

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

Институт проблем криобиологии  
и криомедицины

4  
1999

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the  
Ukraine  
Department of Molecular Biology,  
Biochemistry, Experimental and  
Clinical Physiology

Institute for Problems of Cryobiology  
and Cryomedicine

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY



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

## **Редакционный совет**

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

**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

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

## **Editorial Council**

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

**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



# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Парченко Т. А., Бондаренко В. А. Изменение объема эритроцитов при действии рН среды и модификаторов мембраны . . . . .                                                                                                                                                | 3  |
| Лучко Н. А., Кучков И. Н. Влияние кофеина и пентоксифиллина на гликолитическую функцию спермиев человека, криоконсервированных в условиях сверхбыстрых скоростей охлаждения . . . . .                                                                                 | 8  |
| Трохименко А. Г., Безуглый Н. Д., Гордиенко Н. А. Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность. I. Распределение осмотических и геометрических характеристик в популяции ооцитов и яйцеклеток . . . . . | 14 |
| Кучеренко Ю. В., Розанова Е. Д. Элиминация белков мембран эритроцитов человека, индуцированная ПЭГ-1500 . . . . .                                                                                                                                                     | 21 |
| Козлова В. Ф., Юрченко Т. Н., Щетинский М. И. Влияние охлаждения на структурно-функциональное состояние обновляющихся клеток желудочно-кишечного тракта . . . . .                                                                                                     | 24 |
| Рамазанов В. В., Лугилова Н. А., Тодрин А. Ф., Бондаренко Т. П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде . . . . .                                                                                                               | 34 |
| Бондаренко В. А., Зовский В. Н., Никишкова И. Н., Кутиков А. Е. Влияние охлаждения на содержание биоэлементов в тканях животных половозрелого и пубертатного возраста . . . . .                                                                                       | 42 |

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Высеканцев И. П., Степанюк Л. В. Влияние условий хранения на сахаролитические свойства криоконсервированных и лиофилизированных бактерий <i>Escherichia coli</i> . . . . .                            | 48 |
| Творовский С. В., Черепанов В. В. Влияние эквilibрации спермы карпа ( <i>Cyprinus Carpio L.</i> ) с криопротекторами на скорость эмбрионального развития . . . . .                                    | 53 |
| Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Влияние физико-химических факторов, реализуемых на этапах криоконсервирования, на морфофункциональные свойства культуры <i>Streptomyces fradiae</i> ВНИИГ-25А . . . . . | 57 |

### КРИОМЕДИЦИНА

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Питько В. А. Криоэкстракт хориона — восстановитель биохимических процессов при экспериментальном воспалительном процессе у крыс . . . . .                                                                                       | 64 |
| ✓ Караченцев Ю. Г., Хазієв В. В. Диференційний підхід до вивчення показників гуморального анти-тиреоїдного імунітету у хворих на АІТ після криогенного лікування . . . . .                                                      | 68 |
| Грищенко В. И., Керос В. А., Бондаренко В. А. Влияние трансплантации криоконсервированной фетотестикулярной ткани человека на функциональное состояние репродуктивной системы при некоторых формах мужского бесплодия . . . . . | 73 |

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Хроменкова О. Б., Смольянинова Е. И., Ханина Л. А. Осмотическое поведение эмбрионов мыши в растворах глицерина и его оксипропилированного производного . . . . .                                         | 77 |
| Зинченко В. Д. Динамика деградации макроэргических соединений в изолированных эритроцитах человека в присутствии глицерина . . . . .                                                                     | 79 |
| Загнойко В. И. Интенсивность биосинтеза белка в эмбрионах белых мышей под влиянием гипотермической консервации и действия фракции эпителия кишечника из зимнеящего суслика <i>S. undulatus</i> . . . . . | 81 |



# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Parchenko T. A., Bondarenko V. A.</i> The Change of Erythrocyte Volume Under the Effect of Medium pH and Membrane Modifiers                                                                                                                   | 3  |
| <i>Luchko N. A., Kuchkov I. N.</i> Caffeine and Pentoxifylline Effect on Glycolytic Function of Human Spermatozoa Cryopreserved under Conditions of Ultrarapid Cooling Rates                                                                     | 8  |
| <i>Trokhimenko A. G., Bezugly N. D., Gordienko N. A.</i> Some Biophysical Properties of Porcine Sex and Embryonic Cells, Determining their Cryoresistance. I. Distribution of Osmotic and Geometric Characteristics in Oocyte and Ova Population | 14 |
| <i>Kucherenko Yu. V., Rozanova E. D.</i> Induced by PEG-1500 Elimination of the Membrane Proteins of Human Erythrocytes                                                                                                                          | 21 |
| <i>Kozlova V. F., Yurchenko T. N., Schetinsky M. I.</i> Cooling Effect on Structural and Functional State of Renewed Gastroenteric Tract Cells                                                                                                   | 24 |
| <i>Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Todrin A. F., Bondarenko T. P.</i> Proton Transport Osmotic Modification in Erythrocytes in a Sulphatic Medium                                                                                               | 34 |
| <i>Bondarenko V. A., Zovsky V. N., Nikishkova I. N., Kutikov A. E.</i> Cooling Effect on the Contents of Bioelements in Tissues of Animals of Mature and Pubertant Age                                                                           | 42 |

### CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Vysekantsev I. P., Stepanyuk L. V.</i> Effect of Storage Conditions on Sugar-lytic Properties of Cryopreserved and Frozen-dried Bacteria <i>Escherichia Coli</i>                                       | 48 |
| <i>Tvorovsky S. V., Cherepanov V. V.</i> Effect of Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) Sperm Equilibration with Cryoprotectants on the Rate of Embryonic Development                                        | 53 |
| <i>Tsutsayeva A. A., Ananyina A. E.</i> Effect of Physical and Chemical Factors, Realized at the Cryopreservation Stages, to Morphofunctional Properties of <i>Streptomyces fradiae</i> VNIIG-25A Culture | 57 |

### CRYOMEDICINE

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Pitko V. A.</i> Chorion Cryoextraction is the Recovering Agent of Biochemical Processes During an Experimental Inflammatory Process in Rats                                         | 64 |
| <i>Karachentsev Yu. I., Khaziev V. V.</i> Differential Approach to the Study of Humoral Antithyroid Indices After Cryogenic Treatment of the Patients with Autoimmune Thyroiditis      | 68 |
| <i>Grischenko V. I., Keros V. A., Bondarenko V. A.</i> Effect of Human Fetotesticular Tissue Transplantation on Functional State of Reproductive System at Some Male Infertility Forms | 73 |

### BRIEF COMMUNICATIONS

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Khromenkova O. B., Smolyaninova E. I., Khanina L. A.</i> Osmotic Behavior of Mice Embryos in Glycerol and its Oxyethylated Derivative Solutions                                                                              | 77 |
| <i>Zinchenko V. D.</i> Dynamics of Macroergic Compound Degradation in Human Isolated Erythrocytes in the Presence of Glycerol                                                                                                   | 79 |
| <i>Zagnoyko V. I.</i> Intensity of Protein Biosynthesis in White Mice Embryos under the Effect of Hypothermal Preservation and the Action of Intestine Epithelium Fraction from <i>C. undulatus</i> Hibernating Ground-squirrel | 81 |



## Изменение объема эритроцитов при действии *pH* среды и модификаторов мембраны

Т. А. ПАРЧЕНКО, В. А. БОНДАРЕНКО

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина*

## The Change of Erythrocyte Volume Under the Effect of Medium *pH* and Membrane Modifiers

T. A. PARCHENKO, V. A. BONDARENKO

*Kharkov National University named by V. N. Karazin*

Исследовано изменение объема эритроцитов при их взаимодействии с пчелиным ядом (ПЯ), а также с ПЯ плюс хлорпромазин (ХПМ) в зависимости от величины *pH* внешней среды. Показано, что ниже *pH* 4,0 ПЯ вызывает набухание эритроцитов; в области *pH* 7,0–8,5 уменьшение объема тений такое же, как у контрольных клеток (*pH* 7,4); при *pH* 10,0–11,0 происходит существенное уменьшение объема тений эритроцитов. ХПМ увеличивал набухание в интервале *pH* 3,0–4,5 и был ингибитором при *pH* 9,0–11,0. Выявлено, что стабильность эритроцитов сохраняется в интервале *pH* 7,0–8,5; эффект уменьшения объема, присущий ПЯ, определяется электростатическим взаимодействием между компонентами ПЯ и эритроцитарной мембраны.

Досліджено зміну об'єму еритроцитів при їх взаємодії з бджолиною отрутою (БО), а також з БО плюс хлорпромазин (ХПМ) в залежності від величини *pH* зовнішнього середовища. Показано, що нижче *pH* 4,0 БО спричинює набухання еритроцитів; в області *pH* 7,0–8,5 зменшення об'єму тіней таке ж, як у контрольних клітин (*pH* 7,4); при *pH* 10,0–11,0 спостерігалось значне зменшення об'єму тіней еритроцитів. ХПМ сприяв зростанню набухання в області *pH* 3,0–4,5 і був інгібітором при *pH* 9,0–11,0. Виявлено, що стабільність еритроцитів зберігається в інтервалі *pH* 7,0–8,5; стискуєчий ефект БО обумовлений електростатичною взаємодією між компонентами БО і еритроцитарної мембрани.

The change of erythrocytes volume during their interaction with bee venom (BV), as well as BV + chlorpromazine (CPM) depending on the *pH* value of outer medium has been investigated. It has been shown, that BV with *pH* lower than 4.0 causes the erythrocyte swelling; in the *pH* range of 7.0–8.5 a decrease of ghost volume is similar to the control cells (*pH* 7.4); a considerable shrinkage of erythrocyte ghost volume occurs in the *pH* range of 10.0–11.0. CPM increased swelling in the *pH* range of 7.0–8.5 and was an inhibitor in the *pH* range of 9.0–11.0. It has been revealed, that erythrocyte stability remains in the range of *pH* 7.0–8.5; the effect of volume decrease, typical for BV, is determined by means of an electrostatic interaction between BV components and erythrocyte membrane.

Одним из факторов повреждения эритроцитов при охлаждении и замораживании является изменение величины *pH* внеклеточного раствора при вымораживании свободной воды [1, 11]. От значения *pH* среды инкубации зависят состояние липидного бислоя и белков плазматической мембраны [1, 2, 11], а также величина трансмембранного потенциала клеток [9]. Однако механизм действия *pH* на компоненты мембраны и белки цитозоля остается до конца не раскрытым. Цель работы — изучение реактивности эритроцитов, в частности объемных изменений этих клеток, при их взаимодействии с ПЯ в присутствии ХПМ и без него в зависимости от величины *pH* внеклеточного раствора. Использование специфических модификаторов мембраны позволяет выявить некоторые особенности влияния *pH* на эритроцитарную мембрану и клетку в целом, а также получить дополнительную информацию о механизме действия факторов, индуцирующих появление в мембране трансмембранной поры.

The change of *pH* value of an extracellular solution during free water freezing-out is one of damaging factors during cooling and freezing [11]. The state of a lipid bilayer and plasmatic membrane proteins, as well as the value of transmembrane cell potential, depends on *pH* value of an incubation medium [1, 2, 11]. However, the mechanism of *pH* effect on membrane components and cytosol proteins has remained insufficiently investigated. The aim of given work is to study erythrocyte reactivity, in particular, volumetric changes of these cells during their interaction with BV in the presense of CPM and without it depending on the *pH* value of an extracellular solution. The usage of specific membrane modifiers allow to reveal some peculiarities of *pH* effect on an erythrocyte membrane and cell in a whole, as well as to obtain an additional information about the mechanism of the effect of factors, inducing the appearance of transmembrane pore in a membrane.

Donor's blood of the II group was used in the work. Erythrocytes were washed-out in the physiological



В работе использовали донорскую кровь группы II. Эритроциты отмывали в физиологическом растворе (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4) 3-кратным центрифугированием (3 000g, 3 мин). Надосадок и слой лейкоцитов удаляли методом аспирации. Полученный осадок (30 мкл) разводили в 0,5 мл физиологического раствора и использовали как сток-суспензию в течение нескольких часов. Хлорпромазин фирмы "Calbiochem" (США), HEPES фирмы "Sigma" (США), остальные реактивы квалификации ЧДА. Эксперименты проводили при температуре 22–24 °C.

Объемные изменения эритроцитов регистрировали методом спектроскопии импульсов сопротивления [6]. Аликвоты клеток добавляли в физиологический раствор (2 мл), содержащий необходимую концентрацию ПЯ или ПЯ + ХПМ. Концентрация клеток в растворе была  $\sim 10^6$  кл/мл. Как эталон использовали эритроциты, сферулированные лизолецитином и зафиксированные глutarовым альдегидом (1%).

Из рис. 1 видно, что объем нативных клеток практически не изменяется в интервале pH 5,5–8,5 и незначительно уменьшается при крайних значениях данного показателя (кривая 1). Однако объемное поведение эритроцитов, которые находились в контакте с ПЯ, сильно зависит от величины pH среды. Если при низких значениях pH (3,0–4,0) происходило набухание теней эритроцитов, то объем теней в условиях высоких pH (10,0–11,0) был более чем в 2 раза меньшим по сравнению с объемом контрольных, то есть теней эритроцитов, которые взаимодействовали с ПЯ при pH 7,4. Следует отметить, что эквilibрация нативных клеток в средах с pH 2,0 и 12,0–13,0 при отсутствии ПЯ приводила к их быстрому разрушению в течение 1 мин. Очевидно, это обусловлено дезинтеграцией мембраны, вызванной нарушениями электростатических взаимодействий между ее компонентами, а также снижением или увеличением вязкости геля, образованного белками цитоскелета [1, 3].

Видно, что изменения на кривой 2 (рис. 1), отражающей объемное поведение эритроцитов при их взаимодействии с ПЯ в исследуемом диапазоне pH, носят скачкообразный характер с резкими переходами при pH 4,0, 6,5 и 9,0. Подобный профиль кривой может свидетельствовать о критичес-

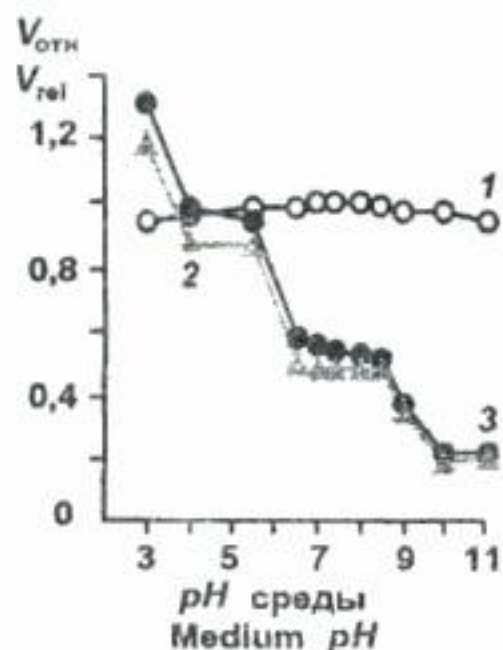


Рис. 1. Зависимость изменения объема эритроцитов, индуцированного ПЯ (2,5 мкг/мл), от pH экспериментальной среды (0,15 M NaCl): 1 – нативные клетки; 2 – через 5 мин; 3 – на 20-й минуте.

