М.: Мин. обороны СССР, 1987.– 51 с.
11. *Expert* Committee on Pelvic Inflammatory Disease. Research directions for the 1990s // Sex. Transs. Dis.– 1991.– 18.– P. 46–64.

Поступила 12.12.2000

REFERENCES

1. *Andreyev O. S.* Some actual aspects of epidemiology, clinical picture and treatment of purulent salpingo-oophoritis complications // Pediatriya, akusherstvo i ginekologiya.– 1999.– № 2.– P. 116–119.
2. *Grischenko V. I., Prokopyuk O. S., Lipina O. V., Savchenko Yu. O.* Procurement, cryopreservation of cord blood serum and plasm and their clinical application: Methodical recommendations.– Kharkiv, 2000.– 11 p.
3. *Grischenko V. I., Sandomirsky B. P.* Conception of cellular therapy // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 1.– P. 3–6.
4. *Grischenko V. I., Yurchenko T. N., Prokopyuk O. S. et al.* Low temperature storage of embryonic and fetoplacental tissues in the Ukrainian Bank of Biological Objects // Mezhdunarodny meditsinsky zhurnal.– 1999.– 5, № 2.– P. 113–114.
5. *Dubossarskaya Z. M., Milyanovsky A. I., Kolyadenko V. G.* Chronic inflammatory processes of internal female genital organs.– Kiev: Zdorov'ya, 1991.– P. 115–118.
6. *Zhukova O. S., Gajstruk V. V., Kinal' N. M.* Polybiolin application in a combined therapy of chronic inflammatory diseases of internal female genital organs // Pediatriya, akusherstvo i ginekologiya.– 1983.– № 3.– P. 55–58.
7. *Laboratory* methods of study in clinic / Ed. by V. V. Men'shikov.– M.: Meditsina, 1987.– 368 p.
8. *Lebedev K. A., Ponyakina I. D.* Immunogram in a clinical practice.– M.: Nauka, 1990.– 223 p.
9. *Mindyuk M. V., Loginsky V. E., Krivoruchko R. A. et al.* Polybiolin and indications to its clinical application: Methodical recommendations.– Lvov, 1988.– 15 p.
10. *Estimation* of an organism's immune status in medical establishments of Soviet Army and Navy; Methodical manual / Ed. by G. V. Gembitsky.– M.: Ministry of Defense of the USSR.– 1987.– 51 p.
11. *Expert* Committee on Pelvic Inflammatory Disease. Research directions for the 1990s // Sex. Transs. Dis.– 1991.– 18.– P. 46–64.

Accepted in 12.12.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 618.12-002: 616-089.843

UDC 57.043: 618.12-002: 616-089.843

Динамика биохимических показателей в плазме крови женщин с подострым сальпингоофоритом при трансплантации криоконсервированной хориальной ткани

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

Dynamics of Biochemical Indices in Blood Plasm of Women with Subacute Salpingo-oophoritis during Transplantation of Cryopreserved Chorionic Tissue

V. A. PITKO

Kharkov State Medical University, Kharkov

Включение трансплантации криоконсервированной хориальной ткани (КХТ) в комплексное лечение женщин с подострыми сальпингоофоритами (ПСО) позволяет снизить уровень процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повысить активность антиоксидантной системы (АОС) организма, что положительно влияет на клиническое течение данного заболевания. Использование метода трансплантации КХТ в гинекологической практике позволяет значительно улучшить лечение воспалительных заболеваний внутренних половых органов.

Включення трансплантації кріоконсервованої хоріальної тканини (КХТ) до комплексного лікування жінок з підгострим сальпінгоофоритом (ПСО) дозволяє знизити рівень процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та збільшити активність антиоксидантної системи (АОС) організму, що позитивно впливає на клінічний перебіг даного захворювання. Використання методу трансплантації КХТ в гінекологічній практиці дозволяє значно поліпшити лікування запальних захворювань внутрішніх статевих органів.

Involvement of transplantation of cryopreserved chorionic tissue (CCT) into a complex treatment of women with subacute sulpingo-oophoritis (SSO) allows to reduce the level of processes of lipid peroxidation (LPO) and increase the activity of antioxidant system (AOS)of an organism, that positively affect clinical course of this disease. Application of the method of CCT transplantation in gynaecological practice permits to significantly improve the treatment of inflammatory diseases of inner genital organs.

Многочисленные исследования структуры и клинического течения воспалительных заболеваний внутренних половых органов у женщин свидетельствуют, что в большинстве случаев они протекают без ярко выраженной клинической картины, с преобладанием стертых, малосимптомных форм [11], которые затем принимают подострое или хроническое течение. Длительное течение, повторные обострения хронического воспаления, например придатков матки, могут вызвать нарушение функций самых разных органов и систем [3].

Многие авторы считают, что в патогенезе воспалительных заболеваний существенная роль принадлежит нарушениям, возникающим на клеточном и субклеточном уровнях, связанных с дестабилизацией биомембран, вследствие активации процессов ПОЛ и истощением АОС защиты организма [10]. В связи с этим актуальным является поиск препаратов, способных активировать антиокислительные процессы в клетках и ингибировать развитие процессов ПОЛ.

Наиболее перспективны с этой точки зрения препараты, полученные из фетальных тканей разного гистогенеза. Исследования действия этих пре-

Multiple investigations of structure and clinical course of inflammatory diseases of inner genital organs in women testify that in the majority of cases they proceed without vividly manifested clinical picture with the predominance of obliterated slightly symptomatic forms [11], which then gain subacute or chronic course. Long-term proceeding, repeated aggravation of chronic inflammation, e.g. uterus appendages, can result in the disorder of functions of very different organs and systems [3].

Many authors consider that in pathogenesis of inflammatory diseases the considerable role is related to the disorders appearing at cellular and subcellular levels, connected to destabilization of biomembranes as a result of the activation, of LPO processes and exhaustion of AOS of an organism protection. In this connection the search for preparations, capable to activate antioxidative processes in cells and inhibit the development of LPO processes is actual.

From this point of view the preparations derived from fetal tissues of different histogenesis are the most perspective. Investigations of these preparations action under various pathological processes have shown that they possess biostimulating, antiinflammatory,

Матеріал, захищений авторським правом

паратов при различных патологических процессах показали, что они обладают биостимулирующим, противовоспалительным, антиоксидантным и иммунокорригирующим действиями [2, 5, 8]. При этом биологический уровень трансплантированных или имплантированных препаратов (ткань, клетки экстракты, различные фракции) имеет существенное значение [7].

Цель исследования — изучение влияния гетеротопической трансплантации КХТ на биохимические показатели плазмы крови женщин с ПСО.

Проведено клинико-лабораторное обследование 30 здоровых (контрольная группа) и 51 больной женщины до и после лечения с длительностью заболевания ПСО от 4-х месяцев до 4-х лет.

Контрольную группу составили соматически здоровые женщины в возрасте 25,2 ± 0,9 лет, в анамнезе которых отсутствовали гинекологические заболевания.

Женщин с ПСО разделили на 2 группы (основные), сопоставимые по возрасту (средний возраст больных 25,9 ± 0,7 лет), клиническим проявлениям и длительности заболевания. С учетом клинического течения заболевания всем больным проводилась традиционная комплексная противовоспалительная терапия. Первую группу составили пациенты (31 женщина), получавшие этиотропную антибактериальную и детоксикационную терапию. Больным проводилась также витаминотерапия (витамины B_1, C), вводились биостимуляторы — ФиБС, плазмол, стекловидное тело, седативные и антигистаминные средства. После купирования воспалительного процесса назначалось физиотерапевтическое лечение.

Больным 2-й группы (20 женщин) в комплексе с традиционной терапией произведена трансплантация КХТ в виде фрагментов (1×1 см) хориона (10 недель гестации плода). Фрагменты КХТ были получены из ИПКиК НАН Украины.

Контейнеры с биопрепаратами отогревали на водяной бане при температуре 37 °С и в условиях операционной производили однократную трансплантацию КХТ в верхний наружный квадрант ягодицы.

Комплексное лечение больных включало общеклиническое и гинекологическое обследование, определение уровня процессов ПОЛ и состояния АОС. О состоянии процессов ПОЛ в организме судили по содержанию ТБК продуктов в плазме крови: диеновых конъюгат (ДК) [1] и малонового диальдегида (МДА) [9]. Состояние антиоксидантной защиты, которая отображает компенсаторные возможности организма, оценивали по накоплению α-токоферола [4]. Определяли содержание свободных сульфгидрильных групп (SH-групп) [6].

После комплексного лечения больных, получавших общепринятое лечение, клиническое выздоровление отмечено у 16 женщин (51,62%), значительное улучшение состояния — у 11 (35,41%),

antioxidant and immune correcting effects [2, 5, 8]. In this case biological level of transplanted or implanted preparations (tissue, cells, extracts, different fractions) is of significant value [7].

The goal of this study is to investigate the effect of heterotopic transplantation of CCT on biochemical indices of blood plasm of the women with SSO.

Clinical and laboratory investigation of 30 healthy (the control group) and 51 ill women before and after treatment with SSO disease term within the range from 4 months to 4 years was performed.

The control group was represented by somatically healthy women within the age range of 25.2 ± 0.9 years, in whose anamnesis there were no gynaecological diseases.

Women with SSO were divided in 2 groups (main), comparable by age (an average patients' age made 25.9 ± 0.7 years), with clinical manifestations and disease duration. Taking into account clinical course of disease all patients were treated by traditional complex antiinflamatory therapy.

The first group comprised the patients (31 women) received etiotropic antibacterial and detoxicative therapy. Patients in addition were treated with vitamin therapy (vitamins B_1, C), biostimulators – FIBS, plasmol, vitreous body, sedative and antihistamine means were introduced. After cupping inflammatory process, physiotherapeutic treatment was prescribed.

The patients of the 2nd group (20 women) in the complex with traditional therapy were treated by CCT transplantation as the fragments (1×1 cm) of chorion (10 weeks of fetus gestation). CCH fragments were obtained from the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

Containers with biopreparations were thawed on water bath at the temperature of 37 °C and under conditions of operating room a single transplantation of CCH was done into upper outer quadrant of the buttock.