Fig. 1. Dependence of the erythrocyte volume change, induced by BV (2.5 µg/ml) on the pH value in an experimental medium (0.15 M): 1 – native cells; 2 – in 5 min; 3 – to the 20th min.

solution (150 mM of NaCl, 10 mM of HEPES, pH 7.4) by means of thresh-hold centrifugation (3 000g, 3 min). Supernatant and leucocyte layer were removed by means of the aspiration method. The obtained sediment (30 µl) was diluted in 0.5 ml of the physiological solution and used as a stock-suspension within some hrs.

Chlorpromazine is produced by the "Calbiochem" firm (USA), HEPES is produced by "Sigma" (USA), qualification of other reagents is pure for analysis. Experiments were conducted within the temperature of 22–24 °C.

Volumetric erythrocyte changes were recorded by means of resistance impulse spectroscopy [6]. Cell aliquotes were added to physiological solution (2 ml), containing necessary BV concentration or BV + CPM. Cell concentration in the solution was  $\sim 10^6$  cells/ml. Erythrocytes, spherulated by lysolecithin and fixed by glutar aldehyde (1%) were used as standard ones.

The Figure 1 shows, that the volume of native cells practically does not change in the pH range of 5.5–8.5 and insufficiently decreases at terminal values of the given index (curve 1). However, volumetric behaviour of erythrocytes, being in the contact with BV, considerably depends on the value of pH medium. If the swelling of erythrocyte ghosts occurred at low pH values (3.4–4.0), then ghost volume under the conditions of high pH (10.0–11.0) was more than twice lower in comparison with the volume of control ones, that is erythrocyte ghosts, being interacted with BV at pH 7.4.

It should be noted, that equilibration of native cells in the media with pH 2.0 and 12.0–13.0 resulted in their rapid damage within 1 min. Apparently, it is conditioned by membrane desintegration, caused by damages of electrostatic interactions between its components, as well as the decrease or augmentation of gel viscosity, being formed by cytoskeleton proteins [1, 3].

It is obvious, that the changes in the curve 2 (Fig. 1), reflecting volumetric erythrocyte behaviour during their interaction with BV in the studied pH range, have a skip-like character with sharp transitions within pH 4.0, 6.5 and 9.0. Such a curve profile may testify to critical structural rearrangements of an erythrocyte membrane in the given points. Within the following 15 min after a full shrinkage, a partial recovery of ghost volume (curve 3) occurs. Thereat in the pH range of 3.0–6.5 ghost swelling is twice bigger in comparison with the control cells (pH 7.4), where as in the pH range of 9.0–11.0 it is less in 2 times.

The presense of CPM (25 µM) in an experimental medium considerably does not change the curve character of erythrocyte interaction with BV (Fig. 2, curve 1). But pH-dependence of this agent effect allows to find 3 regions: in the range of pH values of 3.0–6.5 CPM increases erythrocyte volume in comparison with the control (Fig. 2, curve 2); in the pH range of 7.0–9.0 CPM does not affect volumetric



ких структурных перестройках мембраны эритроцитов в данных точках. В течение последующих 15 мин после полного сжатия происходит частичное восстановление объема теней (кривая 3). При этом в интервале  $pH$  3,0–6,5 набухание теней в 2 раза больше по сравнению с контрольными клетками ( $pH$  7,4), тогда как в области  $pH$  9,0–11,0 — в 2 раза меньше.

Присутствие ХПМ (25 мкМ) в экспериментальной среде существенно не изменяет характера кривой взаимодействия эритроцитов с ПЯ (рис. 2, кривая 1). Однако  $pH$ -зависимость влияния этого агента позволяет выделить 3 области: в интервале значений  $pH$  3,0–6,5 ХПМ увеличивает объем эритроцитов по сравнению с контролем (рис. 2, кривая 2); при  $pH$  7,0–9,0 ХПМ не влияет на объемные изменения, вызванные ПЯ; в области  $pH$  10,0–11,0 наблюдается защитное действие данного агента на клетки. Кроме того, в интервале  $pH$  3,0–7,0 происходит значительное восстановление объема теней эритроцитов в течение 15 мин (рис. 2, кривая 2), в то время как при  $pH$  7,4–11,0 набухание эритроцитов практически не регистрировалось. Таким образом, видно, что эффект влияния ПЯ на эритроциты человека зависит от величины  $pH$  экспериментальной среды.

Известно, что изменение  $pH$  среды влечет за собой изменение трансмембранного потенциала эритроцитов [2], происходит нарушение плотности упаковки липидов, что приводит к их фазовому разделению в плоскости бислоя. Снижение  $pH$  внеклеточной среды вызывает уменьшение отрицательного заряда эритроцитарной мембраны; при критической концентрации водородных ионов может произойти полная нейтрализация поверхностного заряда биополимеров или надмолекулярных структур [1, 11]. Показано, что основные компоненты ПЯ — литический пептид мелиттин и фосфолипаза  $A_2$  (ФА<sub>2</sub>) — характеризуются разными эффектами: мелиттин вызывает лизис и увеличение объема эритроцитов, характерное для коллоидно-осмотического гемолиза, а фосфолипаза, субстратом которой являются отрицательно заряженные бислои [7], не обладает гемолитической активностью и способностью уменьшать объем клеток [5]. В то же время, действуя в синергизме, эти компоненты индуцируют уменьшение объема (сжатие) теней прогемолизировавших эритроцитов так же, как и цельный ПЯ [5]. Мелиттин может взаимодействовать как с липидными компонентами мембраны [8], так и с белковыми [10]. При снижении  $pH$  внеклеточной среды, когда происходит уменьшение трансмембранного потенциала эритроцитов, реализуется в основном эффект мелиттина, молекулы которого, внедряясь в бислой, образуют поры, нарушая при этом барьерно-транспортную функцию мембраны, что приводит к набуханию теней. Фазовое разделение липидов, которое облегчает встраивание молекул мелиттина на

changes, caused by BV; in the  $pH$  range of 10.0–11.0 a protective effect of the given agent on cells is observed. Besides this, in the  $pH$  range of 3.0–7.0 a considerable recovery of the erythrocyte ghost volume occurs within 15 min (Fig. 2, curve 2), whereas in the range of  $pH$  7.4–11.0 erythrocyte swelling practically was not recorded. Thus, it is seen, that the effect of BV influence on human erythrocytes depends on the  $pH$  value of an experimental medium.

It is known, that the change of  $pH$  medium involves the change of transmembrane erythrocyte potential [2], thereat the damage of a lipid packing density occurred, that results in their phase division in the bilayer plane.

The decrease of an extracellular medium provokes a decrease of a negative charge in an erythrocyte membrane; at a critical concentration of hydrogenous ions a full neutralization of a surficial charge in biopolymers or supramolecular structures may occur [1,11]. It has been shown, that the main BV components — lytic peptide melittin and  $A_2$  phospholipase (PA<sub>2</sub>) are characterized by different effects: melittin causes a lysis and an increase of erythrocyte volume, that is characteristic for colloid and osmotic hemolysis, and phospholipase, whose the substrate of which are negatively charged bilayers [7], does not possess a hemolytic activity and ability to decrease a cellular volume [5]. At the same time, affecting in a synergism, these components induce the volume decrease (shrinkage) in ghosts of hemolysed erythrocytes, as well as a whole BV [5]. Melittin may interact both with membrane lipid components [8] and protein ones [10]. At  $pH$  decrease of an extracellular medium, when erythrocyte transmembrane potential reduction occurs, mainly the melittin effect is realized, the molecules of which, by introducing into the bilayer, form pores, damaging by this the membrane barrier and transport function,

what results in the ghost swelling. The lipid phase division, facilitating the melittin molecule building on the limit of phase division, increases the effect of the given agent under the studied conditions. CPM presence in an experimental medium promotes to an increase of ghost swelling, induced by BV. CPM may accelerate in high concentrations at the limit of phase

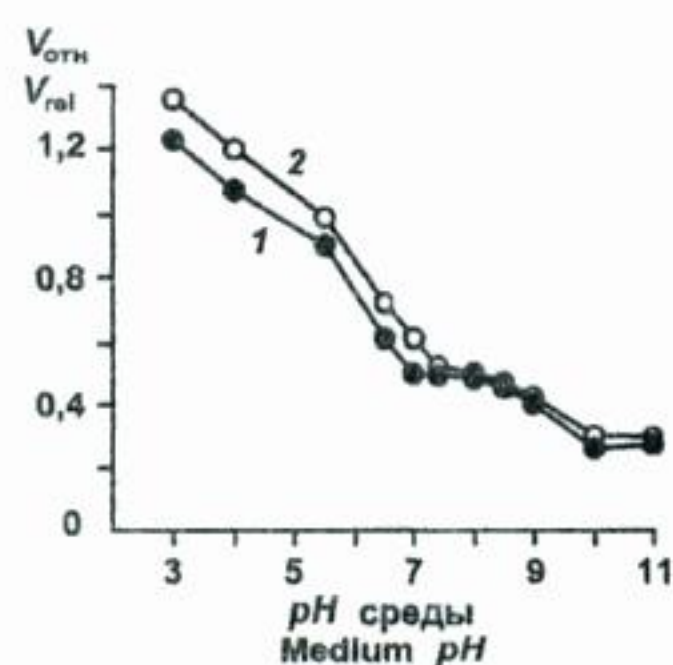


Рис. 2. Влияние хлорпромазина (25 мкМ) на изменение объема эритроцитов, индуцированное ПЯ (2,5 мкг/мл) в средах NaCl (0,15 М) с различным  $pH$ : 1 — через 15 мин; 2 — на 20-й минуте.

Fig. 2. Chlorpromazine effect (25 μM) on the erythrocyte volume change, induced by BV (2.5 μg/ml) in NaCl media (0.15 M) with different  $pH$  value: 1 — in 15 min; 2 — to the 20th min.



границе раздела фаз, усиливает действие данного агента в исследуемых условиях. Присутствие ХПМ в экспериментальной среде способствует увеличению набухания теней, индуцированного ПЯ. ХПМ может накапливаться в больших концентрациях на границе раздела фаз [4], что является дополнительным дестабилизирующим фактором при действии ПЯ. В области значений  $pH$  3,0–7,0 (рис. 1, 2) происходит более выраженное восстановление объема теней эритроцитов в течение последующих 15 мин после контакта клеток с ядом по сравнению с физиологическими условиями. Это может быть обусловлено нарушением взаимодействий цитоскелет-мембрана вследствие значительной деформации клеток, вызванной солюбилизацией и агрегацией мембранных белков, а также кластеризацией белков и мембранных липидов [1–3]. Кроме того, известно, что инкубация клеток при кислых значениях  $pH$  (4,0–5,0) может приводить к формированию поперечных сшивок мембранных белков из-за окисления их SH-групп и уменьшению микровязкости внутриклеточных белков [1], что также дестабилизирует мембрану. В результате изменения стабилизирующего влияния белков цитоскелета в критических условиях происходит значительное растяжение мембраны вплоть до ее разрыва. В то же время увеличение сжатия теней эритроцитов в области  $pH$  8,0–11,0 по сравнению с физиологическими условиями может быть обусловлено повышением микровязкости внутриклеточных белков [1, 3], которое усиливается при действии  $pH$ , что влияет на объемные изменения клеток. Отсутствие видимого восстановления объема клеток в течение 15 мин после контакта их с ядом также может объясняться указанными причинами. Защитное влияние ХПМ, молекулы которого имеют положительный заряд, в области  $pH$  9,0–11,0 обуславливается частичной нейтрализацией заряда мембраны, что облегчает пространственное взаимодействие компонентов мембраны и цитоскелета.

Полученные результаты показывают, что эритроциты человека сохраняют определенную стабильность в довольно узких пределах  $pH$  (7,0–8,0) относительно физиологического значения. Отклонение  $pH$  в ту или иную сторону вызывает глубокие нарушения состояния мембранных компонентов и цитозольных структур. При этом обнаруживается несколько критических точек, вблизи которых изменения состояния клеточных структур отражаются на поведении эритроцитов при контакте с таким биологическим модификатором, как пчелиный яд. Кроме того, полученные данные указывают, что эффект уменьшения объема, характерный для ПЯ, определяется электростатическими взаимодействиями между компонентами ПЯ и эритроцитарной мембраны. Защитное действие ХПМ при этом может иметь ту же основу, что и в условиях осмотического и температурного шока.

division [4], that is an additional destabilizing effect during BV action. In the  $pH$  values range of 3.0–7.0 (Fig. 2), more manifested recovery of erythrocyte ghost volume occurs during the following 15 min after a cell contact with BV in comparison with physiological conditions. This fact may be conditioned by the damage of cytoskeleton-membrane interactions due to a considerable cell deformation, caused by solubilization and membrane protein aggregation, as well as protein clasterization and membrane lipids [1–3]. Besides this, it is known, that cell incubation at acid  $pH$  values (4.0–5.0) may result in the formation of membrane protein cross-linkings due to oxidation of their SH-groups and a decrease extracellular protein microviscosity [1], that also destabilizes the membrane. A considerable membrane extension up to its break occurs in the result of the change of a cytoskeleton protein stabilizing effect under critical conditions. At the same time an increase of erythrocytes' ghost shrinkage in the  $pH$  range of 8.0–11.0 in comparison with physiological conditions may be stipulated by the microviscosity augmentation in extracellular proteins [1, 3], which accelerates during the  $pH$  effect, that affects cellular volumetric changes. The absence a visual cell volume recovery during 15 min after their contact with BV also may be explained by the mentioned causes. CPM protective effect, whose molecules have a positive charge, in the  $pH$  range 9.0–11.0 is conditioned by a particular neutralization in the membrane charge, that facilitates a spatial interaction between membrane and cytoskeleton components.

The obtained results demonstrate, that human erythrocytes keep a certain stability with quite low  $pH$  limits (7.0–8.0) in respect of to physiological value.  $pH$  deviation in one or another side results in deep damages in the state of membrane components and cytosol structures. Thereat some critical points, close to which the changes in the state of cellular structures reflected on erythrocyte behaviour during the contact with such a biological modifactor, as bee venom are revealed. Besides this, the obtained data testify, that the effect of a volume decrease, that is characteristic for BV, is determined by electrostatic interactions between BV components and erythrocyte membrane. Thereat a CPM protective effect may have the same base as under the conditions of osmotic and temperature shock.

## REFERENCES

1. Belous A. M., Grischenko V. I. Cryobiology. — Kiev: Naukova Dumka, 1994. — 431 p.
2. Belous A. M., Bondarenko V. A. Structural change of biological membranes during cooling. — Kiev: Naukova Dumka, 1982. — 255 p.
3. Buzhurina I. M., Panov M. A. Mechanisms of cellular response formation on outer effects // VINITI scientific and technological review. General problems of physico-chemical biology. — M., 1986. — V. 3. — 258 p.
4. Vorobey A. V. Investigation of structural rearrangements in erythrocyte membranes, induced by the temperature and



## ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Кробиология.— Киев: Наук. думка, 1994.— 431 с.
2. Белоус А. М., Бондаренко В. А. Структурное изменение биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1982.— 255 с.
3. Бужурина И. М., Панов М. А. Механизмы формирования клеточного ответа на внешние воздействия // Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии.— М.: ВИНТИ, 1986.— Т. 3.— 258 с.
4. Воробей А. В. Исследование структурных перестроек эритроцитарных мембран, индуцированных действием температуры и анестетиков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Минск, 1978.— 24 с.
5. Руденко С. В., Семенченко А. Ю. Изменение объема эритроцитов и спектра мембранных белков, индуцированное мелиттином,  $FA_2$  и пчелиным ядом // Биохимия.— 1995.— 60, № 5.— С. 734–744.
6. Akeson S. P., Mel H. C. Deformability and other rheological interactions of red blood cells in electronic cell sizing // Biorheology.— 1986.— 23, № 1.— P. 1–15.
7. Berg O. G., Zhu B. Z., Rogers J., Jain M. K. Interfacial catalysis by phospholipase  $A_2$ : determination of the interfacial kinetic rate constants // Biochemistry.— 1991.— V. 30.— P. 1283–1291.
8. Dempsey C., Sternberg B. Reversible disc — micellization of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers induced by melittin and [Ala-14]melittin // Biochim. Biophys. Acta.— 1991.— 1061, № 2.— P. 175–184.
9. Funder F. M., Wieth I. O. Chloride and hydrogen ion distribution between human red cells and plasma // Acta Physiol. Scand.— 1968.— V. 60.— P. 234–245.
10. Hui S. W., Stewart C. M., Cherry R. J. Electron microscopic observation of the aggregation of membrane proteins in human erythrocyte by melittin // Biochim. Biophys. Acta.— 1990.— 1023, № 7.— P. 335–340.
11. Lovelock J. B. The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // Biochim. Biophys. Acta.— 1953.— V. 10, № 1.— P. 414–426.
- esthetic effect: Author's thesis abstract, PhD (biology).— Minsk, 1978.— 24 p.
5. Rudenko S. V., Semchenko A. Yu. The change of erythrocyte volume and membrane protein spectra, induced by melittin  $PA_2$  and bee venom // Biokhimiya.— 1995.— 60, № 5.— P. 734–744.
6. Akeson S. P., Mel H. C. Deformability and other rheological interactions of red blood cells in electronic cell sizing // Biorheology.— 1986.— 23, № 1.— P. 1–15.
7. Berg O. G., Zhu B. Z., Rogers J., Jain M. K. Interfacial catalysis by phospholipase  $A_2$ : determination of the interfacial kinetic rate constants // Biochemistry.— 1991.— V. 30.— P. 1283–1291.
8. Dempsey C., Sternberg B. Reversible disc — micellization of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers induced by melittin and [Ala-14]melittin // Biochim. Biophys. Acta.— 1991.— 1061, № 2.— P. 175–184.
9. Funder F. M., Wieth I. O. Chloride and hydrogen ion distribution between human red cells and plasma // Acta Physiol. Scand.— 1968.— V. 60.— P. 234–245.
10. Hui S. W., Stewart C. M., Cherry R. J. Electron microscopic observation of the aggregation of membrane proteins in human erythrocyte by melittin // Biochim. Biophys. Acta.— 1990.— 1023, № 7.— P. 335–340.
11. Lovelock J. B. The hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing // Biochim. Biophys. Acta.— 1953.— V. 10, № 1.— P. 414–426.

Accepted in 25.02.99

Поступила 25.02.99

This One



CLLH-EOL-AOGR



# **Влияние кофеина и пентоксифиллина на гликолитическую функцию спермиев человека, криоконсервированных в условиях сверхбыстрых скоростей охлаждения**

**Н. А. ЛУЧКО, И. Н. КУЧКОВ**

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

## **Caffeine and Pentoxifylline Effect on Glycolytic Function of Human Spermatozoa Cryopreserved under Conditions of Ultrarapid Cooling Rates**

**N. A. LUCHKO, I. N. KUCHKOV**

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

Исследовано содержание фруктозы и фруктолиз в нативных и криоконсервированных спермиях человека при действии кофеина и пентоксифиллина. Обнаружено различие в содержании фруктозы при нормоспермии и астеноспермии. Показано, что клетки при астеноспермии подвержены стимулирующему действию метилксантинов в большей степени после криоконсервации, чем в нативном состоянии. Сравниваются данные фруктолиза в спермиях до и после криоконсервации и инкубации в растворах биостимуляторов. Обсуждаются возможные причины полученных различий в ответе спермиев на стимулирующее действие метилксантинов.

Досліджено вміст фруктози і фруктолізу в нативних і криоконсервованих сперміях людини при дії кофеїну та пентоксифіліну. Виявлена відмінність щодо змісту фруктози при нормоспермії і астеноспермії. Показано, що клітини при астеноспермії здатні до стимуляції метилксантинами в більшій мірі після криоконсервації, ніж у нативному стані. Порівнюються дані фруктолізу в сперміях до і після криоконсервації та інкубації в розчинах біостимуляторів. Обговорюються можливі причини отриманих відмінностей у відповіді спермій на стимулюючу дію метилксантинів.

Fructose and fructolysis content in native and cryopreserved human spermatozoa under caffeine and pentoxifylline effect were investigated. The distinction in fructose content at normospermia and asthenospermia was revealed. It has been shown, that the cells at asthenospermia are subjected to a stimulating effect of methylxantines after cryopreservation in a greater extent, than in a native state. The fructolysis data in spermatozoa before and after cryopreservation and incubation in the solutions of biostimulators are compared. The possible reasons of the obtained distinctions in the response of spermatozoa to a stimulating effect of methylxantines are discussed.

Эффективность искусственной инсеминации криоконсервированной спермой во многом зависит от степени восстановления морфофункциональных свойств клеток после отогрева, под которыми следует понимать сохранность акросомального аппарата, а также такой уровень метаболизма, который обеспечит спермию высокую подвижность. Известно, что процесс криоконсервации приводит к снижению как подвижности, так и оплодотворяющей способности спермиев [15, 17], а это может происходить вследствие нарушения целостности цитоплазматических и митохондриальных мембран [6] и/или снижения метаболического статуса замороженно-оттаянных клеток [10], потери активности акрозина из-за разрушения акросомы [1].

Цель исследований — изучение содержания фруктозы в эякуляте и динамики её утилизации нативными и криоконсервированными спермиями человека в норме и при астеноспермии, при их инкубировании в растворах кофеина и пентоксифиллина (ПФ). Актуальность данных исследований очевидна в связи с возможностью применения

The efficiency of an artificial insemination with a cryopreserved sperm depends in a greater extent on a recovery degree of morphofunctional properties of cells after warming, that should be considered as the integrity of an acrosomal apparatus, as well as such a metabolism level, that will provide a high sperm motility. It is of common knowledge, that the cryopreservation process results in a decrease of both motility and a fertilizing ability of spermatozoa [15,17], but it may occur due to an impairment of the integrity of cytoplasmatic and mitochondrial membranes [6] and/or a metabolic status reduction of frozen-thawed cells [10], a loss of acrosine activity due to an acrosome destruction [1].

The aim of the investigations is to study the fructose content in an ejaculate and the dynamics of its utilisation by native and cryopreserved human spermatozoa in the norm and at asthenospermia, during their incubation in caffeine and pentoxifylline solutions (PF). The actuality of the given investigations is obvious due to the application possibility of the way of human spermatozoa cryopreservation under ul-



способа криоконсервации спермиев человека при сверхвысоких (3 000 – 5 000 К/мин) скоростях охлаждения для создания криобанков патоспермических гамет.)

Объектом исследований служила сперма доноров, полученная мастурбацией после трехдневного полового воздержания. Всего было исследовано 12 эякулятов при нормоспермии и 12 астеноспермических образцов. Эякуляты после 30-минутного разжижения в термостате при 37 °С имели концентрацию клеток больше  $20 \cdot 10^6$ /мл, подвижных форм для нормоспермии больше 60%, для астеноспермии не более 40%. Криоконсервацию спермиев осуществляли сверхбыстрым охлаждением в контейнерах из пищевой алюминиевой фольги согласно методу [5]. Отогревали на водяной бане при температуре 41 °С. После отогрева к образцам добавляли кофеин в конечной концентрации 6 мМ или ПФ в концентрации 3,5 мМ [9] и инкубировали в термостате при 37 °С. Подвижность спермиев оценивали в течение 0, 60 и 120 мин. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева.

Содержание фруктозы определяли по методу Рое [4], в основе которого лежит колориметрическое измерение изменения окраски исследуемого раствора в реакции Селиванова на фруктозу с резорцином в кислой среде. Для этого к 0,1 мл эякулята в пробирке добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, после их смешивания к пробе последовательно добавляли 2 мл 0,5 М раствора сернокислого цинка и 2 мл 0,5 М NaOH. Смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин, а затем центрифугировали 5 мин при 300g. К 2 мл прозрачного безбелкового экстракта добавляли 2 мл 0,1%-го раствора резорцина и 6 мл 30%-й HCl. Полученную смесь нагревали на водяной бане при температуре 80–85 °С в течение 10 мин, после чего быстро охлаждали под проточной водой. Интенсивность окраски измеряли на фотоэлектроколориметре ( $\lambda = 520$  нм). Содержание фруктозы определяли по калибровочной кривой, построенной с помощью исследований стандартных разведений 1 М раствора фруктозы. Фруктолиз вычисляли по разности начальных и конечных значений количества фруктозы, полученного через 1 и 2 ч инкубации. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера.

В ходе исследований установлены отличия ( $P < 0,05$ ) в содержании фруктозы в семенной плазме при нормоспермии  $15,0 \pm 0,3$  мМ и астеноспермии  $10,5 \pm 0,4$  мМ. Сам факт низкого содержания фруктозы в эякуляте может свидетельствовать об андрогенной гипофункции семенников, но недостаточен для суждения о функциональной активности спермиев [2].

Результаты исследований, представленные в таблице, показывают, что наибольшее потребление фруктозы нативными спермиями в норме и при

trarapid (3 000 – 5 000 К/мин) cooling rates for the pathospermal gametes cryobanks creation.

The investigation object was the donors' sperm, obtained by masturbation after a 3-days sexual abstinence. In the whole, 12 ejaculates at normospermia and 12 asthenospermial samples were investigated. Ejaculates after a 30-min liquefaction in a thermostat at 37 °С had the concentration of cells higher than  $20 \cdot 10^6$ /ml, motile forms for normospermia more than 60%, for asthenospermia not more than 40%. Spermatozoa cryopreservation was accomplished using ultrarapid cooling in food aluminium foil containers, according to the method [5]. Thawing was carried out at a water bath at the temperature of 41 °С. After warming one immediately added caffeine in a final concentration of 6 mM or PF in a final concentration of 3.5 mM [9] and incubated in a thermostat at 37 °С. Spermatozoa motility was estimated within 0; 60 and 120 min. Cell concentration was calculated in the Goryaev's chamber.

Fructose content was determined according to the Roe's method [4], where colorimetric measurement of the staining change of the studied solution in the Selivanov's reaction on fructose with resorcin in an acidic medium is in its base. For this aim to 0.1 ml of ejaculate in a vial 0.9 ml of a distilled water was added, after their mixing one successively added to the sample 2 ml of 0.5 M of zinc sulphate solution and 2 ml of 0.5 M of NaOH. The mixture was heated at a boiling resorcin water bath within 5 min, then centrifuged during 5 min at 300g. To 2 ml of transparent protein-free extraction one added 2 ml of 0.1%-solution of resorcin and 6 ml of 30%-HCl. The mixture obtained was heated at a water bath at the temperature of 80–85 °С during 10 min, after that was rapidly cooled in a running water. The staining intensity was measured by means of photoelectrocolorimeter ( $\lambda = 520$  nm). Fructose content was determined according to a standard curve, plotted by means of the investigations of standard dilutions of 1 M of fructose solution. Fructolysis was calculated according to the difference of initial and final values of fructose quantity, obtained in 1 and 2 hours of incubation. A statistical proceeding of the results was done according to the Student–Fisher method.

The differences ( $P < 0.05$ ) in fructose content in a semen plasm at normospermia  $15.0 \pm 0.3$  mM and  $10.5 \pm 0.4$  mM at asthenospermia were established during the investigations. The fact itself of fructose low content in an ejaculate can testify to an androgenic hypofunction of testes, but is not sufficient for judging on spermatozoa functional activity [2].