Complex treatment of patients comprised general clinical and gynaecological observation, determination of the level of LPO processes and the state of AOS. About the state of LPO processes in an organism was judged by the content of TBC-products in blood plasm: dyene conjugates (DC) and malonic aldehyde (MDA) [9]. The state of protection, which reflects the compensatory capabilities of an organism was estimated on the accumulation of α-tocopherol [4] as well as on the content of free sulfhydrylic groups (SH-groups) [6].

After complex treatment of patients, traditionally treated, clinical recovery was found in 16 women (51.62%), significant improvement of the state in 11 (35.41%), an improvement in 1 (3.1%). In 3 patients (9.67%) conducted treatment gave no positive result.

During the complex treatment with CCH usage the clinical recovery was noted in 15 patients (75%), significant improvement of the state in 4 (20%), an

Матеріал, захищений авторським правом

улучшение – у 1 (3,1%). У 3-х пациенток (9,67 %) проведенное лечение положительного результата не дало.

При комплексном лечении с использованием КХТ клиническое выздоровление наступило у 15 пациенток (75%), значительное улучшение состояния достигнуто у 4-х (20%), улучшение – у 1-й (5%). В процессе лечения больных 1- и 2-й групп побочных реакций не наблюдалось.

Как следует из таблицы, о нарушении процессов ПОЛ у больных ПСО свидетельствуют показатели накопления в плазме крови промежуточных и конечных ТБК-активных продуктов. Уровень ДК в плазме крови до лечения в 1-й группе больных был увеличен в среднем в 1,91 раза, а МДА – в среднем в 2,68 раза.

Интенсификация процессов ПОЛ до лечения у больных 1- и 2-й групп сопровождалась существенным снижением уровня α-токоферола (в среднем в 1,77 раз) и SH-групп (в среднем в 2,35 раза). После проведенного комплексного лечения отмечена тенденция к нормализации изучаемых биохимических показателей, более значительная – при трансплантации КХТ.

Включение КХТ в комплексное лечение больных с ПСО способствовало существенному снижению содержания МДА и ДК. Во 2-й группе пациентов содержание МДА составляло 52,97% от величин, полученных до лечения, а уровень ДК был на 41,92% ниже. В группе с общепринятым лечением количество промежуточных и конечных метаболитов в плазме крови больных было меньше, чем при трансплантации КХТ.

У всех обследованных больных 1- и 2-й групп отмечается тенденция к восстановлению показателей АОС, о чем свидетельствовало повышение в плазме крови содержания α-токоферола и SH-групп. При этом в группе больных с общепринятым improvement in 1 (5%). During treatment process of patients of the 1st and 2nd groups no side effects were observed.

As proceeds from the Table the indices of accumulation in blood plasm of intermediary (DC) and final (MDA) metabolites testify to the disorder of LPO processes in patients with SSO. DC level in blood plasm before treatment in the 1st group of patients was in average increases in 1,91 times and final metabolite, MDA, in average in 2,68 times.

LPO processes intensification before treatment in patients of the 1st and 2nd groups accompanied by a considerable decrease of the level of α-tocopherol (in average in 1.77 times) and SH-groups (in average in 1.35 times). After conducted complex treatment the tendency to the normalization of studied biochemical indices, more significant during transplantation of CCT, was noted.

Involvement of CCT into a complex treatment of patients with SSO contributed to a significant reduction of MDA and DC content. In the 2nd group of patients the MDA content made 52.97% of the values, obtained before treatment, and DC level was by 41.92% lower. In the group with routine treatment the number of intermediary and final metabolites in blood plasm of patients were less than during CCT transplantation.

In all examined patients of the 1st and 2nd group there was the tendency to the recovery of AOS indices, that was confirmed by an increase of α-tocopherol and SH-groups content in blood plasm. In this case in the group of patients with traditional treatment an increase of the content of α-tocopherol level was less significant than when treating with CCT transplantation. The indices of the number of SH-groups after conducting the treatment in patients of the 1st and 2nd groups practically did not differ.

Динамика биохимических показателей в плазме крови больных с ПСО

Dynamics of biochemical indices in blood plasm of patients with SSO

Исследованные показатели Indices under study	Здоровые женщины Healthy women	1-я группа (ТТ) The 1st group, traditional therapy ($n = 31$)		2-я группа (КХТ) The 2nd group, CCT ($n = 20$)	
		До лечения Before treatment	После лечения After treatment	До лечения Before treatment	После лечения After treatment
МДА, мкмоль/л MDA, μM/l	10,25 ± 1,01	27,60 ± 2,75*	17,21 ± 1,05*•	28,05 ± 0,51*	14,86 ± 0,43*•♦
ДК, мкмоль/л DC, μM/l	58,33 ± 1,52	110,58 ± 8,18*	71,60 ± 1,82*•	111,88 ± 7,19*	64,94 ± 2,22*•♦
SH-группы, ммоль/л SH-groups, μM/l	1,27 ± 0,11	0,54 ± 0,05*	0,75 ± 0,08*•	0,56 ± 0,06*	0,76 ± 0,04*•
α-токоферола ацетат, мкмоль/л α-tocopherol acetate, μM/l	21,12 ± 0,25	11,80 ± 0,95*	16,01 ± 0,86*•	11,78 ± 0,77*	18,86 ± 0,91*•♦

Примечания. * — достоверность различий по отношению к норме ($P < 0,05$); • — достоверность различий по отношению к показателям в группах до лечения ($P < 0,05$); ♦ — достоверность различий между традиционной терапией и лечением с использованием КХТ ($P < 0,05$).

Notes. * — statistical significance in respect of the norm ($P < 0.05$); • — statistical significance in respect of the indices in the groups before treatment ($P < 0.05$); ♦ — statistical significance in respect of the differences between theapy and treatment using CCT ($P < 0.05$).

Матеріал, захищений авторським правом

тым лечением повышение содержания уровня α-токоферола было менее значительным, чем при лечении с использованием трансплантации КХТ. Показатели количества SH-групп после проведения лечения у больных 1- и 2-й групп практически не отличались.

Таким образом, включение трансплантации КХТ в комплексное лечение женщин с ПСО позволяет снизить уровень процессов ПОЛ и повысить активность АОС организма, что обусловливает общее положительное влияние на клиническое течение данного заболевания и позволяет рекомендовать его для внедрения в повседневную работу гинекологических учреждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гаврилов Б. В., Мишкорудная М. И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело.– 1983.– № 3.– С. 33–36.
2. *Грищенко В. И., Суббота Н. П., Питько В. А.* Состояние иммунитета у больных с подострым сальпингоофоритом после трансплантации криоконсервированной хориальной ткани // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 102–106.
3. *Дубоссарская З. М., Миляновский А. И., Коляденко В. Г.* Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов.– Киев: Здоров'я, 1991.– С. 115–118.
4. *Кисилевич Р. Ш., Скварко С. И.* Определение токоферола ацетата // Лаб. дело.– 1972.– № 8.– С. 43–45.
5. *Клименко М. О., Субота Н. П., Пітько В. А., Татарко С. В.* Вплив кріоекстракту хоріона на клітинні реакції вогнища запалення // Фізіол. журн.– 1999.– 45, № 6.– С. 75–80.
6. *Количественное* определение сульфгидрильных групп в цельной крови спектрометрическим методом: Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой.– М.: Изд-во МГУ, 1989.– С. 160–161.
7. *Суббота Н. П.* Проблемы современной биологической медицины // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 4.– С. 3–14.
8. *Суббота Н. П., Пашинский П. П., Питько В. А.* Активность супероксиддисмутазы при воспалительном процессе и введении препаратов плаценты разных сроков развития // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 2.– С. 87–88.
9. *Федорова Т. И., Коршунова Т. С.* Определение МДА крови по реакции с тиобарбитуратовой кислотой // Лаб. дело.– 1983.– № 3.– С. 25–27.
10. *Франчук А. Е., Бойгун В. А., Кумпаненко К. Н. и др.* Активность фермента супероксиддисмутазы и метаболитов перекисного окисления липидов при остром воспалительном процессе // Врачебное дело.– 1991.– № 9.– С. 95–96.
11. *Хойме Ю. Б., Чайка В. К., Севостьянова Т. В., Иотенко Б. А.* Актуальные вопросы патогенеза, диагностики и терапии аднексита // Медико-социальные проблемы семьи.– 1997.– 2, № 2.– С. 113–120.

Поступила 14.11.2000

Thus, the involvement of CCT transplantation into a complex treatment of women with SSO allows to reduce the level of LPO processes and increase the ability of AOS of an organism, that stipulates general positive effect on clinical course of this diseases and permits to recommend it for the introduction into daily practice of gynaecological establishments.

REFERENCES

1. *Gavrilov B. V., Mishkorudnaya M. I.* Spectrophotometrical determination of the content of hydroperoxides of lipids in blood plasm // Lab. delo.– 1983.– № 3.– P. 33–36.
2. *Grischenko V. I., Subbota N. P., Pitko V. A.* State of immunity in patients with subacute salpingo-oophoritis following transplantation of cryopreserved chorionic tissue // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 2.– P. 102–106.
3. *Dubossarskaya Z. M., Milanovsky A. I., Kolyadenko V. G.* Chronic inflammatory processes of inner female genital organs.– Kiev: Zdorov'ya, 1991.– P. 115–118.
4. *Kisilevich R. Sh., Skvarko S. I.* Determination of tocopherol acetate // Lab. delo.– 1972.– № 8.– P. 43–45.
5. *Klimenko M. O., Subota N. P., Pitko V. A., Tatarko S. V.* Effect of cryoextract of chorion on cellular reactions of inflammation // Fisiolog. Zhurnal.– 1999.– 45, № 6.– P. 75–80.
6. *Quantitative* determination of sulfohydrylic groups in the whole blood by spectrometrical methods: Practical course on biochemistry / Ed. by S. E. Severin, G. A. Solovyeva.– M: Moscow State University Publ., 1989.– P. 160–161.
7. *Subbota N. P.* Problems of modern biological medicine // Problems of Cryobiology.– 1997.– № 4.– P. 3–14.
8. *Subbota N. P., Pashinsky P. P., Pitko V. A.* Superoxide dismutase activity during an inflammatory process and the introduction of the chorion cryoextraction and placenta exraction // Problems of Cryobiology.– 1999.– № 2.– P. 87–88.
9. *Fedorova T. I., Korschunova T. S.* Determination of blood MDA on the reaction with thiobarbituric acid // Lab. delo.– 1983.– № 3.– P. 25–27.
10. *Franchuk A. E., Boigun V. A., Kumpanenko K. N. et al.* Activity of superoxide dismutase enzyme and metabolites of lipid peroxidation under acute inflammatory process // Vrachebnoye delo.– 1991.– № 9.– P. 95–96.
11. *Khojme Yu. B., Chajka V. K., Sevostyanova T. V., Iotenko V. A.* Actual questions of pathogenesis diagnosis and therapy of adnexitis // Medical and social problems of family.– 1997.– 2, № 2.– P. 113–120.

Accepted in 14.11.2000.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 576.31 UDC 57.043: 576.31

Физико-математическая оценка времени замещения льда в замороженной ткани

Р. К. МИГУНОВА, А. Ф. ТОДРИН, А. С. КАПРЕЛЬЯНЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Physical and Mathematical Estimation of Time of Ice Substitution in a Frozen Tissue

R. K. MIGUNOVA, A. F. TODRIN, A. S. KAPRELYANTS

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

В различных областях морфологических исследований для изучения тонкой структуры, состава и функциональных характеристик различных клеток и тканей применяется метод замораживания-замещения [2–6, 8]. В основу метода положено явление растворения кристаллов льда в замороженной ткани средой замещения. При этом используется криофиксация объекта, которая способствует остановке всех метаболических процессов и стабилизации структурных элементов клетки в результате сверхбыстрого охлаждения. Затем замороженный объект помещается в охлажденную замещающую среду (этанол, ацетон и др.), которая в результате двухсторонней диффузии обеспечивает замещение клеточного льда на замещающую жидкость. Время полного извлечения льда из замороженной ткани зависит от свойств растворителя и его температуры, а также от толщины замороженного материала. Для определения наиболее приемлемого режима процесса растворения льда в замороженной ткани необходимо провести оценку времени его полного замещения.

Процесс замещения льда в криобиологических исследованиях обычно осуществляется в устройствах с мешалкой, которые относятся к аппаратам периодического действия. В [1] описана математическая модель процесса извлечения твердого вещества из пористого тела с помощью растворителя, находящегося в аппарате периодического действия. Исходя из того, что объемная доля, занятая извлекаемым веществом, в начале процесса равна объемной доле пор, заполненных растворителем в конце замещения, полное время τ замещения льда в замороженной ткани, имеющей форму пластины толщиной $2R$, определяется из уравнения

$$\tau = \frac{R^2}{D}\frac{\rho_m}{C_к - C_н}\left\{\alpha[U(0) - U(\alpha)] + \left(\frac{1}{B_i} - 1\right)[v(0) - v(\alpha)]\right\},$$

где $\alpha = [(C_к - C_н)/(C_s - C_к)]^{1/3}$; $C_к$ — конечная концентрация растворенного вещества; $C_н$ — начальная концентрация растворящей жидкости; C_s — концентрация насыщения;

$$U(x) = \frac{1}{6}\ln\frac{1 - x + x^2}{(1 + x)^2} + \frac{1}{\sqrt{3}}\operatorname{arctg}\frac{2x - 1}{\sqrt{3}};$$

$$v(x) = \frac{1}{3}\ln(1 + x^3);$$

ρ_m — плотность твердого вещества; D — коэффициент диффузии; B_i — число Био, определяемое по формуле

$$B_i = \frac{kR}{D},$$

где коэффициент массоотдачи k определяется из уравнения диффузионного критерия Нуссельта $N_u = kl/D$.

Для перемешивающих аппаратов с пропеллерной мешалкой

$$N_u = 1{,}22\cdot10^{-3}\,\mathrm{Re}_u\,Pr^{0.5},$$

In various areas of morphological investigations for studying the thin structure, composition and functional characteristics of different cells and tissues the method of freeze - substitution is applied [2-6, 8]. The method is based on the phenomenon of frozen tissue ice crystals dissolving by substitution medium. The object cryofixation contributing to all metabolic processes ceasing and the stabilisation of cell structure elements resulted from the ultrarapid cooling is applied in this case. Then the frozen object is placed into the cooled substituting medium (ethanol, acetone et al.), providing owing to the bilateral diffusion the substitution of cellular ice to substituting liquid. Complete extraction of ice from a frozen tissue depends on the properties and temperature of dissolvent, as well as on frozen material thickness. To determine the most reasonable regimen of the ice dissolving process in a frozen tissue it is necessary to carry-out the evaluation of the time of complete substitution of ice.

Ice substitution process in cryobiological investigations is usually realised using the mixturing devices referred to periodic action apparatuses. The paper [1] describes the mathematical model of solid substance extraction from the porous body using the dissolvent being in the periodic action apparatus. Assuming that the volumetric portion occupied by the substance being extracted in the start of process is equal to the volumetric portion of pores filled by solvent at the end of substitution, the complete time τ of ice substitution in the frozen tissue of plate-like shape with $2R$ thickness is determined from the equation

$$\tau = \frac{R^2}{D}\frac{\rho_s}{C_f - C_i}\left\{\alpha[U(0) - U(\alpha)] + \left(\frac{1}{B_i} - 1\right)[v(0) - v(\alpha)]\right\},$$

where $\alpha = [(C_f - C_i)/(C_s - C_f)]^{1/3}$; C_f — final concentration of the dissolved substance; C_i — initial concentration of dissolving liquid; C_s — saturation concentration;

$$U(x) = \frac{1}{6}\ln\frac{1 - x + x^2}{(1 + x)^2} + \frac{1}{\sqrt{3}}\operatorname{arctg}\frac{2x - 1}{\sqrt{3}};$$

$$v(x) = \frac{1}{3}\ln(1 + x^3);$$

ρ_s — solid substance density; D — diffusion coefficient; B_i — the Bio number:

$$B_i = \frac{kR}{D},$$

mass yield coefficient k determined with the Nusselt's diffusion criterion equation $N_u = kl/D$.

For mixturing apparatuses with propeller mixer

$$N_u = 1{,}22\cdot10^{-3}\,\mathrm{Re}_c\,Pr^{0.5},$$

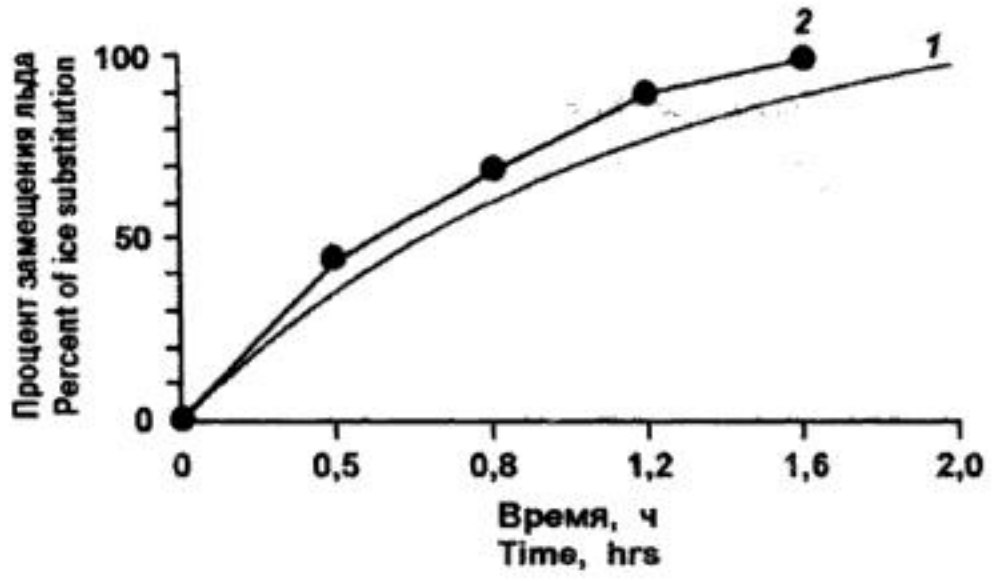
where $\mathrm{Re}_c = nd_m^2/\nu$ — the Reynolds' centrifugal criterion; n — mixer shaft rotational speed; d_m — the diameter of a circle described by mixing paddle; ν — kinematic liquid viscosity; $Pr = \nu/D$ — the Prandtle's diffusion criterion.

Матеріал, захищений авторським правом

где $Re_ц = nd_m^2/\nu$ — центробежный критерий Рейнольдса; n — частота вращения вала мешалки; d_m — диаметр окружности, описываемой лопастью мешалки; ν — кинематическая вязкость жидкости; $Pr = \nu/D$ — диффузионный критерий Прандтля.

На основании вышеприведенных зависимостей был проведен расчет времени полного замещения льда (рисунок). Как видно из рисунка, полученные нами расчетные данные согласуются с экспериментальными результатами, представленными в [7]. Расхождение между ними не превышает 10–15%, что может быть связано с невозможностью точного определения пористости биологического материала.

Таким образом, физико-математическое моделирование процесса замещения льда в замороженной ткани позволило уточнить зависимость времени замещения от физических параметров биологического объекта.



Результаты расчетов (*1*) и экспериментальные данные [7] (*2*) зависимости замещения льда в метаноле от времени.

Calculation results (*1* and experimental data [7] (*2*) of time dependence of ice substitution in methanol.

On the basis of the above-stated dependencies the calculation of the time of complete substitution of ice was carried-out (Figure). As the figure the calculated data obtained by us are in the accordance with experimental results presented in the paper [7]. The deviation does not exceed 10–15%, that can be related to impossibility of exact determination of the biological material porosity.

Thus, the physical and mathematical modelling of the ice substitution process in a frozen tissue allowed to improve the dependence of substitution time on physical properties of biological object.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аксельруд Г. А., Лысянский В. М.* Экстрагирование (система твердое тело–жидкость).– Л.: Химия, 1974.– 255 с.
2. *Капрельянц А. С.* Метод замораживания-замещения и его техническое обеспечение // Электронная микроскопия и современная технология: Тез. докл. IV Респ. конф.– Кишинев, 1990.– С. 61.
3. *Капрельянц А. С., Мигунова Р. К.* Устройство препарирования тканей для электронной микроскопии по методу замораживания-замещения // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 3.– С. 58–59.
4. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С., Панков Е. Я.* Ультраструктура клеток при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1978.– 140 с.
5. *Пушкарь Н. С., Капрельянц А. С.* Введение в электронно-микроскопическую технику для медико-биологических исследований.– Киев: Наук. думка, 1982.– 189 с.
6. *Bullivant S.* Freeze-substitution and supportive techniques // Lab. Invest.– 1965.– 14, № 5.– P. 1178–1195.
7. *Humbel B., Muller M.* Freeze Substitution and Low-Temperature Embedding.– EUREM, 1984.– P. 1789–1798.
8. *Thirise M., Moor H.* Improved structural preservation of cells and tissue by freeze-substitution electron microscopy // J. Cell. Biol.– 1980.– 22, № 1.– P. 611.