The results of the investigations, presented in the Table, demonstrate, that the most fructose consumption by native spermatozoa in the norm and at asthenospermia occurred in the first hour of incubation. After cryopreservation the fructose number in an ejaculate did not change, because the matabolic processes in frozen spermatozoa were stopped, but its con-



Динамика утилизации фруктозы нормальными и астеническими спермиями человека, криоконсервированными в условиях сверхбыстрых (3 000 – 5 000 К/мин) скоростей охлаждения ( $n = 6$ ).

| Объект исследования                           | Содержание фруктозы, мМ |            |            |            |
|-----------------------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|
|                                               | Начальная               | Фруктолиз, | Начальная  | Фруктолиз, |
|                                               | Через 1 ч               | мМ/ч       | Через 2 ч  | мМ/ч       |
| Нативная суспензия клеток (нормоспермия)      | 15,0 ± 0,3              | 2,4 ± 0,1  | 12,6 ± 0,5 | 1,6 ± 0,1  |
| Кофеин 6 мМ                                   | 12,6 ± 0,5 <sup>1</sup> |            | 10,9 ± 0,5 |            |
| ПФ 3,5 мМ                                     | 15,0 ± 0,3              | 2,9 ± 0,1  | 12,0 ± 0,3 | 2,1 ± 0,1  |
|                                               | 12,0 ± 0,3              |            | 9,4 ± 0,5  |            |
| Астеноспермия                                 | 15,0 ± 0,3              | 4,6 ± 0,1  | 10,3 ± 0,3 | 1,7 ± 0,1  |
|                                               | 10,3 ± 0,3 <sup>1</sup> |            | 8,6 ± 0,3  |            |
| Кофеин 6 мМ                                   | 10,5 ± 0,4 <sup>1</sup> | 2,1 ± 0,1  | 8,3 ± 0,3  | 1,8 ± 0,1  |
|                                               | 8,3 ± 0,3 <sup>2</sup>  |            | 6,5 ± 0,3  |            |
| ПФ 3,5 мМ                                     | 10,5 ± 0,4              | 2,9 ± 0,1  | 7,6 ± 0,3  | 1,4 ± 0,1  |
|                                               | 7,6 ± 0,3 <sup>2</sup>  |            | 6,1 ± 0,3  |            |
| Криоконсервированная суспензия (нормоспермия) | 10,5 ± 0,4              | 3,9 ± 0,1  | 6,5 ± 0,4  | 1,4 ± 0,1  |
|                                               | 6,5 ± 0,3 <sup>2</sup>  |            | 5,1 ± 0,4  |            |
| Кофеин 6 мМ                                   | 14,9 ± 0,3              | 2,0 ± 0,1  | 12,8 ± 0,2 | 1,4 ± 0,1  |
|                                               | 12,8 ± 0,2 <sup>3</sup> |            | 9,9 ± 0,2  |            |
| ПФ 3,5 мМ                                     | 14,9 ± 0,3              | 2,7 ± 0,1  | 14,9 ± 0,3 | 2,6 ± 0,1  |
|                                               | 12,2 ± 0,2 <sup>3</sup> |            | 9,6 ± 0,3  |            |
| Астеноспермия                                 | 14,9 ± 0,3              | 3,6 ± 0,1  | 11,2 ± 0,3 | 2,5 ± 0,1  |
|                                               | 11,2 ± 0,3 <sup>3</sup> |            | 8,7 ± 0,3  |            |
| Кофеин 6 мМ                                   | 10,5 ± 0,3 <sup>3</sup> | 1,9 ± 0,1  | 8,6 ± 0,4  | 1,8 ± 0,1  |
|                                               | 8,6 ± 0,4 <sup>4</sup>  |            | 6,7 ± 0,3  |            |
| ПФ 3,5 мМ                                     | 10,5 ± 0,3              | 2,8 ± 0,1  | 7,7 ± 0,3  | 2,1 ± 0,1  |
|                                               | 7,7 ± 0,3 <sup>4</sup>  |            | 5,5 ± 0,3  |            |
|                                               | 10,5 ± 0,3              | 3,5 ± 0,1  | 7,0 ± 0,2  | 3,4 ± 0,1  |
|                                               | 7,0 ± 0,2 <sup>4</sup>  |            | 3,6 ± 0,3  |            |

**Примечание.** Различия достоверны ( $P < 0,05$ ) по отношению: 1 — к нативной суспензии при нормоспермии; 2 — нативной суспензии при астеноспермии; 3 — криоконсервированной суспензии при нормоспермии; 4 — криоконсервированной суспензии при астеноспермии.

астеноспермии происходило в первый час инкубации. После криоконсервирования количество фруктозы в эякуляте не изменилось, так как обменные процессы в замороженных спермиях были остановлены, однако ее потребление снизилось только для нормоспермии, что, очевидно, обусловлено криодеструкцией аденозинтрифосфатаз плазматической мембраны клеток при замораживании, которые участвуют в транспорте сахаров, в том числе фруктозы внутрь спермия. Возможны нарушения структуры самих ферментов фруктолиза в результате замораживания-отогрева суспензии клеток.

Отмечается, что низкий уровень энергетического метаболизма как нативных, так и криоконсервированных спермиев может являться существенной причиной бесплодия у мужчин [12] и невозможности клинического использования отогретых клеточных суспензий. Последние исследования в области астеноспермии [16] указывают на детерминированный генетически морфологический дефект в ультраструктуре средней части клетки, заключающийся в укорочении шейки спермия. Данные сканирующей электронной микроскопии [13] свидетельствуют о низком содержании митохондриальных спиралей в клетках при этой патологии по сравнению с нормоспермией. Клетки при астеноспермии, имеющие изначально низкую подвижность, еще больше снижают ее после отогрева [3]. Клинически обо-

sumption decreased only for normospermia, that, obviously, was stipulated by adenosine triphosphatases cryodestruction of a plasmatic membrane of cells during freezing, which participated in sugars transport, including fructose into a spermatozoon. The structure impairments of fructolysis enzymes themselves as a result of freeze-thawing of cell suspension are probable.

It has been noted, that a low level of energetic metabolism of both native and cryopreserved spermatozoa can be significant causes of male infertility [12], and the impossibility of clinical usage of frozen-thawed cellular suspensions. The last investigations in the field of asthenospermia [16] point to a determined genetically morphological defect in the ultrastructure of a middle part of a cell, consisting in the shortening of a spermatozoon neck. The data of a scanning electron microscopy [13] testify to a low content of mitochondrial helixes in cells at this pathology in comparison with normospermia. Cells at asthenospermia, having an initially low motility, decrease in a greater extent it after thawing [3]. An increase in energetic

#### Dynamics of fructose utilisation by normal and asthenic human spermatozoa, cryopreserved under conditions of ultrarapid (3 000 – 5 000 K/min) cooling rates ( $n = 6$ )

| Investigation object                      | Fructose content, mM    |              |            |              |
|-------------------------------------------|-------------------------|--------------|------------|--------------|
|                                           | Initial                 | Fructolysis, | Initial    | Fructolysis, |
|                                           | In 1 hrs                | mM/hr        | In 2 hrs   | mM/hr        |
| Native suspension of cells (normospermia) | 15.0 ± 0.3              | 2.4 ± 0.1    | 12.6 ± 0.5 | 1.6 ± 0.1    |
|                                           | 12.6 ± 0.5 <sup>1</sup> |              | 10.9 ± 0.5 |              |
| Caffeine 6 mM                             | 15.0 ± 0.3              | 2.9 ± 0.1    | 12.0 ± 0.3 | 2.1 ± 0.1    |
|                                           | 12.0 ± 0.3              |              | 9.4 ± 0.5  |              |
| PF 3.5 mM                                 | 15.0 ± 0.3              | 4.6 ± 0.1    | 10.3 ± 0.3 | 1.7 ± 0.1    |
|                                           | 10.3 ± 0.3 <sup>1</sup> |              | 8.6 ± 0.3  |              |
| Asthenospermia                            | 10.5 ± 0.4 <sup>1</sup> | 2.1 ± 0.1    | 8.3 ± 0.3  | 1.8 ± 0.1    |
|                                           | 8.3 ± 0.3 <sup>2</sup>  |              | 6.5 ± 0.3  |              |
| Caffeine 6 mM                             | 10.5 ± 0.4              | 2.9 ± 0.1    | 7.6 ± 0.3  | 1.4 ± 0.1    |
|                                           | 7.6 ± 0.3 <sup>2</sup>  |              | 6.1 ± 0.3  |              |
| PF 3.5 mM                                 | 10.5 ± 0.4              | 3.9 ± 0.1    | 6.5 ± 0.4  | 1.4 ± 0.1    |
|                                           | 6.5 ± 0.3 <sup>2</sup>  |              | 5.1 ± 0.4  |              |
| Cryopreserved suspension (normospermia)   | 14.9 ± 0.3              | 2.0 ± 0.1    | 12.8 ± 0.2 | 1.4 ± 0.1    |
|                                           | 12.8 ± 0.2 <sup>3</sup> |              | 9.9 ± 0.2  |              |
| Caffeine 6 mM                             | 14.9 ± 0.3              | 2.7 ± 0.1    | 14.9 ± 0.3 | 2.6 ± 0.1    |
|                                           | 12.2 ± 0.2 <sup>3</sup> |              | 9.6 ± 0.3  |              |
| PF 3.5 mM                                 | 14.9 ± 0.3              | 3.6 ± 0.1    | 11.2 ± 0.3 | 2.5 ± 0.1    |
|                                           | 11.2 ± 0.3 <sup>3</sup> |              | 8.7 ± 0.3  |              |
| Asthenospermia                            | 10.5 ± 0.3 <sup>3</sup> | 1.9 ± 0.1    | 8.6 ± 0.4  | 1.8 ± 0.1    |
|                                           | 8.6 ± 0.4 <sup>4</sup>  |              | 6.7 ± 0.3  |              |
| Caffeine 6 mM                             | 10.5 ± 0.3              | 2.8 ± 0.1    | 7.7 ± 0.3  | 2.1 ± 0.1    |
|                                           | 7.7 ± 0.3 <sup>4</sup>  |              | 5.5 ± 0.3  |              |
| PF 3.5 mM                                 | 10.5 ± 0.3              | 3.5 ± 0.1    | 7.0 ± 0.2  | 3.4 ± 0.1    |
|                                           | 7.0 ± 0.2 <sup>4</sup>  |              | 3.6 ± 0.3  |              |

**Notes.** The differences are statistically significant ( $P < 0.05$ ) regarding to: 1 — a native suspension at normospermia; 2 — a native suspension at asthenospermia; 3 — a cryopreserved suspension at normospermia; 4 — a cryopreserved suspension at asthenospermia.



снованным является повышение энергетического статуса астенических спермиев, для чего часто используются различные стимуляторы подвижности, повышающие оплодотворяющую способность. В [8, 11] наибольшее внимание уделяется производным метилксантина.

(В результате проведенных исследований нами было определено, что инкубация нативных спермиев в растворе, содержащем кофеин в концентрации 6 мМ, показала статистически достоверное ( $P < 0,05$ ) увеличение фруктолиза при нормоспермии на 0,5 мМ/ч после первого часа инкубации и на 0,4 мМ/ч после второго по сравнению с суспензией клеток до стимуляции. Для астеноспермических образцов эта разность составила 0,7 и 0,4 мМ/ч после первого и второго часа инкубации соответственно ( $P < 0,05$ ). Таким образом, клетки при астеноспермии проявили большую чувствительность к стимуляции кофеином в течение первого часа инкубации, чем при нормоспермии. После отогрева увеличение фруктолиза при нормоспермии в первый час инкубации было 0,6 мМ/ч, что достоверно не отличается от такого же показателя для нативных образцов, в то время как для второго часа инкубации эта разница составила 1,2 мМ/ч ( $P < 0,05$ ), что почти в 3 раза больше по сравнению с нативной суспензией. Астеноспермические клетки после отогрева и стимуляции кофеином увеличивали фруктолиз на 0,9 мМ/ч после первого и на 0,3 мМ/ч после второго часа инкубации по сравнению с суспензией спермиев без кофеина, что соответствует данным изменения содержания фруктозы до замораживания при этой патологии ( $P < 0,05$ ). Таким образом, максимальный фруктолиз при стимуляции спермиев кофеином наблюдался в нативных образцах при астеноспермии в первый час инкубации и в нормоспермических образцах после отогрева, но во второй час инкубации (таблица). Следует отметить, что данные подвижности не отражают этих колебаний фруктолиза, показывая плавное снижение процента подвижных форм спермиев в течение всего периода эквilibрации (рис. 1). Это связано, надо полагать, с тем, что подвижность характеризует состояние общего метаболизма спермия, включая, кроме фруктолиза, процесс поглощения кислорода, функцию креатинфосфокиназной системы, направленность основных ионных градиентов, а также сохранность двигательного аппарата, поэтому может служить лишь для грубой оценки происходящих с клетками изменений. Но подверженность спермиев стимуляции метилксантинами после отогрева свидетельствует о функциональной целостности перечисленных систем, что позволяет сделать вывод о высокой эффективности способа сверхбыстрого охлаждения.

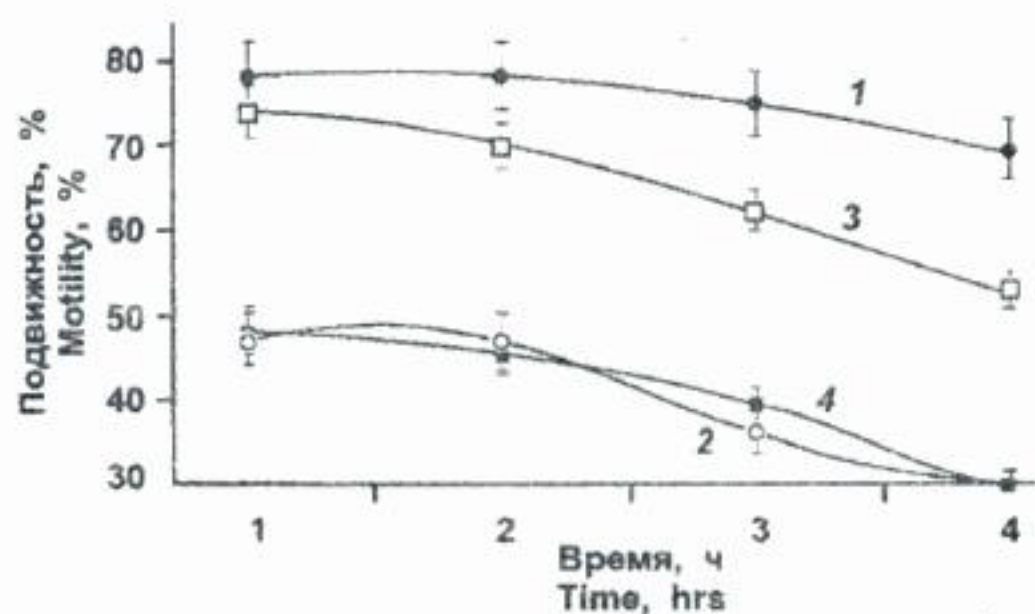
Aparicio [7] сообщил, что ПФ обладает более выраженным стимулирующим действием на спермии человека, чем кофеин. Дальнейшие исследования подтвердили эффективность ПФ как стимуля-

status of asthenic spermatozoa are clinically substantiated, for that the motility different stimulators, increasing a fertilizing ability, are used. In [8, 11] the greatest attention is paid to methylxantine derivatives.