Поступило 13.07.2000

REFERENCES

1. *Akselrud G. A., Lysyanskiy V. M.* Extracting (solid–liquid system).– L.: Khimiya, 1974.– 255 p.
2. *Kaprelyants A. S.* The freeze-substitution method and its technical maintenance // Electron microscopy and modern technology: Proc. of the IV Republic Conference.– Kishinev, 1990.– P. 61.
3. *Kaprelyants A. S., Migunova R. K.* Tissue preparation device for electron microscopy according to freeze-substitution method // Problemy kriobiologii.– 1998.– № 3.– P. 58–59.
4. *Pushkar N. S., Kaprelyants A. S., Pankov E. Ya.* Cell ultrastructure under low temperature.– Kiev: Naukova Dumka, 1978.– 140 p.
5. *Pushkar N. S., Kaprelyants A. S.* Introduction to the electron microscopy techniques for biomedical investigations.– Kiev: Naukova Dumka, 1982.– 189 p.
6. *Bullivant S.* Freeze-substitution and supportive techniques // Lab. Invest.– 1965.– 14, № 5.– P. 1178–1195.
7. *Humbel B., Muller M.* Freeze Substitution and Low-Temperature Embedding.– EUREM, 1984.– P. 1789–1798.
8. *Thirise M., Moor H.* Improved structural preservation of cells and tissue by freeze-substitution electron microscopy // J. Cell. Biol.– 1980.– 22, № 1.– P. 611.

Accepted in 13.07.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 59.084: 591.481.1

UDC 57.043: 59.084: 591.481.1

Влияние предварительного общего умеренного охлаждения на динамику содержания биоэлементов в неокортексе и гиппокампе при обучении 3- и 6-месячных животных

И. Н. НИКИШКОВА

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Effect of Preliminary General Moderate Cooling on the Dynamics of Bioelements Content in Neocortex and Hyppocampus When Teaching 3- and 6-months' Animals

I. N. NIKISHKOVA

V. N. Karazin Kharkov National University

Изучение влияния функционального состояния ЦНС на уровень биоэлементов (БЭ) в головном мозге (ГМ) актуально, поскольку данные о динамике содержания БЭ, принимающих определенное участие в процессах, протекающих в ЦНС, могут способствовать выяснению биохимических основ этих процессов, а также служить критерием их оценки.

Ранее проведенные исследования по определению количественного содержания БЭ в различных по функции структурах ГМ [5] дали возможность отметить неравномерное их распределение по структурам. Подобные особенности в содержании и топографии БЭ в головном мозге, по-видимому, можно объяснить наличием морфологической и функциональной неоднородности различных отделов ГМ.

Исследования были выполнены на 3- и 6-месячных белых крысах-самцах линии Вистар. В каждом возрасте животные были разделены на 2 группы. У животных группы I проводилось формирование условного рефлекса активного избегания (УРАИ) по стандартной схеме [2] без предварительных воздействий. У животных группы II обучению предшествовало общее умеренное охлаждение при температуре 10 ± 1 °С в течение 3 дней по часу в день [3]. После окончания эксперимента животных забивали путем мгновенной декапитации, выделяли гиппокамп (ГППК) и неокортекс (НК) и определяли в них содержание калия и натрия методом пламенной фотометрии, кальция, магния, цинка и меди — методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии [1, 4].

Полученные данные свидетельствуют, что у 3-месячных животных группы I в НК содержание натрия, кальция, магния и цинка ниже, чем у животных группы II; по уровню содержания калия и меди достоверных отличий не выявлено (таблица). В ГППК же различия между группами I и II имели совершенно противоположный характер: количественное содержание всех исследуемых БЭ у животных группы I было достоверно более высоким, чем у животных группы II.

У 6-месячных животных различия в содержании БЭ между группами были не столь близки, как у 3-месячных. Так, у животных группы I НК характеризовался, с одной стороны, более низким уровнем кальция и магния, а с другой — уровень калия, натрия и меди был достоверно выше; по содержанию цинка животные групп I и II не отличались. В ГППК животных группы I, в отличие от животных группы II, уровень магния был ниже, а калия, цинка и меди — выше; по содержанию натрия и кальция достоверных отличий не отмечено.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у 3-месячных животных группы I ГППК отличается выраженным преобладанием содержания всех исследуемых БЭ по сравнению с НК. У животных группы II ГППК характеризуется более высоким содержанием только меди, а НК — незначительным увеличени-

Investigation of the effect of CNS functional state on the bioelements level (BE) in brain is an actual problem, because the data on the dynamics of BE content, possessing a certain role in the processes, occurring in CNS, may promote to the elucidation of biochemical grounds of these processes, as well as to be a criterion of their estimation.

The investigations conducted earlier on the revealing of quantitative BE content in various on their function brain structures, gave the possibility to note their uneven redistribution on structures. Such peculiarities in the BE content and topography in brain, can be, obviously, explained by the presence of morphological and functional heterogeneity of various brain compartments.

Investigations were carried-out in 3- and 6-months white Wistar male rats. Animals of both ages were divided in two groups. In animals of the 1st group the formation of a conditioned reflex of active avoiding (CRAA) was conducted by a standard scheme [2] without preliminary effects. In animals of the 2-nd group a general moderate cooling under the temperature of 10 ± 1 °C within 3 days during 1 hour per day preceded the studying [3]. After the experiment finishing animals were instantly decapitated, hyppocampus and neocortex were isolated and potassium and sodium content in them was determined by the method of flame photometry, the content of calcium, magnesium, zinc and copper was measured by the method of atom-adsorption spectrophotometry [1, 4].

The data obtained testify, that in 3-months' animals of the 1st group in neocortex the content of sodium, calcium, magnesium and zinc was lower than in the animals of the 2nd group; as for the level of potassium and copper content statistically no significant differences were revealed (Table). In hyppocampus the differences between the 1st and 2nd group have an contrary character: a quantitative content of all studied BE in animals of the 1st group was statistically higher, than in the animals of the 2nd group.

In the 6th-months' animals the differences of BE content between the groups were not so homogenous as in 3-months' ones. Thus, in the animals of the 1st group neocortex was characterized, from one side, by a lower calcium and magnesium level, and from another side — the level of potassium, sodium and copper was statistically higher, by zinc content the animals of the 1st and 2nd groups did not differ. In hyppocampus of the animals of the 1st group, in contrast to ones of the 2nd group, magnesium level was lower, and potassium, zinc and copper content was higher; on the content of sodium and calcium no statistical differences were noted.

The data obtained testify, that in 3-months' animals of the 1st group hyppocampus differed by a manifested prevailing of the content of all studied BE in comparison with neocortex. In animals of the 2nd group hyppocampus characterized by a higher content of copper, and neocortex differed by an insignificant increase of the level of calcium, potassium and magnesium; by a qualitative content

Матеріал, захищений авторським правом

Содержание БЭ в НК и ГППК при обучении 3- и 6-месячных крыс линии Вистар без предварительных воздействий (группа I) и после предварительного общего умеренного охлаждения (группа II)

BE content in neocortx and hyppocampus when teaching 3- and 6-th months' Wistar rats without preliminary effects (1st group) and after preliminary general cooling (2nd group)

Группа Group		K		Na		Ca	
		НК NC	ГППК HPCP	НК NC	ГППК HPCP	НК NC	ГППК HPCP
3-месячные 3-mths'	I	86,40 ± 5,97	137,49 ± 12,9	71,57 ± 5,25	116,35 ± 8,87	1,59 ± 0,16	2,57 ± 0,26
	II	80,54 ± 1,78	84,44 ± 6,39**	81,57 ± 3,98**	76,00 ± 4,46**	1,81 ± 0,07*	1,58 ± 0,19**
6-месячные 6-mths'	I	109,03±13,45	102,61 ± 5,2	88,73 ± 6,55	118,02 ± 8,1	1,69 ± 0,19	2,79 ± 0,17
	II	60,60 ± 0,99**	91,83 ± 7,3*	75,89 ± 1,6**	115,31 ± 7,01	3,01 ± 0,17**	2,75 ± 0,16
		Mg		Zn		Cu	
3-месячные 3-mths'	I	1,01 ± 0,08	1,25 ± 0,03	0,73 ± 0,07	2,40 ± 0,27	1,67 ± 0,22	3,13 ± 0,24
	II	1,30 ± 0,08**	1,09 ± 0,09**	1,09 ± 0,08**	1,16 ± 0,13**	1,53 ± 0,07	2,10 ± 0,21**
6-месячные 6-mths'	I	1,20 ± 0,14	1,69 ± 0,16	1,40 ± 0,16	1,80 ± 0,21	2,56 ± 0,19	2,87 ± 0,25
	II	1,41 ± 0,07*	2,0 ± 0,17*	1,52 ± 0,09	1,50 ± 0,15*	1,64 ± 0,06**	1,83 ± 0,16**

Примечания. * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,001$.
Notes. * — $p < 0.01$; ** — $p < 0.001$.

ем уровня кальция и магния; по количественному содержанию калия, натрия и цинка исследуемые структуры не различались. Результаты исследования 6-месячных животных группы I также показали достоверное преобладание всех исследуемых БЭ (исключая калий) в ГППК. Группа II характеризовалась высоким содержанием калия, натрия, магния и меди в ГППК и слабо выраженным преобладанием кальция в НК; по уровню цинка различий между данными структурами не выявлено.

Таким образом, у 3-месячных животных предварительное общее охлаждение (группа II) привело к нивелированию гиппокампального преобладания исследуемых БЭ (за исключением меди). В НК этих животных содержание натрия, кальция, магния и цинка было выше, чем у животных группы I; в ГППК же отмечено снижение уровня всех БЭ. При этом на поведенческом уровне в группе II не было животных, неспособных к обучению, тогда как в группе I такие животные составили 25% [2]. Совокупность полученных данных позволяет предположить, что в результате предварительного общего охлаждения при выработке УРАИ у животных группы II не происходит перевозбуждения исследуемых структур ГМ.

Предварительное общее охлаждение 6-месячных животных имело эффект, отличный от такового у 3-месячных животных. Это отразилось в неоднозначных результатах на поведенческом уровне [2], разнонаправленных изменениях содержания БЭ в исследуемых структурах ГМ и в сходной с группой I динамике содержания в НК и ГППК ряда БЭ (натрий, магний, медь). А по содержанию кальция и цинка эффект предварительного охлаждения у 6-месячных животных был подобен таковому у 3-месячных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Колб В. Г., Камышников В. С.* Справочник по клинической химии.– Минск: Беларусь, 1982.– 365 с.
2. *Никишкова И. Н.* Эффект предварительного общего умеренного охлаждения на формирование функциональной системы оборонительного поведения у крыс разного возраста // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 4.– С. 85–86.
3. *Никишкова И. Н., Кутиков А. Е.* Особенности моделирования общего умеренного периодического охлаждения у крыс линии Вистар // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 113–114.
4. *Прайс В.* Аналитическая атомно-абсорбционная спектрофотометрия: Пер. с англ.– М.: Мир, 1967.– 355 с.
5. *Райцес В. С.* Нейрофизиологические основы действия микроэлементов.– Л.: Медицина, 1981.– 151 с.

Поступило 26.03.2001

of potassium, sodium and zinc all studied structures did not differ. The results of the investigations of 6-months' animals of the 1st group demonstrated a statistically significant prevailing of all studied BE (excluding calcium) in hyppocampus, the 2nd group characterized both by a high content of calcium, sodium, magnesium, copper in hyppocampus and slightly manifested prevailing of calcium in neocortex; by the level of zinc no differences between given structures were revealed.

Thus, in 3-months' animals a preliminary general cooling (2nd group) resulted in the levelling of hyppocampus prevailing of studied BE (excluding copper). In the neocortex of these animals the content of sodium, calcium, magnesium and zinc was higher, than in animals of the 1st group; in hyppocampus a decrease of the level of all BE was noted. Thereat on the behaviour level in the 2nd group there were no animals, unable to study, however in the 1st group such animals made 25% [2]. All the results, obtained by us allowed to suppose, that in the result of preliminary general cooling during CRAA production in animals of the 2nd group overexcitation of studied hyppocampus structures did not occur.

Preliminary general cooling of 6-months' animals showed the effect, differed from 3-months ones. This was reflected in ambiguous results at a behaviour level [2], in various changes in the BE content in the studied hyppocampus structures and in similar to the 1st group dynamics of the series of bioelements (sodium, magnesium, copper) in neocortex and hyppocampus. As for the content of calcium and zinc, the effect of preliminary cooling in 6-months' animals was equal to 3-months' ones.

REFERENCES

1. *Kolb V. G., Kamyshnikov V. S.* Reference book on clinical chemistry.– Minsk: Belarus, 1982.– 365 p.
2. *Nikishkova I. N.* Effect of preliminary general cooling on the formation of functional system of defensive behaviour in rats of various age // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 4.– P. 85–86.
3. *Nikishkova I. N., Kutikov A. E.* Peculiarities of the modeling of general moderate periodical cooling in Wistar rats // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 2.– P. 113–114.
4. *Price V.* Analytical atom-absorption spectrophotometry; Translated from English.– M.: Mir, 1967.– 355 p.
5. *Rajtses V. S.* Neurophysiological grounds of the effect of microelements.– L.: Meditsina, 1981.– 151 p.

Accepted in 26.03.2001

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.595.767.29: 577.125.53

UDC 57.043.595.767.29: 577.125.53

Влияние холодовой акклимации на фосфолипидный состав личинок большого мучного хрущака *Tenebrio moltor*

А. К. ГУЛЕВСКИЙ, Е. А. ГРИЩЕНКОВА, В. В. РЯЗАНЦЕВ, Л. И. РЕЛИНА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Cold Acclimation on Phospholipid Composition of Flour Beetle *Tenebrio Molitor* Larvae

A. K. GULEVSKY, Ye. A. GRISCHENKOVA, V. V. RYASANTSEV, L. I. RELINA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Большинство пойкилотермных животных, к которым относятся и насекомые, имеют приспособления (в том числе и биохимического характера), помогающие им выжить в холодный сезон года. Подготовка к неблагоприятному периоду требует времени и влечет за собой перестройку метаболизма, направленную на выработку специальных веществ, способствующих морозо- и холодоустойчивости организмов, а также депонирование резервных энергетических продуктов: углеводов, белков, жиров [2]. Одним из актуальных направлений исследований механизмов холодовой адаптации является изучение модификации липидов, так как установлено, что в период акклимации происходят значительные изменения в их количественном и качественном составах [3]. Однако в отношении личинок холодоустойчивого жука *Tenebrio molitor* таких данных не было обнаружено, что и послужило основанием для настоящей работы.

Нами исследовался фосфолипидный состав личинок (8–10 возрастов) большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (сем. *Tenebrionidae*) из лабораторной популяции. Первая группа насекомых (акклимированные) содержалась в течение 7 или 40 сут при 4–6 °С, вторая (неакклимированные) — при 20–22 °С. Экстракцию суммарных липидов осуществляли хлороформно-метанольной смесью из гомогената, полученного от 5–7 особей [4]. Тонкослойную хроматографию липидов проводили на пластинах фирмы "Merck" (адсорбент — силикагель) [1].

Как видно из рис. 1, во всех исследуемых образцах липидов, полученных от акклимированных и неакклимированных особей, присутствуют следующие основные фракции фосфолипидов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, а также фосфатидилинозитол. При этом наблюдается исчезновение минорного фосфолипида с Rf = 0,28, идентифицировать который пока не удалось. Относительное содержание неидентифицированного фосфолипида, присутствующего только у неакклимированных личинок, составляет около 3,8%. Можно предположить, что его элиминация или метаболическая трансформация в другой фосфолипид является составной частью механизма холодовой адаптации организмов.

Для более точной оценки изменений качественного состава суммарных липидов в процессе акклимации была проведена двухмерная хроматография экстракта в тонком слое силикагеля. Такой вид хроматографии позволяет достаточно тонко разделить все основные классы полярных липидов. В частности, подтвердилось, что качественный состав основных фосфолипидов в процессе низкотемпературной акклимации не претерпевает существенных изменений (рис. 2). Фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин составляют наиболее существенную их часть. Также имеются фракции сфинголипида, фосфатидилглицерина, фосфатидилинозитола и некоторое количество лизоформ фосфатидов, в основном лизофосфатидилэтаноламинов и лизолецитина. Тем не менее в процессе акклимации наблюдается тенденция к снижению количества фракций полярных липидов, в основном за счет удаления минорных компонентов.

The majority of poikilothermal animals, as well as insects, have adaptations (including biochemical origin) helping them to survive during cold season. Preparation for unfavourable period requires the time for metabolism rearrangement directed to the producing of special substances promoting the freeze- and cold-resistance and for the stocks of energetic products such as carbohydrates, proteins, fats [2]. One of the actual directions in the cold adaptation mechanisms investigations is the study of lipids modification, since it has been established that significant changes in quantitative and qualitative composition occur in acclimation period [3]. However for cold-resistant beetle *Tenebrio molitor* larvae such data were not found and it was the reason for this study.

We studied the phospholipid composition of 8–10 days' old larvae of flour beetle Tenebrio molitor of laboratory population. The first group of insects (acclimated) were maintained during 7 or 40 days at 4–6 °C, the second one at the 20–22 °C (non-acclimated). The extraction of total lipids from homogenate obtained from 5–7 insects was carried-out using chloroform-methanol mixture [4]. Thin layer chromatography of lipids was carried-out on silica gel plates (Merck) [1].

As Fig. 1 shows in all studied samples of lipids obtained from acclimated and non-acclimated insects the following basic phospholipid fractions are present: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and phosphatidylinositol. We observed the disappearance of minor lipid with Rf = 0.28, which has not been identified yet. The relative content of non-identified phospholipid presented only in non-acclimated insects is about 3.8%. It can be assumed that its elimination or metabolic transformation into other phospholipid is the component of organism cold adaptation mechanism.

To estimate more exactly the changes in qualitative composition of total lipids in adaptation process we have carried-out the two-dimensional chromatography of extract in silica gel thin

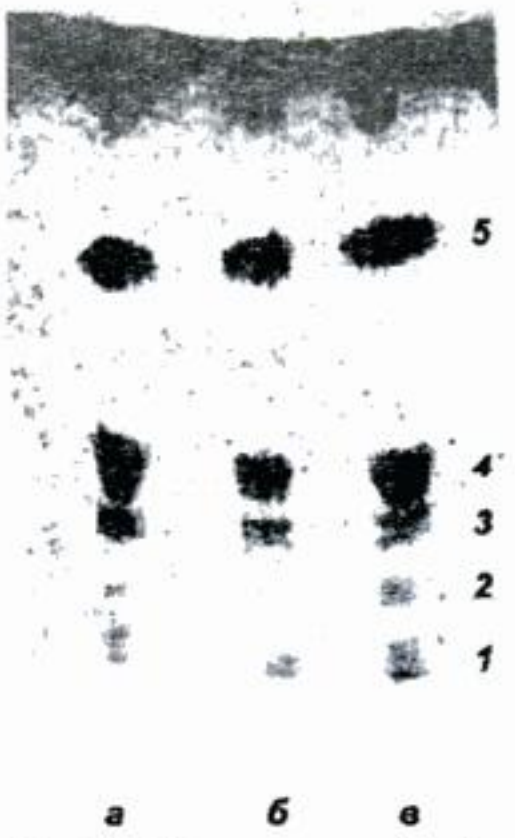


Рис. 1. 1. Хроматограмма фосфолипидов личинок *Tenebrio molitor*: а) акклимированные 7 сут; б) акклимированные 40 сут; в) неакклимированные; *1* — фосфатидилсерин; *2* — минорный фосфолипид; *3* — фосфатидилинозит; *4* — фосфатидилхолин; *5* — фосфатидилэтаноламин.