As the result of the investigations conducted we have determined, that native spermatozoa incubation in the solution, containing caffeine in 6 mM concentration, demonstrated a statistically significant ( $P < 0.05$ ) increase in fructolysis at normospermia by 0.5 mM/hr after first hour of the incubation and by 0.4 M/hr after the second one, in comparison with cell suspension before the stimulation. For asthenospermical samples this difference made 0.7 and 0.4 M/hr after the first and second hour of the incubation correspondingly ( $P < 0.05$ ). Thus, cells at asthenospermia manifested a higher sensitivity to the stimulation by caffeine within the first hour of the incubation, than at normospermia. After warming the growth of fructolysis at normospermia in the first hour of incubation was 0.6 mM/hr, that did not significantly differ from the same index for native samples, meanwhile for the second hour of incubation this difference made 1.2 mM/hr ( $P < 0.05$ ), that was almost in 3 times higher in comparison with a native suspension. Asthenospermial cells after warming and stimulation by caffeine increased the fructolysis by 0.9 mM/hr after the first hour of incubation and by 0.3 mM/hr after the second one in comparison with spermatozoa suspension without caffeine, that corresponded to the data of the fructose content change before freezing at this pathology ( $P < 0.05$ ). Thus, a maximum fructolysis during spermatozoa stimulation by caffeine was observed in native samples at asthenospermia in the first hour of incubation and in normospermical samples after warming, but in the incubation second hour (Table). It should be noted, that the motility data do not reflect these fluctuations of fructolysis, showing a smooth reduction of spermatozoa motile from percentage during all equilibration period (Fig. 1). It is probably related to the fact, that the motility characterizes the state of a general metabolism of a spermatozoon, including, excepting the fructolysis, the oxygen absorption process, the function of a creatine phosphokinase system, the direction of main ion gradients, as well as the integrity of a motile apparatus. Therefore the spermatozoa estimation on the mobility can serve only for an approximate characteristics of the changes, occurring with cells. But the spermatozoa subjection to the stimulation by methylxantines after thawing testifies to a functional integrity of the mentioned systems, that allows to make a conclusion on a high efficiency of the ultrarapid cooling way.

Aparicio [7] has reported, that PF possesses a more manifested stimulating effect on human spermatozoa, than caffeine. The following investigations confirmed, the PF efficiency as the motility stimulator of cryopreserved spermatozoa [9,14]. Shen [18] have noted,





**Рис. 1.** Изменение подвижности спермиев человека, инкубированных в растворе 6 мМ кофеина: 1 — натив нормоспермия; 2 — натив астеноспермия; 3 — криоконсервированная суспензия при нормоспермии; 4 — криоконсервированная суспензия при астеноспермии.

**Fig. 1.** Motility change of human spermatozoa, incubated in 6 mM caffeine solution: 1 — native cell suspension at normospermia; 2 — native cell suspension at asthenospermia; 3 — cryopreserved suspension at normospermia; 4 — cryopreserved suspension at asthenospermia.

тора подвижности криоконсервированных спермиев [9, 14]. Shen [18] отметил, что ПФ увеличивал подвижность спермиев человека *in vitro* как в нормальных, так и в астеноспермических образцах.

Исследуя потребление фруктозы в присутствии 3,5 мМ ПФ, для нативных спермиев при нормоспермии мы нашли увеличение фруктолиза на 2,2 мМ/ч, для криоконсервированных на 1,6 мМ/ч в первый час инкубации ( $P < 0,05$ ) и на 0,05 мМ/ч и 1,1 мМ/ч после второго часа инкубации соответственно ( $P < 0,05$ ). Клетки при астеноспермии утилизировали фруктозу в нативном состоянии на 1,8 мМ/ч больше в первый час инкубации и на 1,5 мМ/ч после отогрева ( $P < 0,05$ ). После второго часа разность составила 0,4 мМ/ч для нативной суспензии и 1,6 мМ/ч для криоконсервированной ( $P < 0,05$ ).

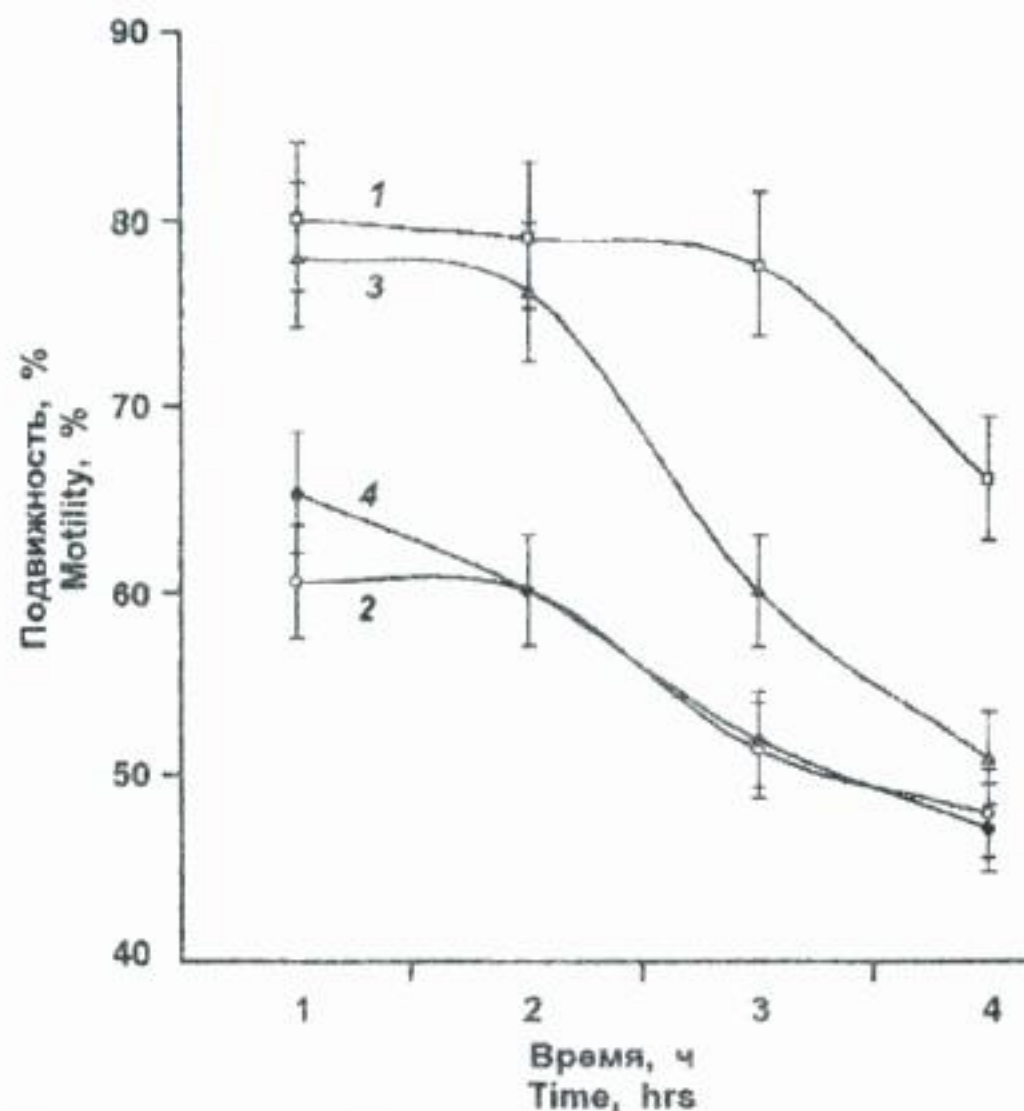
На основании полученных данных можно сделать вывод, что при стимуляции нативных спермиев ПФ резко увеличивалось потребление фруктозы в первый час инкубации для нормоспермии и астеноспермии, причем для нормоспермии эффект был более выражен. После криоконсервации фруктолиз в течение первого часа шёл равномерно для обеих исследуемых групп клеток. Сравнение данных утилизации фруктозы в течение второго часа для нативной суспензии показало достоверное снижение скорости распада сахара в норме и при патологии, в то время как после криоконсервации фруктолиз спермиями оставался на высоком уровне и его скорость была больше при астеноспермии, что согласуется с данными подвижности при этой патологии (рис. 2). Таким образом, ПФ поддерживал утилизацию фруктозы криоконсервированными спермиями в течение двух часов инкубации в отличие от нативных образцов, в которых к концу второго часа он снижался до уровня, соответствующего фруктолизу в нестимулированных клетках.

Следует отметить, что сочетание сверхвысоких скоростей охлаждения гамет и стимулирующего

that PF increased the motility of human spermatozoa *in vitro* both in normal and asthenospermial samples.

Investigating the fructose consumption in the presence of 3.5 mM of PF for native spermatozoa at normospermia we have found the growth of fructolysis by 2.2 mM/hr, for cryopreserved ones by 1.6 mM/hr in the first incubation hour ( $P < 0.05$ ) and by 0.05 mM/hr and 1.1 mM/hr after the second incubation hour, correspondingly ( $P < 0.05$ ). Cells at asthenospermia utilized fructose in a native state by 1.8 mM/hr more, than in the first hour of incubation and by 1.5 mM/hr after warming ( $P < 0.05$ ). After the second hour the difference made 0.4 mM/hr for native suspension and 1.6 mM/hr for cryopreserved one ( $P < 0.05$ ).

Basing on the data obtained, one can conclude, that when stimulating native spermatozoa by PF, the fructose consumption sharply increased in the first hour of incubation for normospermia and asthenospermia, moreover for the normospermia the effect was more manifested. After cryopreservation the fructolysis proceeded uniformly during the first hour for both studied groups of cells. The data comparison of the fructose utilisation during the second hour for a native suspension has demonstrated a statistically significant decrease in the rate of sugar decay in the norm and at a pathology, meanwhile after cryopreservation the fructolysis by spermatozoa remained at a high level and its rate was higher at asthenospermia, that correlated with the motility data at this pathology



**Рис. 2.** Изменение подвижности спермиев человека, инкубированных в растворе 3,5 мМ ПФ: 1 — натив нормоспермия; 2 — натив астеноспермия; 3 — криоконсервированная суспензия при нормоспермии; 4 — криоконсервированная суспензия при астеноспермии.

**Fig. 2.** Motility change of human spermatozoa, incubated in 3.5 mM PF solution: 1 — native cell suspension at normospermia; 2 — native cell suspension at asthenospermia; 3 — cryopreserved suspension at normospermia; 4 — cryopreserved suspension at asthenospermia.



действия производных метилксантина после отогрева является эффективным средством реабилитации астенических клеток в процессе их криоконсервации.)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С. Криоконсервация репродуктивных клеток.— Киев: Наук. думка, 1986.— 207 с.
2. Кунин М. А. Бесплодие в браке.— М.: Медицина, 1973.— 232 с.
3. Лучко Н. А., Кучков И. Н. Влияние производных метилксантина на некоторые биохимические параметры спермиев человека до и после криоконсервации // Пробл. криобиологии.— 1998.— № 4.— С. 48–53.
4. Молнар Е. Общая сперматология.— Будапешт, 1969.— 294 с.
5. Пат. № 3822617 ФРГ. Способ низкотемпературного криоконсервирования спермы / В. И. Грищенко, Ю. В. Калугин, Н. А. Лучко, Ю. С. Паращук. Заявлено 04.07.88. Опубликовано 18.01.90.
6. Alvarez J. G., Storey B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation // J. Androl.— 1992.— 13, № 3.— P. 232–241.
7. Aparicio N. J., De Turner E. A. Schwarstein L., Turner D. Effect of phosphodiesterase inhibitors on human sperm motility // Andrologia.— 1980.— 12.— P. 49–54.
8. Aribarg A. Effects of pentoxifylline on sperm motility characteristics and motility longevity of postthaw cryopreserved semen using computer-assisted semen analysis (CASA) // J. Med. Assoc. Thai.— 1994.— 77, № 2.— P. 71–75.
9. Hammit D. G., Bedia E., Rogers P. R. et al. Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen // Fertil. Steril.— 1989.— 52, № 3.— P. 495–502.
10. Lange Consiglic A., Chiara F., Marchini M. et al. Cytochemical study of human sperm metabolism during in vitro capacitation after cryopreservation // Arch. Ital. Urol. Nefrol. Androl.— 1992.— 64, № 2.— P. 115–122.
11. Lewis S. E. Influence of pentoxifylline on human sperm motility in asthenozoospermic individuals using computer-assisted analysis // Arch. Androl.— 1994.— 32, № 3.— P. 175–183.
12. Mahadevan M. M., Trounson A. O. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization // Fertil. Steril.— 1984.— 42.— P. 400.
13. Mundy A. J., Ryder T. A., Edmonds D. K. Asthenospermia and the human sperm mid-piece // Hum. Reprod.— 1995.— 10, № 1.— P. 116–119.
14. Pang S. C., Williams D. B., Huang T., Wang C. Effect of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivated motility in vitro: a preliminary report // Fertil. Steril.— 1993.— 59.— P. 465–467.
15. Pedersen H., Lebech P. E. Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination // Fertil. Steril.— 1971.— 22, № 2.— P. 125–133.
16. Piaseca M., Wenda-Rozewicka L., Kozanecka A. et al. Changes in sperm mitochondria in patients with asthenozoospermia // Gynec. Pol.— 1998.— 69, № 6.— P. 479–484.
17. Richter M. A., Haning R. V. Jr, Shapiro S. S. Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control // Fertil. Steril.— 1984.— 41.— P. 277–281.
18. Shen M. R., Chiang P. H., Xang R. C. et al. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy // Br. J. Clin. Pharmacol.— 1991.— 31.— P. 711–714.

Поступила 01.03.99

(Fig. 2). Thus, PF maintained the fructose utilisation by cryopreserved spermatozoa within 2 hours of incubation as distinct from native samples, in those by the end of the second hour the fructolysis reduced down to the level corresponding to that one in cells before the stimulation.

It should be noted, that the combination of ultrarapid cooling rates of gametes and a stimulating effect of methylxantine derivatives after thawing is an efficient means of asthenic cell rehabilitation within the process of their cryopreservation.