Fig. 1. Chromatogramme of phospholipids of *Tenebrio molitor* larvae: a) acclimated during 7 days; б) acclimated during 40 days; в) non-acclimated; *1* — phosphatidylserine; *2* — minor phospholipid; *3* — phosphatidylinositol; *4* — phosphatidylcholine; *5* — phosphatidylethanolamine.

Матеріал, захищений авторським правом

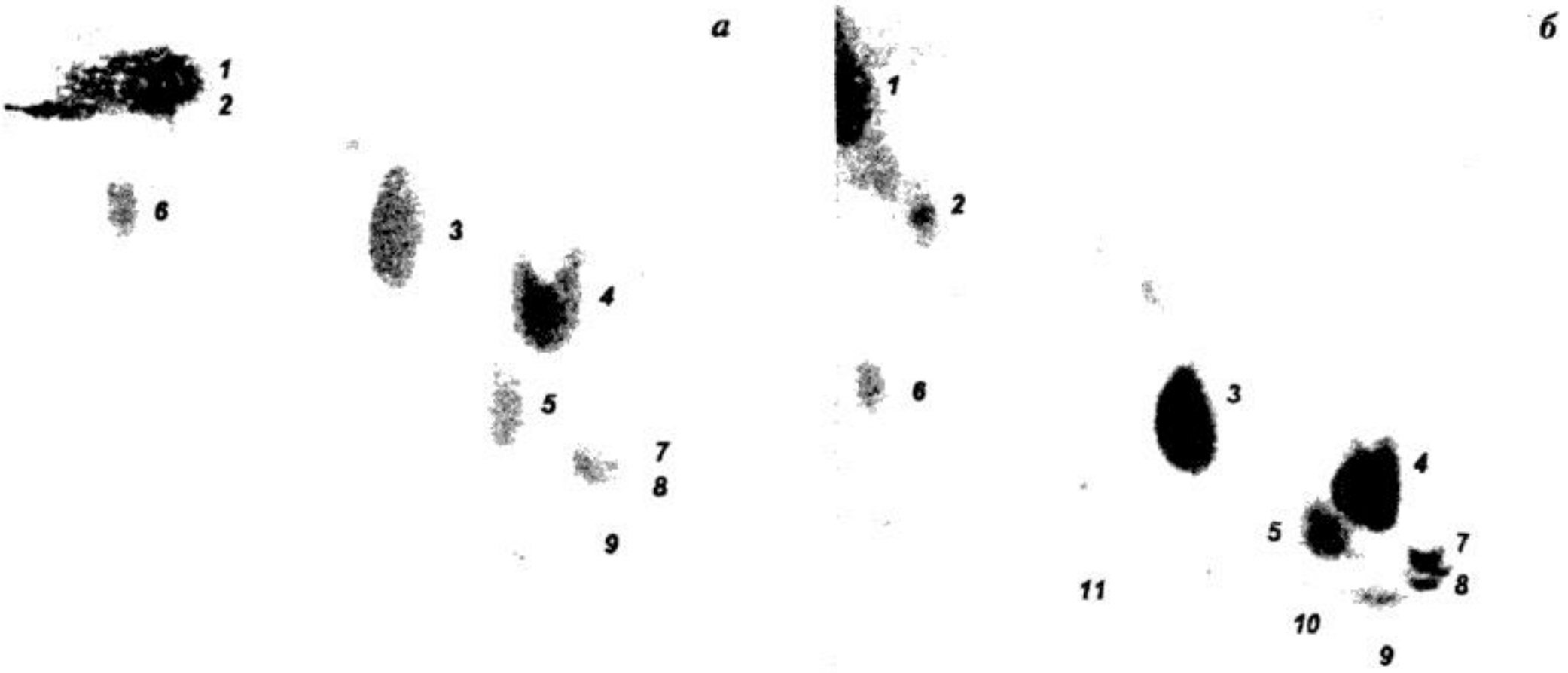


Рис. 2. Двухмерная тонкослойная хроматограмма фосфолипидов личинок *Tenebrio molitor*: а) акклимированные; б) неакклимированные; *1* – холестерин; *2* – триглицериды; *3* – фосфатидилэтаноламин; *4* – фосфатидилхолин; *5* – лизофосфатидилэтаноламин; *6* – фосфоглицерин; *7* – сфингомиелин; *8* – лизофосфатидилхолин; *9* – фосфатидилсерин; *10* – фосфатидилинозит; *11* – минорные компоненты.

Fig. 2. Two-dimensional chromatography of phospholipids of *Tenebrio molitor* larvae: a) acclimated; б) non-acclimated; *1* – cholesterol; *2* – triglycerols; *3* – phosphatidylethanolamine; *4* – phosphatidylcholine; *5* – lysophosphatidylethanolamine; *6* – phosphatidylglycerol; *7* – sphingomyelin; *8* – lysophosphatidylcholine; *9* – phosphatidylserine; *10* – phosphatidylinositol; *11* – minor components.

Из приведенных данных можно заключить, что в процессе акклимации пойкилотермных организмов, примером которых являются холодоустойчивые насекомые, липидный обмен не ограничивается лишь накоплением жиров в виде запасных питательных веществ. Изменение фосфолипидного спектра в данный период свидетельствует о более сложных перестройках общего метаболизма и липидного в частности. Направление этих изменений носит, несомненно, адаптивный характер, направленный на выживание вида при неблагоприятных условиях внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кейтс М.* Техника липидологии.– М.: Мир, 1975.– 322 с.
2. *Ушатинская Р. С.* Скрытая жизнь и анабиоз.– М.: Наука, 1990.– 182 с.
3. *Хочачка П., Сомеро Д.* Биохимическая адаптация.– М.: Мир, 1988.– 568 с.
4. *Folch J., Less M., Slaane-Stanley G. H.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem.– 1957.– 226.– P. 497–509.

Поступило 06.06.2000

layer. Such kind of chromatography allows the separation of all basic classes of polar lipids with fine accuracy. In particular, it was confirmed that the qualitative composition of basic phopholipids did not essentially change under low temperature acclimation (Fig. 2). Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine make the most essential part of them. Also there are the fractions of sphingomyelin, phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and some phosphatides' lysoforms, generally lysophosphatidylethanolamines and lysolecitine. Nevertheless under acclimation process the tendency for decrease of polar lipids fractions number is observed, generally at the expense of minor components removal.

From the presented data we can conclude that the lipids exchange under acclimation of poikilothermal animals (cold resistant insects for example) is not restricted just in fats accumulation as a stock nutritive substances. The change in phospholipid composition during this period testifies to more complex rearrangements of general metabolism and that of lipids in particular. The direction of these changes is of undoubtedly an adaptive origin, aimed to the survival of species under unfavourable environmental conditions.

REFERENCES

1. *Keits M.* Lipidology techniques.– M.: Mir, 1975.– 322 p.
2. *Ushatinskaya R. S.* Invisible life and anabiosis.– M.: Nauka, 1990.– 182 p.
3. *Hochachka P., Somero D.* Biochemical adaptation.– M.: Mir, 1988.– 568 p.
4. *Folch J., Less M., Slaane-Stanley G. H.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem.– 1957.– 226.– P. 497–509.

Accepted in 06.06.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.014.464

UDC 612.014.464

Стерилизация оборудования для криобиологических технологий с помощью озона

В. Д. ЗИНЧЕНКО, Н. Г. КАДНИКОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

И. М. КОВАЛЬЧУК, А. М. ГРЕК
Харьковский военный университет

Equipment Sterilization with Ozone for Cryobiological Technologies

V. D. ZINCHENKO, N. G. KADNIKOVA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

I. M. KOVALCHUK, A. M. GREK
Kharkov Military University

Криобиологические технологии часто связаны с использованием изделий из таких термолабильных материалов, как пластмассовые контейнеры, детали замораживающих устройств, системы для введения криозащитных сред, и других изделий, применяемых на разных этапах криоконсервирования биологических объектов. Их дезинфекция должна осуществляться при температуре не выше 100 °С.

В последнее время среди холодных методов стерилизации все больший интерес у исследователей вызывает метод озонирования. Озон (O_3) — одна из двух известных молекулярных форм кислорода — относится к числу наиболее сильных окислителей. Это обусловлено низкой энергией отрыва атома кислорода от молекулы озона и высоким сродством молекулы озона к электрону [3]. Озон давно используется для обеззараживания питьевой воды и сточных вод, причем по своей эффективности он значительно превосходит хлор [1, 2]. В отличие от хлора озон экологически безвреден, поскольку он быстро распадается до кислорода в форме O_2.

Механизм обеззараживающего действия озона во многом пока не ясен. Считается, что в основе такого действия лежит высокая активность озона во взаимодействии с органическими веществами, в результате чего в микроорганизмах поражаются жизненно важные для них ферменты, нарушается обмен веществ в клетках, что вызывает их гибель [6].

Более высокая способность озона по сравнению с хлором диффундировать через клеточную мембрану приводит к более быстрому его воздействию на протоплазму.

Обеззараживающее действие озона оказывается быстрым и эффективным только при поддержании нужной его концентрации в течение определенного времени [4, 6]. Иногда это свойство озона сравнивают с известным биологическим принципом "все или ничего". В данной связи эффективная дезинфекция озоном может быть достигнута только при использовании генераторов озона, способных обеспечивать его достаточно высокую концентрацию.

Цель настоящей работы — разработка лабораторной установки для дезинфекции озоном в газовой фазе изделий, используемых в криобиологических технологиях и не подлежащих дезинфекции при высоких температурах.

В качестве генератора озона была выбрана конструкция озонатора Ван-дер-Маде с барьерным разрядом. Разрядные трубки такого типа давно используются в промышленных озонаторах для обработки питьевой воды [1, 5]. Достоинством разрядной трубки этой конструкции является устойчивая работа при достаточно большом потоке газа через разрядный промежуток.

Cryobiological technologies are often connected to the usage of the products, made of such thermolabile materials as plastic containers, parts of freezing devices, systems for the introduction of cryoprotective media; as well as other products, applied at various stages of biological objects cryopreservation. Their disinfecting should be done under the temperature, not higher than 100 °C.

Recently among the methods of cold sterilization ozonization method is of great interest. Ozone is one of two known molecular forms of oxygen (O_3), it is related to the number of the strongest oxidants. This fact is stipulated by a low energy of the oxygen atom separation from ozone molecule and high affinity of ozone molecule to electron [3]. Ozone is used for the disinfection of water and sewage, and by its efficiency it significantly exceeds chlorine [1, 2]. In contrast to chlorine, ozone is ecologically safe, because of its rapid disintegration up to oxygen in the O_2 form.

The mechanism of ozone disinfecting effect has remained insufficiently studied. It is considered, that a high ozone activity, interacting with organic substances is in the base of such an effect, in the result of this in microorganisms vitally important for them enzymes are damaged, hypometabolism in cells is impaired, causing their damage [6]. A higher in comparison with chlorine capability of ozone to diffuse through a cellular membrane results in its more rapid effect on a protoplasm.

Disinfecting effect of ozone occurred to be a rapid and efficient just at maintenance of its concentration during a certain time [4, 6]. Sometimes this characteristic of ozone is compared with "everything or nothing", well-known biological principle. In this connection an efficient disinfection with ozone can be achieved only when using ozone generators, capable to provide its quite a high concentration.

The elaboration of a laboratory device for disinfection with ozone in a gas phase of the products, used in cryobiological technologies and not subjected to disinfection under high temperatures was the aim of the given work.

As ozone generator the ozonator designed by of Van-der-Made with a barrier charge was chosen. Discharge tubes of such a type are used for a long time in industrial ozonators for the treatment of potable water [1, 5]. A stable work at quite a big gas stream through a discharge interval is the advantage of a charge tube in this design.

Scheme of the device is demonstrated in the Figure. Device is hermetic, ozone outlet into an atmosphere during the work is excluded. A discharge tube *1* with an air cooling is connected to the camera *2* to treat the products by means of tubes of ozone-stable polymer materials (rubber products are rapidly damaged in an ozone atmosphere).

Chamber *2* is put into thermostat *3* of UH-16 type (Germany). A discharge tube is powered by the voltage of industrial frequency of high-voltage source *4*. Hermetic device for blower *5* is used for ozone circulation in a system. Ozone is obtained from air, however filling of the system with oxygen is admitted. When ozone obtaining from an air ozone concentration in a system in a circulation regimen makes, according to our calculations, about 6 mg/m^3. By means of given

Матеріал, захищений авторським правом

Схема установки показана на рисунке. Установка герметичная, выход озона в атмосферу во время работы исключается. Разрядная трубка *1* с воздушным охлаждением соединена с камерой *2* для обработки изделий при помощи трубок из озоностойких полимерных материалов (резиновые изделия быстро разрушаются в атмосфере озона).

Камера *2* помещена в термостат *3* типа UH-16 (Германия). Разрядная трубка питается напряжением промышленной частоты от высоковольтного источника *4*. Герметичный воздухонагнетатель *5* предназначен для циркуляции озона в системе. Озон получается из воздуха, но допускается и заполнение системы кислородом. При получении озона из воздуха концентрация озона в системе в режиме циркуляции составляет, по нашим оценкам, около 6 г/м^3.

С помощью данной установки проверяли эффективность стерилизации оборудования и материалов при обработке их озоном в газовой фазе при температурах выше 20 °С, но не превышающих 100 °С.

Исследуемые материалы помещали в камеру термостата и после выдержки в течение примерно 0,5 ч для установления температуры материалов в камеру подавали озон.

Для определения стерильности анализировали смыв с исследуемых поверхностей. Полученный смыв переносили на питательные среды: тиогликолевую среду и среду Сабуро.

Контрольные образцы, которые первоначально не обрабатывались, были контаминированы сапрофитной бактериальной и грибковой флорой. Пластмассовые контейнеры, обработанные озоном, были полностью стерильны.

Перевязочный материал и фильтры из целлюлозы также обследовались на стерильность методом отпечатков на мясопептонном агаре и на среде Сабуро. Бактериальной флоры в исследованных образцах не обнаружено, однако на среде Сабуро отмечается рост низших грибов рода *Aspergillus*.

Повышение температуры позволяет сократить время обработки материалов озоном. Например, при температуре 50 °С обработка материалов озоном в течение 0,5 ч приводила к такой же степени стерилизации, как при температуре 20 °С в течение 1 ч.

Таким образом, метод обработки озоном можно рекомендовать для холодной стерилизации оборудования, используемого в криобиологии. Вместе с тем сфера применения данного метода может быть значительно шире. Одной из областей, где его использование кажется достаточно многообещающим, — спецобработка различного имущества и материалов как средство нейтрализации последствий действия химического и бактериологического оружия. Однако в последнем случае необходимы тщательные экспериментальные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кожинов В. Ф., Кожинов И. В.* Озонирование воды.– М.: Стройиздат, 1974.– 160 с.
2. *Кульский Л. А.* Теоретические основы и технология кондиционирования воды.– Киев: Наук. думка, 1971.– 642 с.
3. *Разумовский С. Д., Заиков Г. Е.* Озон и его реакции с органическими соединениями.– М.: Наука, 1974.– 322 с.
4. *Рахманин Ю. А., Стрикаленко Г. В., Мокиенко А. В. и др.* Применение озона для дезинфекции судовых систем водоснабжения, инфицированных синегнойной палочкой // Гигиена и санитария.– 1990.– № 11.– С. 32–33.
5. *Филиппов Ю. В., Вобликова В. А., Пантелеев В. И.* Электросинтез озона.– М.: МГУ, 1987.– 237 с.
6. *Horvant M., Bilitsky Z., Huttner J.* Ozon. Acade miad. Kiado.– Budapest, 1985.– 212 p.

Поступило 17.10.2000

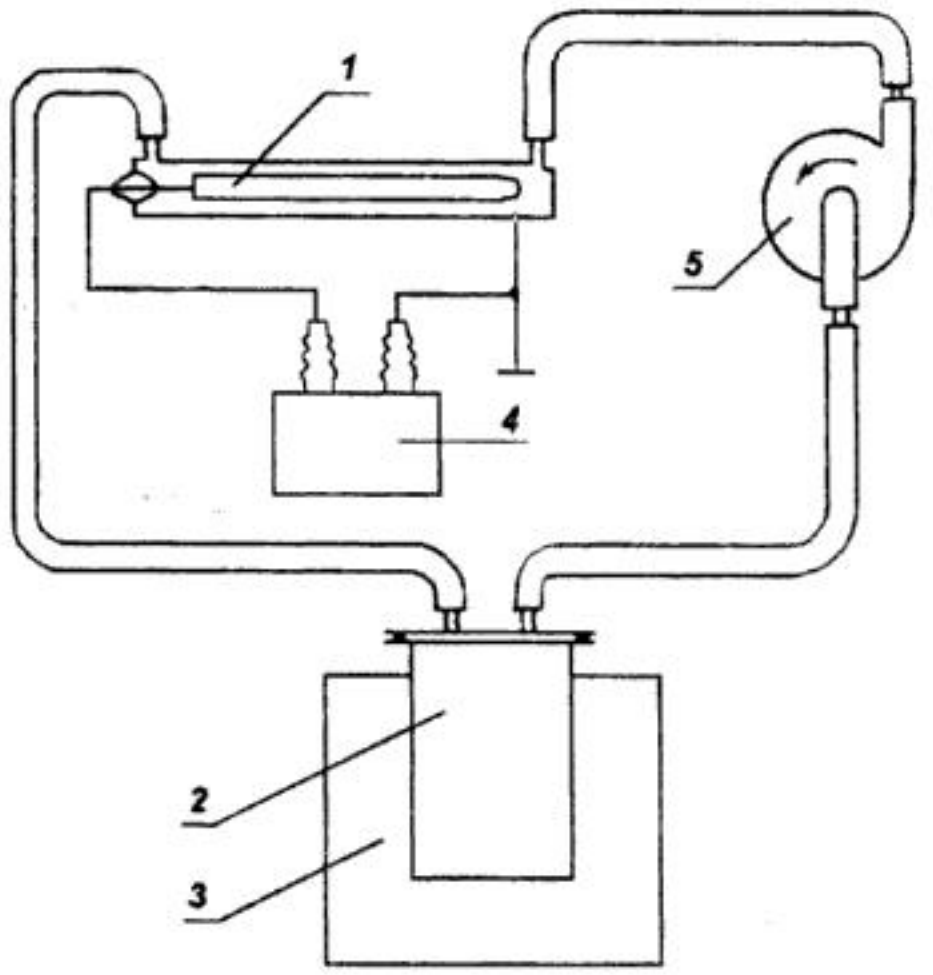


Схема экспериментальной установки: *1* – разрядная трубка; *2* – камера; *3* – термостат; *4* – высоковольтный источник; *5* – воздухонагнетатель.

Scheme of experimental device: *1* – discharge tube; *2* – chamber; *3* – thermostat; *4* – supply source; *5* – blower.

device the efficiency of equipment and materials sterilization was controlled when treating them with ozone in a gas phase under various temperatures higher than 20 °C, but not higher than 100 °C.

Investigated materials were put into a thermostat chamber, and in 0.5 hrs ozone was supplied into a chamber to determine temperature.

To detect sterility the washing-out from the examined surfaces was analyzed. The obtained washing-out was transferred into nutritive media: thyoglycol and Saburo media.

The control samples, not initially treated, were contaminated with saprophyte bacterial and fungous flora. Plastic containers ozone treated, were completely sterile.

Dressing material and cellulose filters also were investigated for the sterility by means of the method of imprints on a plain agar and Saburo media.

It was established, that no bacterial flora in the studied samples was revealed, however the growth of *Aspergillus* fungi is noted in Saburo medium. For example, under the temperature of 50 °C the material treating with ozone within 30 min resulted in a similar sterilization degree as under the temperature of 20 °C within 1 hrs.

Thus, the method of treatment with ozone can be recommended for a cold sterilization of the equipment, used in cryobiology. The field of such a method application can be significantly higher. Specialized treatment of various equipment and materials as the method for neutralization of the consequences of chemical and bacteriological weapon is one of the fields, where this method can be efficient. However, in the latter case there is a necessity of careful experimental investigations.