## REFERENCES

1. Belous A. M., Grischenko V. I., Paraschuk Yu. S. Cryopreservation of reproductive cells.— Kiev: Naukova Dumka, 1986.— 207 p.
2. Kunin M. A. Infertility in a marriage.— M.: Meditsina, 1973.— 232 p.
3. Luchko N. A., Kuchkov I. N. Effect of methylxantine derivatives on some bioenergetic parameters of human spermatozoa before and after cryopreservation // Problemy Kriobiologii.— 1998.— № 4.— P. 48–53.
4. Molnar E. Common spermatology.— Budapest, 1969.— 294 p.
5. Patent № 3822617 ФРГ. Way of spermatozoa low temperature preservation / V. I. Grischenko, Yu. V. Kalugin, N. A. Luchko, Yu. S. Paraschuk. Application made of 04.07.88. Published 18.01.90.
6. Alvarez J. G., Storey B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation // J. Androl.— 1992.— 13, № 3.— P. 232–241.
7. Aparicio N. J., De Turner E. A. Schwarstein L., Turner D. Effect of phosphodiesterase inhibitors on human sperm motility // Andrologia.— 1980.— 12.— P. 49–54.
8. Aribarg A. Effects of pentoxifylline on sperm motility characteristics and motility longevity of postthaw cryopreserved semen using computer-assisted semen analysis (CASA) // J. Med. Assoc. Thai.— 1994.— 77, № 2.— P. 71–75.
9. Hammit D. G., Bedia E., Rogers P. R. et al. Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen // Fertil. Steril.— 1989.— 52, № 3.— P. 495–502.
10. Lange Consiglio A., Chiara F., Marchini M. et al. Cytochemical study of human sperm metabolism during in vitro capacitation after cryopreservation // Arch. Ital. Urol. Nefrol. Androl.— 1992.— 64, № 2.— P. 115–122.
11. Lewis S. E. Influence of pentoxifylline on human sperm motility in asthenozoospermic individuals using computer-assisted analysis // Arch. Androl.— 1994.— 32, № 3.— P. 175–183.
12. Mahadevan M. M., Trounson A. O. The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization // Fertil. Steril.— 1984.— 42.— P. 400.
13. Mundy A. J., Ryder T. A., Edmonds D. K. Asthenospermia and the human sperm mid-piece // Hum. Reprod.— 1995.— 10, № 1.— P. 116–119.
14. Pang S. C., Williams D. B., Huang T., Wang C. Effect of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivated motility in vitro: a preliminary report // Fertil. Steril.— 1993.— 59.— P. 465–467.
15. Pedersen H., Lebech P. E. Ultrastructural changes in the human spermatozoa after freezing for artificial insemination // Fertil. Steril.— 1971.— 22, № 2.— P. 125–133.
16. Piaseca M., Wenda-Rozewicka L., Kozanecka A. et al. Changes in sperm mitochondria in patients with asthenozoospermia // Gynec. Pol.— 1998.— 69, № 6.— P. 479–484.
17. Richter M. A., Haning R. V. Jr, Shapiro S. S. Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control // Fertil. Steril.— 1984.— 41.— P. 277–281.
18. Shen M. R., Chiang P. H., Xang R. C. et al. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy // Br. J. Clin. Pharmacol.— 1991.— 31.— P. 711–714.

Accepted in 01.03.99



# Некоторые биофизические свойства половых и эмбриональных клеток свиньи, определяющие их криорезистентность.

## I. Распределение осмотических и геометрических характеристик в популяции ооцитов и яйцеклеток

А. Г. ТРОХИМЕНКО, Н. Д. БЕЗУГЛЫЙ

*Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулинич*

Н. А. ГОРДИЕНКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

# Some Biophysical Properties of Porcine Sex and Embryonic Cells, Determining their Cryoresistance.

## I. Distribution of Osmotic and Geometric Characteristics in Oocyte and Ova Population

A. G. TROKHIMENKO, N. D. BEZUGLY

*Center of Biotechnology, Kharkov, Kulinichi*

N. A. GORDIENKO

*Kharkov State Medical University*

Определено количество осмотически активной воды, осмотически неактивных и непроникающих веществ в ооцитах и яйцеклетках свиньи, а также такие геометрические характеристики ооцитов, как диаметр, общий объем и абсолютный объем осмотически неактивных веществ, статистическое распределение этих величин. Проведен корреляционный анализ на наличие связи между объемом ооцита и объемом осмотически неактивных веществ и определен коэффициент корреляции. Показано, что осмотический состав ооцитов свиньи достоверно не отличается от осмотического состава ооцитов и яйцеклеток других видов млекопитающих.

Визначено кількість осмотично активної води, осмотично неактивних та непроникаючих речовин в ооцитах і яйцеклітинах свині, а також такі геометричні характеристики ооцитів, як діаметр, загальний та абсолютний об'єм осмотично неактивних речовин, статистичний розподіл цих величин. Проведено кореляційний аналіз на наявність зв'язку між об'ємом ооциту та об'ємом осмотично неактивних речовин і визначено коефіцієнт кореляції. Показано, що за осмотичним складом ооцити та ембріони свині вірогідно не відрізняються від ооцитів та ембріонів інших видів ссавців.

The volumes of osmotically active water, osmotically nonactive and impermeable substances in oocytes and ova, as well as geometric parameters of porcine oocytes, such as diameter, total volume and absolute volume and statistic distribution of these values were determined. Correlative analysis of existence of relationship between oocyte volume and osmotically nonactive substance volume was carried out and the correlation was calculated. It was shown that the osmotic composition of pig oocytes and ovum did not significantly differ from the osmotic composition of other mammalian species oocytes and ova.

Основные объекты современной биотехнологии воспроизведения — это яйцеклетки и эмбрионы сельскохозяйственных животных. Важными этапами биотехнологических процессов являются криоконсервация и длительное хранение репродуктивных клеток. Созревание ооцитов *in vitro* с последующим оплодотворением позволяет получить большое количество эмбрионов. Для многих видов сельскохозяйственных животных проблема криоконсервации половых и эмбриональных клеток решена, за исключением эмбрионов свиньи, особенно ранних стадий развития [5–7].

Известно, что осмотические свойства клеток определяют главные закономерности реакции на низкотемпературное воздействие. Поэтому в работе

Oocytes and embryos of animals are main objects of modern reproduction biotechnology. Cryopreservation and long-term storage of reproductive cells are important stages of biotechnological processes. Oocytes *in vitro* maturation with following fertilization allows to obtain a large number of embryos. For many cattle species the task of cryopreservation of sexual and embryonic cells is solved, excluding the pig's embryos, in particular of early development stages [5–7].

It is known, that osmotic properties determine main regularities of the response to low temperature effect. Therefore in this work we studied osmotic and geometric characteristics of pig oocytes and their statistical distribution with the aim of further investigation of these data to optimize the freezing method.



изучались осмотические и геометрические характеристики ооцитов свиньи и их статистические распределения с целью дальнейшего исследования этих данных для оптимизации метода замораживания.

Перенос клеток из одной среды в другую вызывает нарушение термодинамического равновесия между вне- и внутриклеточным растворами, необходимым условием которого является равенство значений химических потенциалов проникающих через мембрану веществ вне и внутри клетки. Основным препятствием для диффузии в системе являются мембраны, так как на них сосредоточены перепады осмотического давления, в то время как его градиентами в межмембранных областях можно пренебречь [8]. Обычно растворитель (вода) проникает через мембраны клеток значительно быстрее, чем молекулы других веществ. Поэтому при переносе клетки из изотонического в гипертонический раствор ее объем в начале экспозиции уменьшается настолько, что суммарная концентрация выравнивается из-за оттока воды из клетки, что определяется как стадия ее обезвоживания. Именно эти теоретические предпосылки были положены в основу методики настоящего исследования.

Ооциты извлекали из яичников убитых животных без патологических изменений в течение часа после убоя, подсчитывали их общее количество и разделяли по морфологическим признакам: ооциты с увеличенным и средним кумулюсом и равномерно окрашенной цитоплазмой рассматривались как полноценные, а без кумулюса или с редуцированным кумулюсом относили к атретическим. Яйцеклетки получали после дозревания ооцитов в среде для культивирования TSM-199 с гормональными добавками при 5% CO<sub>2</sub> в воздухе и при температуре 38,5 °C в термостате до стадии метафазы II.

Осмотические особенности ооцитов свиньи анализировали по изменению осмотического объема в гипертонических растворах NaCl различной осмоларности. По методу волюмометрии с помощью полуавтоматической установки для изучения осмотических особенностей яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих [1] фиксировалось изменение размеров объекта при погружении его в раствор необходимого состава, температуры и концентрации. При этом в качестве изотонического раствора использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко. По записанным в базе данных ПЭВМ изображениям рассчитывали относительный клеточный объем, кинетика которого была основой для определения осмотических параметров при сопоставлении экспериментальных и расчетных данных методом вариационного анализа. Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента–Фишера с использованием корреляционного анализа и выявлением закона распределения параметров.

Для исследования были использованы 177 ооцитов свиньи и 26 яйцеклеток, которые при погру-

Cell transfer from one to another medium causes the impairment of thermodynamic balance between extra- and intracellular solutions, an essential condition of which is the equality of the values between chemical potentials of substances, penetrating through the membrane into and out of a cell. General obstacle for diffusion in the system is membranes, since overfalls of osmotic pressure are concentrated on them, meanwhile its gradients in intermembrane fields can be neglected [8]. Usually solvent (water) penetrates via the cell membrane more rapidly than the molecules of other substances. Therefore when transferring a cell from isotonic into hypertonic solution its volume at the exposure beginning reduces in such an extent, that total concentration gets equal due to water outflux out of a cell, that is defined as its dehydration. It is these theoretical preconditions were laid into the base of this study methods.

Oocyte were isolated from ova of slaughtered animals without pathological changes within an hour after slaughtering, their total number was calculated and divided into morphological characteristics: oocytes with an increased and average cumulus and evenly stained cytoplasm were considered as integral ones, and without cumulus or with a reduced one were referred as atretic. Ova were obtained after oocytes maturation in the TSM-199 medium for culturing with hormonal additives at 5% CO<sub>2</sub> in air and temperature of 38.5 °C in a thermostat upto metaphase II stage.

Osmotic peculiarities of pig oocytes were analyzed on the change of osmotic volume in NaCl hypertonic solutions of various osmolarity. According to the volumetry method by means of semi-automatic device for the studying of osmotic peculiarities of mammalian ova and embryos [1] the change in the object sizes was fixed during its submerging into the solution of necessary composition, temperature and concentration. In this case Dulbecco phosphate saline buffer was used as an isotonic solution. According to the images recorded in the computer data base a relative cellular volume was calculated, the kinetics of which was the basis for determining the osmotic parameters. When comparing the experimental as calculated data by the method variational analysis, the results were statistically processed by the Student–Fisher's method using the correlational analysis and revealing the law of parameters' distribution.

For the investigations 177 porcine oocytes and 27 ova were used, they being plunged into a hypertonic solution demonstrated positive osmotic reaction. In the majority of oocytes, selected by morphological characteristics, a positive osmotic reaction was not observed: due to the damage of cytoplasmatic membranes they could not response as absolute osmometers.

The picture of relative volume change of oocytes in various hypertonic NaCl solutions is presented in Fig. 1. The cells act as absolute osmometers in a wide range of experimental concentrations, because the de-



жении в гипертонический раствор давали положительную осмотическую реакцию. У большинства ооцитов, отобранных по морфологическим признакам, положительная осмотическая реакция не наблюдалась: из-за повреждения цитоплазматических мембран они не могли реагировать как абсолютные осмометры.

График изменения относительного объема ооцитов в различных гипертонических растворах NaCl представлен на рис. 1. Клетки ведут себя как абсолютные осмометры в широком диапазоне экспериментальных концентраций, так как зависимость относительного объема от концентрации в координатах Вант-Гоффа является линейной.

Для количественного определения искомых параметров построим модель одиночной изолированной клетки как абсолютного осмометра.

Абсолютный объем клетки

$$V_c = V_w + V_p + V_i + V_b, \quad (1)$$

где  $V_w$  — растворитель (вода);  $V_p$ ,  $V_i$  — растворенные проникающие и непроникающие вещества;  $V_b$  — осмотически неактивные вещества [2].

В растворах непроникающих веществ (НПВ) в клетке не содержится проникающих веществ ( $V_p = 0$ ), а так как количество НПВ в клетке постоянно, их объем можно суммировать с объемом осмотически неактивных веществ. Объем балласта состоит из мембран внутриклеточных органелл, высокомолекулярных веществ типа белков, питательных веществ и др. Для дальнейшего анализа удобнее перейти к относительным значениям объемов, под которыми понимается отношение текущего значения объема к объему в изотонических условиях.

В относительных величинах правило клеточного объема будет иметь вид:

$$v_c = v_b + (1 - v_b - v_i) v + v_i, \quad (2)$$

где  $v_c = V_c(t) / V_c^{iso}$  — относительный клеточный объем;  $v = V_{H_2O}(t) / V_{H_2O}^{iso}$  — относительный объем внутриклеточной воды;  $v_b = V_b / V_c^{iso}$  — относительный объем осмотически неактивных веществ;  $v_i = V_i / V_c$  — относительный объем непроникающих веществ.

Так как клетка является абсолютным осмометром в широком диапазоне концентраций, относительное количество внутриклеточной воды может быть определено по закону Вант-Гоффа:

$$v = C_i^{iso} / C_i^e. \quad (3)$$

Тогда относительный объем клетки

$$v_c(t) = v_b + v_i + (1 - v_b - v_i)(C_i^{iso} / C_i^e). \quad (4)$$

Относительный объем осмотически неактивных и непроникающих веществ определяется как точка пересечения с осью ординат функции относительного клеточного объема от концентрации в координатах Вант-Гоффа. Добавочным к нему до полного

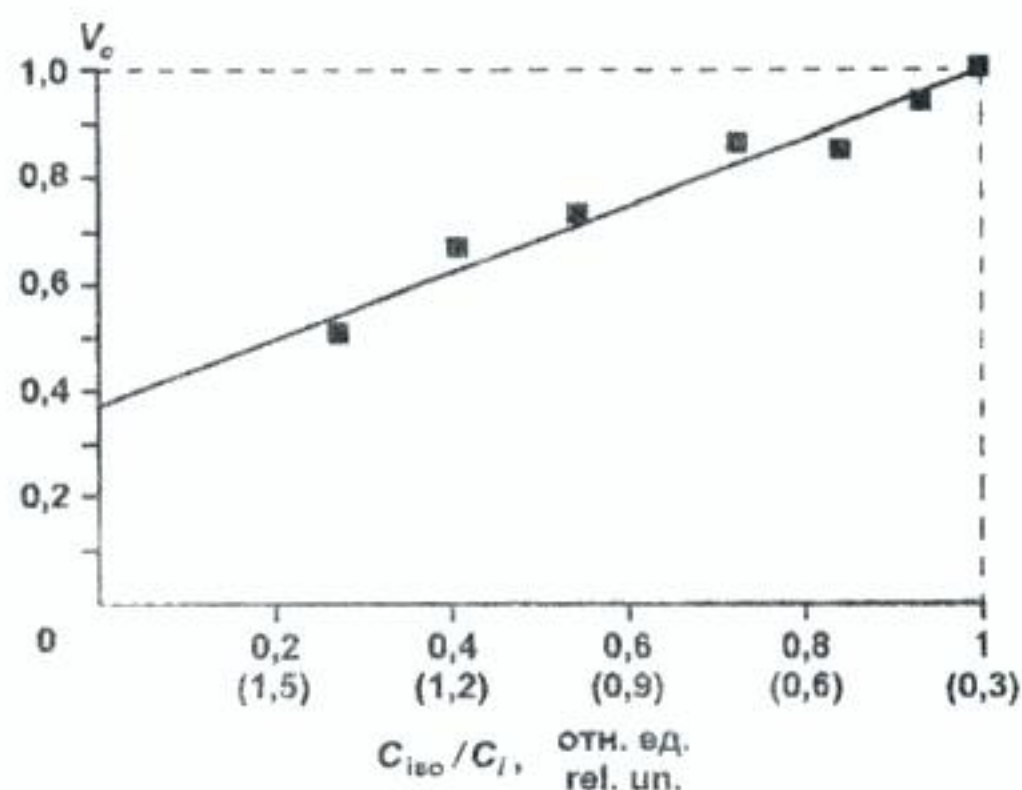


Рис. 1. Относительный объем ооцитов свиньи в растворах NaCl различной тоничности: ■ — экспериментальные значения; — — — аппроксимация с помощью уравнений (4)–(6).

Fig. 1. Relative volume of pig oocytes in the NaCl solutions of different tonicity: ■ — experimental values; — — — approximation by means of the equations (4)–(6).

dependency of relative volume on the concentration in the Van't-Hoff coordinates is linear one.

For qualitative determination of the parameters sought for we compose the model of single isolated cell as an absolute osmometer.

An absolute cell volume is:

$$V_c = V_w + V_p + V_i + V_b, \quad (1)$$

where  $V_w$  — solvent (water);  $V_p$ ,  $V_i$  — dissolved penetrating and non-penetrating substances;  $V_b$  — osmotically inactive substances [2].

In the solutions of non-penetrating substances (NPS) a cell does not comprise penetrating ones ( $V_p = 0$ ), and since the NPS quantity in a cell is constant, their volume can be summed with the one of osmotically inactive substances. The ballast volume consists of the membranes of intracellular organelles, highly molecular substances of protein type, nutritive substances etc. For further analysis it is more convenient to use relative volume values, that is the ratio of current volume value to the volume under isotonic conditions. In relative values the rule of cellular volume will be represented as follows:

$$v_c = v_b + (1 - v_b - v_i) v + v_i, \quad (2)$$

where  $v_c = V_c(t) / V_c^{iso}$  — relative cellular volume;  $v = V_{H_2O}(t) / V_{H_2O}^{iso}$  — relative volume of intracellular water;  $v_b = V_b / V_c^{iso}$  — relative volume of osmotically inactive substances;  $v_i = V_i / V_c$  — relative volume of non-penetrating substances.

Since a cell is an absolute osmometer in a wide range of concentrations, a relative number of intracellular water can be defined by Van't-Hoff law:

$$v = C_i^{iso} / C_i^e, \quad (3)$$

then a relative cell volume will be as follows:



клеточного объема является объем свободной воды в клетке. В области свертгипертонических концентраций была использована линейная аппроксимация опытных данных для диапазона экспериментальных концентраций с помощью метода наименьших квадратов. Суть метода состоит в том, чтобы найти такой коэффициент ( $C = v_b + v_i$ ), при котором сумма квадратов разности между теоретическими и экспериментальными значениями клеточных объемов была минимальной, т.е.

$$\sum_{j=1}^k \left[ (v_c^{\text{теор}})_j - (v_c^{\text{эксп}})_j \right]^2 = \min,$$

где  $v_c^{\text{теор}}$  — расчетные значения по формуле (4);  $v_c^{\text{эксп}}$  — экспериментальные значения;  $j$  — номер эксперимента;  $k$  — количество экспериментов.

Из определения минимума функции следует, что

$$\frac{\partial}{\partial C} \sum_{j=1}^k \left[ (v_c(t))_j - (v_c^{\text{эксп}})_j \right]^2 = 0 \quad (5)$$

После подстановки уравнения (4) в (5) и математических преобразований искомый объем

$$v_i + v_b = \frac{\sum_{j=1}^k \left( 1 - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right) \left( (v_c^{\text{эксп}})_j - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right)}{\sum_{j=1}^k \left( 1 - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right)^2}. \quad (6)$$

Относительный объем непроникающих через цитоплазматическую мембрану веществ в клетке

$$v_i \approx C_i \frac{M}{\rho}, \quad (7)$$

где  $M$ ,  $\rho$  — молекулярный вес и плотность внутриклеточных осмотически неактивных веществ.

Нами были использованы растворы следующих осмолярностей: 290 (изотония), 322, 357, 414, 533, 740 и 1 102 мосм. При выборе концентрации соблюдалась приблизительная линейность в изменении относительного объема в координатах Вант-Гоффа.

Результаты расчетов по формулам (4), (6) и (7) показали, что относительный объем осмотически неактивных веществ, свободной воды и непроникающих веществ в ооцитах свиньи в среднем составляет  $33,02 \pm 2,17$ ;  $66,08 \pm 2,17$ ;  $0,71 \pm 0,03\%$  соответственно. В популяции ооцитов объем осмотически неактивных веществ и объем свободной воды принимал значения 18–35 и 65–81% соответственно. В яйцеклетках свиньи относительный объем осмотически неактивных веществ, свободной воды и непроникающих веществ в ооцитах свиньи в среднем составляет  $28,05 \pm 2,08$ ;  $71,95 \pm 2,08$ ;  $0,78 \pm 0,03\%$  соответственно.

$$v_c(t) = v_b + v_i + (1 - v_b - v_i)(C_i^{\text{iso}} / C_i^e). \quad (4)$$

A relative volume of osmotically inactive and non-penetrating substances is determined as a intersection point with an ordinate axis of the function of relative cellular volume on the concentration in Van't-Hoff coordinates. The volume of free water in a cell is its additional one up to a complete cellular volume. In the field of extrahypertonic concentrations a linear approximation of experimental data was used for the range of experimental concentrations by means of the method of the least squares.

The method essence is to find such coefficient ( $C = v_b + v_i$ ), at which the sum of squares difference between theoretical and experimental values of cellular volumes was minimal, that is

$$\sum_{j=1}^k \left[ (v_c^{\text{theor}})_j - (v_c^{\text{exp}})_j \right]^2 = \min,$$

where "theor" means calculated values according to the formula (4); "exp" — experimental values;  $j$  — experiment number;  $k$  — number of experiments. As it follows from the function minimum:

$$\frac{\partial}{\partial C} \sum_{j=1}^k \left[ (v_c(t))_j - (v_c^{\text{exp}})_j \right]^2 = 0 \quad (5)$$

When substituting the equation (4) into (5) and mathematic transformations the volume sought for will be as follows:

$$v_i + v_b = \frac{\sum_{j=1}^k \left( 1 - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right) \left( (v_c^{\text{exp}})_j - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right)}{\sum_{j=1}^k \left( 1 - C_i^{\text{iso}} / (C_i^e)^j \right)^2}. \quad (6)$$

Relative volume of non-penetrating through cytoplasmatic membrane substances in a cell:

$$v_i \approx C_i \frac{M}{\rho}, \quad (7)$$

where  $M$ ,  $\rho$  — molecular weight and density of intracellular osmotically inactive substances.

We used the solutions of following osmolarities: 290 (isotony), 322, 357, 414, 533, 740 and 1 102 mOsm. When selecting the concentration, an approximate linearity in the change of relative volume in the coordinates of Van't-Hoff was met.

The results of calculations according to the formulae (4), (6) and (7) showed, that relative volume of osmotically inactive substances free water and non-penetrating substances in pig oocytes in average made  $33.02 \pm 2.17$ ;  $66.08 \pm 2.17$ ;  $0.71 \pm 0.03\%$ , correspondingly. In population of oocytes the volume of osmotically inactive substances and the volume of free water had the values 18–35 and 65–81%, correspondingly.



Были определены такие геометрические характеристики ооцитов свиньи, как диаметр, общий и абсолютный объем осмотически неактивных веществ. Диаметр ооцитов принимал значения 117–157 мкм, в среднем  $145 \pm 7,5$  мкм, общий объем клетки  $0,71 \cdot 10^5 - 1,74 \cdot 10^5$  мкм<sup>3</sup>, в среднем  $(1,42 \pm 0,06) \cdot 10^5$  мкм<sup>3</sup>. Рассчитанный абсолютный объем осмотически неактивных веществ составлял  $0,26 \cdot 10^5 - 1,01 \cdot 10^5$  мкм<sup>3</sup>, в среднем  $(0,56 \pm 0,08) \cdot 10^5$  мкм<sup>3</sup>. Все определенные параметры варьируют в пределах 20%. Такая значительная вариация связана с индивидуальными особенностями ооцитов и яичников, из которых они были извлечены.

Для подтверждения гипотезы о нормальности распределения данных параметров были построены эмпирические вариационные ряды и графики распределения объема клетки и объема осмотически неактивных веществ (рис. 2, 3). Но вариационная кривая не позволяет с полной уверенностью говорить о законе распределения совокупности, из которой взята выборка. На величине любого варьирующего признака сказывается влияние многочисленных, в том числе и случайных факторов, искажающих четкую картину варьирования. Поэтому гипотезу о законе распределения проверяли с помощью коэффициентов асимметрии  $\sigma$  и эксцесса  $E_x$ . Данные критерии помогут при анализе установления действия возможных причин, вызывающих отклонение характера распределения от нормального. Для общего объема ооцитов и объема балласта они представлены в табл. 1. Эмпирически определенные величины коэффициента асимметрии и эксцесса для принятого уровня значимости не превышают табличные значения [3], следовательно, гипотеза о нормальности распределений значений объема ооцита и объема осмотически неактивных веществ подтверждается. Отрицательное отклонение свидетельствует о скосе графического распределения влево, отрицательный эксцесс — о плосковершинности или двугорбости распределе-

In pig ova a relative volume of osmotically inactive substances, free water and non-penetrating substances in pig oocytes in average makes  $28.05 \pm 2.08$ ;  $71.95 \pm 2.08$ ;  $0,78 \pm 0.03\%$ , correspondingly.

Such geometric characteristics of pig oocytes as diameter, general and absolute volume of osmotically inactive substances were determined. Oocyte diameter had the values of 117–157  $\mu\text{m}$ , in average of  $145 \pm 7.5 \mu\text{m}$ , general cell volume —  $0.71 \cdot 10^5 - 1.74 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ , in average  $(1.42 \pm 0.06) \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ . Calculated absolute volume of osmotically inactive substances made  $0.26 \cdot 10^5 - 1.01 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ , in average  $(0.56 \pm 0.08) \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ . All determined parameters vary within the limits of 20%. Such a significant variation is connected to individual peculiarities of oocytes and ova, from where they were taken.

To confirm the hypothesis on a normality of given parameters distribution the empirical variational rows and distribution schemes were composed, as well as ones of cell volume and volume of osmotically inactive substances (Fig. 2, 3). However a variational curve does not allow to completely speak about distribution law of the totality, from which the excerption was performed. Many factors, including accidental ones, distorting a distinct picture of variation, affect the value of any varying feature. So the hypothesis on the distribution law was checked by means of the coefficients of asymmetry  $\sigma$  and excess  $E_x$ . These criteria will help when analysing the establishment of the effect of possible causes, resulting in the deviation of distribution character from normal one. Table 1 represents total volume of oocytes and the ballast volume. Empirically determined values of the coefficient of asymmetry and excess for given significance level do not exceed the table values [3], consequently the hypothesis on the normality on the distribution of values of oocyte volume and the one of osmotically inactive substances is confirmed. Negative deviation testifies to a left-slanted graphic distribution, negative ex-

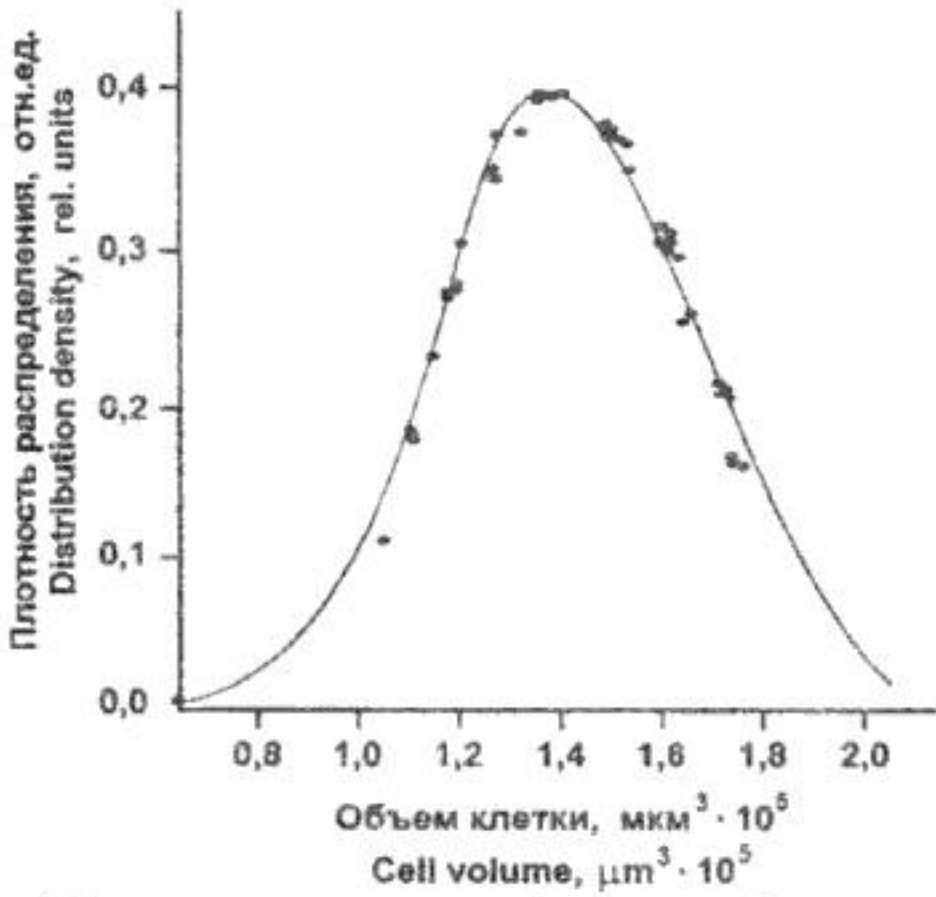


Рис. 2. Плотность распределения абсолютного объема клетки.  
Fig. 2. Distribution density of a cell absolute volume.

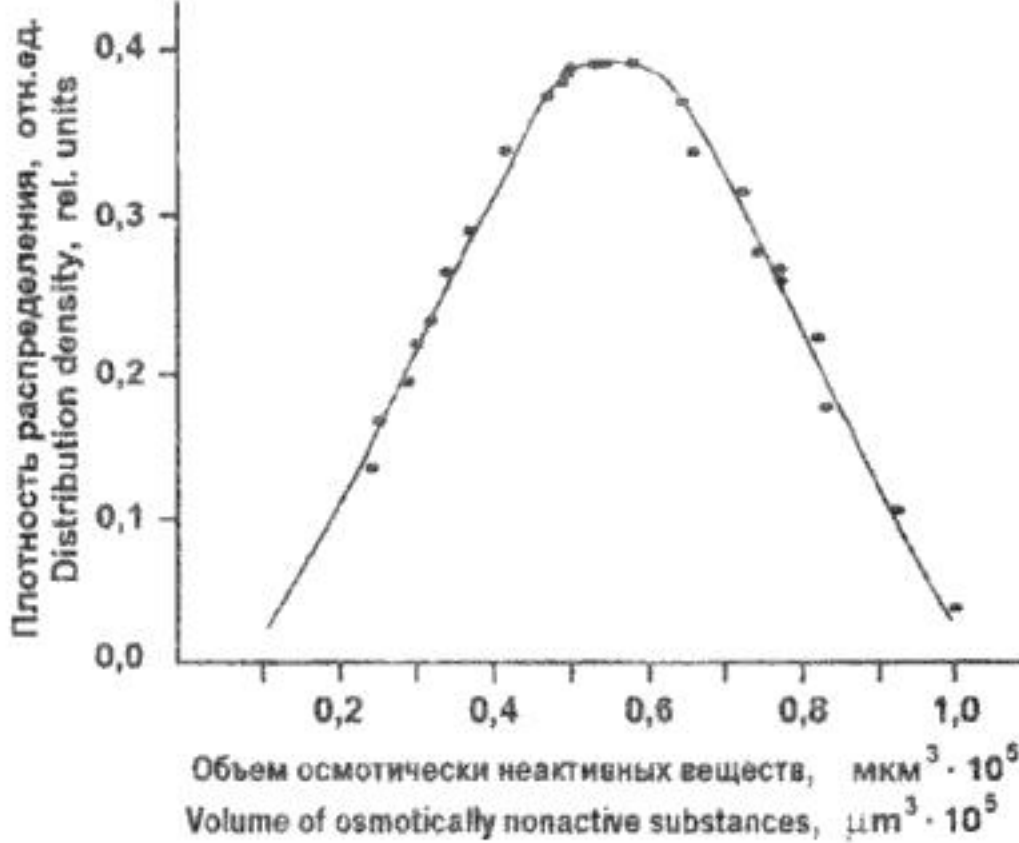


Рис. 3. Плотность распределения абсолютного объема осмотически неактивных веществ.  
Fig. 3. Distribution density of osmotically nonactive substances absolute volume.



ния. На знак и величину эксцесса оказывает влияние сложение ряда неоднородных нормальных распределений, а именно разнородных популяций ооцитов. Непревышение коэффициента асимметрии установленной нормы параметров распределения при биологических исследованиях для данного уровня значимости ( $\alpha = 5\%$  по Г. Ф. Лакину) свидетельствует о том, что эти популяции различны по групповым средним объемам, но сходны по плотности распределения.

**Таблица 1**

**Численные характеристики распределений абсолютного объема клетки и объема осмотически неактивных веществ в популяции ооцитов свиньи**

| Распределение объема           | Отклонение (скос), отн. ед. | Эксцесс, отн. ед. |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Клетки                         | -0,72                       | 0,26              |
| Осмотически неактивных веществ | 0,46                        | -0,60             |

В настоящее время неизвестны морфологические и цитологические признаки, по которым можно определить способность ооцитов к развитию *in vitro* и дальнейшему оплодотворению. Таковыми могут быть абсолютный объем, объем осмотически неактивных веществ или взаимосвязь между этими параметрами. Поэтому на основе полученных распределений был проведен корреляционный анализ исследования наличия линейной корреляционной связи между абсолютным объемом ооцита и абсолютным объемом осмотически неактивных веществ, между абсолютным объемом ооцита и относительным объемом осмотически неактивных веществ и определены коэффициенты корреляции  $K$ . В первом случае  $K_1 = 0,709$  ( $P < 0,001$ ), т.е. существует линейная положительная корреляционная связь, степень сопряжения достаточно высокая. Следовательно, общий объем клетки зависит от объема, занимаемого питательными веществами и внутриклеточными органеллами. Во втором случае  $K_2 = 0,560$  ( $P < 0,05$ ), т.е. признаки варьируют более независимо.

Если сравнить полученные результаты с данными по осмотическому составу ооцитов других видов млекопитающих (табл. 2), то можно увидеть, что количество осмотически активной воды составляет 70–90%, а осмотически неактивных веществ —

**Таблица 2**

**Относительный объем осмотически неактивных веществ ооцитов, яйцеклеток и эмбрионов некоторых видов млекопитающих**

| Вид объекта                | Относительный объем осмотически неактивных веществ ( $M \pm m$ ) |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Яйцеклетки и эмбрионы мыши | $0,20 \pm 0,03$                                                  |
| Эмбрионы кролика           | $0,23 \pm 0,03$                                                  |
| Ооциты коровы              | $0,29 \pm 0,08$                                                  |
| Морулы овцы                | $0,26 \pm 0,06$                                                  |
| Ооциты свиньи              | $0,33 \pm 0,02$                                                  |
| Яйцеклетки свиньи          | $0,28 \pm 0,04$                                                  |

cess — to flat top-like and two-hump like distributions. The summing of heterogenous normal distributions, namely heterogenous oocyte populations affects the excess sign and value. Not exceeding by the asymmetrical coefficient of established norm of distribution parameters during biological studies for given level of significance ( $\alpha = 5\%$  according to G. F. Lakin) testifies to the fact that these populations are different on the group average volumes, but similar on distribution density.

**Table 1**

**Numeric characteristics of distributions of absolute cell volume and the volume of osmotically inactive substances in the population of pig oocytes**

| Volume distribution of           | Deviation (slant), relative units | Excess, relative units |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| A cell                           | -0,72                             | 0,26                   |
| Osmotically nonactive substances | 0,46                              | -0,60                  |

Nowadays morphological and cytological features (absolute volume, volume of osmotically inactive substances or interaction between these parameters according to those one can define the capability of oocytes to the development *in vitro* and further fertilization are known. Therefore on the basis of obtained distributions a correlational analysis on the study of the presense of linear correlational connection between oocyte absolute volume and absolute volume of osmotically inactive substances, between oocyte absolute volume and relative volume of osmotically inactive substances was carried-out and the correlation coefficients  $K$  were determined. In the first case  $K_1 = 0.709$  ( $P < 0.001$ ), that is there is a linear positive correlational connection, the degree of conjugation is quite high. So total cellular volume depends on the volume, occupied by nutritive substances and intracellular organelles. In the second case  $K_2 = 0.560$  ( $P < 0.05$ ), that is the features vary more independently.

If to compare the obtained results with the data on osmotic composition of other mammalian species oocytes (Table 2), then one can note that the number of osmotically active water makes 70–90% and osmotically inactive substances — 10–30% [2, 4]. We can conclude, that osmotic composition of pig oocytes statistically do not differ from that for oocytes, ova

**Table 2**

**Relative volume of osmotically inactive substances of oocytes, ova and embryos of some mammalian species**

| Object type                | Relative volume of osmotically nonactive substances ( $M \pm m$ ) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Murine oocytes and embryos | $0.20 \pm 0.03$                                                   |
| Rat's embryos              | $0.23 \pm 0.03$                                                   |
| Cow's embryos              | $0.29 \pm 0.08$                                                   |
| Sheep's morulae            | $0.26 \pm 0.06$                                                   |
| Pig's oocytes              | $0.33 \pm 0.02$                                                   |
| Pig's ova                  | $0.28 \pm 0.04$                                                   |



10–30% [2, 4]. Можно сделать вывод, что осмотический состав ооцитов свиньи достоверно не отличается от такого для ооцитов, яйцеклеток и эмбрионов других видов млекопитающих, за исключением эмбрионов мыши. Отличие осмотического состава яйцеклеток мыши подтверждается, когда при морфологических исследованиях наблюдаются различия в степени прозрачности цитоплазмы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Безуглий М. Д., Медведовський О. В. Напівавтоматичний метод вивчення осмотичної реакції зародків та яйцеклітин ссавців // Тези доп. I Респ. конф. "Біотехнологічні дослідження і перспективи їх розвитку". – Львів, 1990. – С. 6.
2. Безуглий Н. Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 18 с.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 294 с.
4. Пушкар Н. С., Гордиенко Е. А., Осецкий А. И. и др. Исследование физических процессов в биологических объектах при глубоком охлаждении // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 3. – С. 30–37.
5. Bezugly N., Youngs C., Medvedovsky A., Valigura E. Osmotic composition of pig ova and embryos // Proc. 11th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association. – 1995. – P. 128.
6. Didion B. A., Pomp D., Martin M. J. et al. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage // J. Anim. Sci. – 1990. – 68. – P. 2803–2810.
7. Dobrinsky J. R. Cryopreservation of porcine embryos: Current status and perspectives // Embryo Transfer Newsletter. – 1993. – II(4). – P. 13–18.
8. Pollard J. W., Leibo S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos // Theriogenology. – 1994. – 41. – P. 101–106.

Поступила 03.03.99

and embryos of other mammalian species, excluding mice embryos. The distinction of osmotic composition of mice oocytes is confirmed, when under morphological investigations the differences in the degree of cytoplasm transparency are observed.

## REFERENCES

1. Bezugly N. D., Medvedovsky A. V. Semi-automatic method for studying the osmotic reactions of mammalian embryos and oocytes // Proc. Conference "Biotechnological researches and perspectives of their development" Conference – Lviv, 1990. – P. 6.
2. Bezugly N. D. Osmotic reaction of mammalian embryos and oocytes at cryopreservation: Author's Abstracts for PhD (biology) thesis obtaining. – Kharkov. – 1984. – 18 p.
3. Lakin G. F. Biometry. – M: Vysshaya Shkola, 1980. – 294 p.
4. Pushkar N. S., Gordienko E. A., Osetsky A. I. et al. The study of physical processes in biological objects at a deep cooling // Problemy Kriobiologii. – 1995. – № 3. – P. 30–37.
5. Bezugly N., Youngs C., Medvedovsky A., Valigura E. Osmotic composition of pig ova and embryos // Proc. 11th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association. – 1995. – P. 128.
6. Didion B. A., Pomp D., Martin M. J. et al. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage // J. Anim. Sci. – 1990. – 68. – P. 2803–2810.
7. Dobrinsky J. R. Cryopreservation of porcine embryos: Current status and perspectives // Embryo Transfer Newsletter. – 1993. – II(4). – P. 13–18.
8. Pollard J. W., Leibo S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos // Theriogenology. – 1994. – 41. – P. 101–106.

Accepted in 03.03.99



## Элиминация белков мембран эритроцитов человека, индуцированная ПЭГ-1500

Ю. В. КУЧЕРЕНКО, Е. Д. РОЗАНОВА

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

## Induced by PEG-1500 Elimination of the Membrane Proteins of Human Erythrocytes

Yu. V. KUCHERENKO, E. D. ROZANOVA

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

Исследовано изменение количественного состава белков эритроцитов человека на этапе предобработки клеток криоконсервантом на основе ПЭГ-1500. Показано, что количество экстрагируемого ПЭГ-1500 белка зависит от температуры и времени экспозиции клеток в криозащитном растворе.

Досліджено зміни кількісного складу білків еритроцитів людини на етапі передобробки клітин криоконсервантом на основі ПЕГ-1500. Показано, що кількість екстрагованого ПЕГ-1500 білка залежить від температури і часу експозиції клітин у криозахисному розчині.

Change in the quantitative composition of human erythrocyte proteins at the stage of pretreatment of cells by cryoprotective medium containing PEG-1500. It has been shown that the quantity of extracted protein by PEG-1500 depends on the temperature and period of exposition of cells in cryoprotective solution.

Известно, что экзогенные лиганды, к числу которых могут быть отнесены осмотически активные криопротекторы (ПВП, ПЭГ и т.д.), при обычных физиологических температурах вызывают перераспределение дисперсно расположенных мембранных белков и рецепторов, формируя агрегированные домены или локальные выпячивания мембраны [2, 6]. В [1, 3] показано, что устойчивость клеток к действию низких температур в присутствии ПЭГ-1500 зависит от его концентрации, длительности воздействия и температуры среды инкубации. Холодовая обработка эритроцитов при положительной низкой температуре (0–4 °C) способствует повышению устойчивости клеток к действию низких температур [1]. В эритроцитах, инкубированных с ПЭГ-1500 при 0–4 °C, после замораживания-отогрева хорошо сохраняется качественный и количественный состав цитоскелетных белков [3], хотя и происходит некоторая потеря актиновых мономеров.

Действие ПЭГ-1500 на белковый состав мембран эритроцитов на этапе, предшествующем замораживанию, изучено недостаточно. Цель работы — исследование влияния длительности контакта клеток с 30%-м раствором ПЭГ-1500 на количественный состав белков мембран эритроцитов человека, инкубированных при 4 и 22 °C.

Материалом исследования служили эритроциты донорской крови человека, консервированной на среде "Глюгисир", со сроком хранения до 4-х суток. Использовали криоконсервант на основе ПЭГ-1500 (30%-й раствор ПЭГ-1500 на 15 мМ фосфатном буфере, pH 7.4), содержащий 150 мМ NaCl. После удаления плазмы эритромассу дважды от-

It is known, that exogenous ligands, referred as osmotically active cryoprotectants (PVP, PEG etc.), at physiological temperatures cause redistribution of dispersially located membrane proteins and receptors, by forming the aggregated domains or a local membrane convexities [2, 6]. [1, 3] show, that cell stability to the effect of low temperatures in the presense of PEG-1500 depends on its concentration, duration of the effect and temperature of incubation medium. Erythrocytes' cold processing at positive low temperature (0–4 °C) promotes to an increase of cell stability to low temperature effect [1]. In erythrocytes, incubated with PEG