REFERENCES

1. *Kozhinov V. F., Kozhinov I. V.* Water ozonization.– M.: Strojizdat, 1974.– 160 p.
2. Kulskiy L. A. Theoretical grounds and technology for water conditioning.– M.: Naukova dumka, 1971.– 642 p.
3. *Razumovskiy S. D., Zaikov G. E.* Ozone and its reactions with organic compounds.– M.: Nauka, 1974.– 322 p.
4. *Rakhmanin Yu. A., Strikalenko G. V., Mokienko A. V. et al.* Ozone application for disinfection of water supplying systems, contaminated with Pseudomonas aeruginosa // Gigiena & Sanitaria.– 1990.– № 11.– P. 32–33.
5. *Philippov Yu. V., Voblikova V. A., Panteleev V. I.* Ozone electrosynthesis.– M.: Moscow State University, 1987.– 237 p.
6. *Horvant M., Bilitsky Z., Huttner J.* Ozon. Acade miad. Kiado.– Budapest, 1985.– 212 p.

Accepted in 17.10. 2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 664.78: 658.512.2

UDC 664.78: 658.512.2

Концепція розробки нового апарата для охолодження пива

В. В. ПОЛЕВИЧ

Харківська державна академія технології і організації харчування

Conception for Elaboration of New Device for Cooling of Beer

V. V. POLEVICH

Kharkov State Academy for Technology and Organization of Feed

Ключовим моментом при проектуванні апаратів охолодження напоїв проміжним холодоносієм є раціональний вибір холодоносія, який повинен задовольняти комплексу вимог до його теплофізичних, фізико-хімічних, технологічних і санітарно-гігієнічних властивостей.

В останній час з'явилися дані про використання як низькотемпературних холодоносіїв кремнійорганічних рідин, зокрема, олігофтор-олігохлорорганосилоксанів, які серійно випускаються вітчизняною хімічною промисловістю, зокрема Запорізьким ПО "Кремнійполімер" [4]. Зазначені рідини мають унікальні фізико-хімічні і технологічні властивості; вони характеризуються повною хімічною інертністю відносно конструкційних матеріалів, низькою летючістю, пожежо- і вибухобезпечністю, антифрикційними (мастильними) властивостями [1]. У роботах [2, 3] наведено теплофізичні властивості кремнійорганічних рідин типів ХС-2-1, ХС-2-188, ФС-Т-5 у широкому діапазоні температур (від –60 до 20 °С) і показано, що кінетична в'язкість зазначених рідин зростає зі зниженням температури повільніше, ніж у холодоносіїв, які використовуються у даний час. Тому навіть при 0 °С і нижче кінетична в'язкість має цілком прийнятне значення, що дозволяє забезпечити циркуляцію холодоносія в замкнутому контурі без необхідності створення надмірно високого напору за допомогою циркуляційного насоса.

Враховуючи це, пропонується нова концепція процесу охолодження напоїв, наприклад пива. Пиво з початковою температурою t'_1 надходить самопливом або за допомогою ручного насоса в змійовик охолодження і на його виході має температуру t''_1; значення t'_1 і t''_1 установлюються з технологічних міркувань. Змійовик занурюється у ванну, заповнену проміжним холодоносієм (кремнійорганічною рідиною), який за допомогою циркуляційного насоса прокачується крізь ванну з певною розрахунковою швидкістю. Холодоносій рухається назустріч рухові пива в змійовику і має середню температуру $\bar{t}_2 = \frac{1}{2}(t'_2 + t''_2)$, встановлену з технологічних міркувань і підтримувану у випарнику холодильного агрегату, що працює на озонобезпечному фреоні R134A [5]. Як холодоносій пропонується олігофторорганосилоксанова рідина ФС-Т-5, що за даними [2] характеризується найповільнішим збільшенням в'язкості при зниженні температури в порівнянні з іншими кремнійорганічними рідинами. Застосування зазначених видів холодоагента і холодоносія забезпечує повну екологічну чистоту процесу, можливість довгострокового технічного використання зазначеного холодоносія (декілька десятиліть).

Для оцінки енергоємкості процесу необхідно провести повний тепловий і гідродинамічний розрахунок системи охолодження нового апарата. Вихідні дані для подальшого розрахунку можна встановити, виходячи з особливостей запропонованого процесу і технологічних міркувань.

Раціональний вибір $\bar{t}_2$ повинен відповідати таким вимогам:

забезпечувати достатню інтенсивність теплопередачі від пива, що охолоджується, до холодоносія (через стінку змійовика охолодження) і від холодоносія до холодоагента (у випарнику холодильного агрегату);

забезпечувати технічно прийняте значення кінетичної в'язкості холодоносія при обраному значенні $\bar{t}_2$, що дозволяє ство-

Proper selection of a coolant, which should satisfy the complex of requirements to its thermophysical, physical and chemical, technological and sanitary-hygienic characteristics is a key moment when designing apparatuses for cooling of drinks by intermediate coolant.

Recently the data on the usage of both low temperature coolants of silicon-organic fluids, in particular, oligofluorine oligochlorine organic siloxanes, produced by national chemical industry, especially by "Kremniypolimer" Production Unit, Zaporozhie [4]. Mentioned fluids have a complex of unique physical, chemical and technological properties, they are characterized by a complete chemical inertia in respect of construction materials, low volatility, fire safety and inflammability, antifrictive characteristics etc. [1]. In the works [2, 3] thermophysical characteristics of the properties of silicon-organic fluids of XC-2-1, XC-2-188, FC-T-5 series with a wide temperature spectrum (from –60 to 20 °C) were shown, as well as it was demonstrated, that kinetic viscosity of the mentioned fluids with increasing lower than the temperature reduction in comparison with the coolants, used thereat. Therefore, even under 0 °C and lower kinetic viscosity has quite an admissible value, allowing to provide a coolant circulation in a closed contour without the necessity of the creation of super-high pressure by means of circulation pump.

Taking into consideration this fact, we propose new conception of the cooling process of drinks, for example beer. Beer with t'_1 initial temperature is self-fed or supplied by means of manual pump into a cooling coil and on its exit has t''_1 temperature; t'_1 and t''_1 values are fixed according to technological ideas. A coil is immerged into a bath, filled with intermediate coolant (silicon-organic fluid), which is rolled through a bath with a certain calculation rate by means of circulation pump. Coolant moves in opposite to beer movement in a coil and has an average temperature of $\bar{t}_2 = \frac{1}{2}(t'_2 + t''_2)$ [5]. According to the data [2], oligofluorine oligochlorine organic siloxane fluid of industrial production is proposed as a coolant, which is characterized with the lowest viscosity increase when decreasing temperature in comparison with other silicon-organic fluids. Application of the mentioned types of cooling agents and coolants provides a complete ecological safety of the process. Chemical inertia of this fluid to construction materials will provide a long-term usage of the set (within 10 years).

To estimate power-intensity of the process it is necessary to conduct a complete thermal and hydrodynamic calculation of a cooling system of new apparatus. Initial data for further calculation can be evaluated, proceeded both from the peculiarities of the proposed process and technological reasons.

A proper $\bar{t}_2$ selection should correspond to the following requirements:

to provide a sufficient intensity of heat transfer from a cooled beer to a coolant (through a wall of cooling coil) and from a coolant to cooling agent (in evaporator of a cooling device).

to provide technically acceptable value of kinetic viscosity of a coolant at t_2 selected value, allowing to make a coolant circulation in a cooling system without an super-pressure, created by a circulation pump;

Матеріал, захищений авторським правом

рити циркуляцію холодоносія в системі охолодження без надмірного напору, утворюваного циркуляційним насосом;

виключити можливість наморожування пива на зовнішній поверхні змійовика охолодження, особливо при перервах у роботі апарата.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бабиков Ю. М., Рассказов Д. С.* Органические и кремнийорганические теплоносители.- М.: Энергия, 1975.- 271 с.
2. *Пахомов П. Л, Сафонов В. В., Храмшина Л. И.* Теплофизические характеристики жидких кремнийорганических низкотемпературных хладоносителей ХС 2-1, ХС-2-1ВВ и ФС-Т-5 // Вестник науки и техники.- 1998.- Вып. 2.- С. 51-52.
3. *Пахомов П. Л, Сафонов В. В., Храмшина Л. И.* Исследование режима течения и потери давления в контуре аппарата с принудительной циркуляцией низкотемпературного хладоносителя // Актуальні науково-методичні проблеми в підготовці спеціалістів вищої кваліфікації для торгівлі і харчування:Зб. наук. праць. Ч.1. - Харків: ХДАТОХ, 1997.- С. 387-389.
4. *Пахомов П. Л, Сафонов В. В., Храмшина Л. И.* Низкотемпературные кремнийорганические хладоносители для аппаратов охлаждения и замораживания напитков // Там же. - С. 322-325.
5. *Сафонов В. В., Беляева И. М.* Пути и методы замены хладона R12 озонобезопасными рабочими веществами // Там же - С. 325-327.

Надійшло 16.03.2001

to exclude the possibility of freezing of beer on an upper surface of a cooling coil, especially during breaks in the apparatus work.

REFERENCES

1. *Babikov Yu. M., Rasskazov D. S.* Organic and silicon-organic heat-transfer agents.- M.: Energiya, 1975.- 271 p.
2. *Pakhomov P. L., Safonov V. V., Khramshina L. I.* Thermophysical characteristics of liquid silicon-organic low temperature coolants CS 2-1, CS-2-1BB and FS-T-5 // Vestnik nauki i tekhniki.- 1988.- Issue 2.- P. 51-52.
3. *Pakhomov P. L., Safonov V. V., Khramshina L. I.* Investigation of the regimen of pressure flow and loss in an apparatus contour with forced circulation of low temperature coolant // Actual scientific methodical problems when preparing highly qualified specialists for commerce and nutrition: Collection of scientific works. Part 1.- Kharkov, Kharkov State Academy of Nutrition Technology and Organization, 1997.- P. 387-389.
4. *Pakhomov P. L., Safonov V. V., Khramshina L. I.* Low temperature silicon organic coolants for apparatures for cooling and freezing of drinks // Ibid.- P. 322-325.
5. *Saphonov V. V., Belyaeva I. M.* The ways and methods for khladon R12 coolant changing by means of ozone safe working substances // Ibid.- P. 325-327.

Accepted in 16.03.2001

Научные редакторы *В. И. Луговой, Т. Н. Юрченко*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка: *И. Г. Пятигорская*

Scientific Editors *V. I. Lougovoy,T. N. Yurchenko*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подписано в печать 26.03.2001 Формат 60x84⅛. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10,23. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Индекс 70474

2001

Index 70474

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском язы-ках. 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 tussue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are utmost importance with regard to preservation of plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to
Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом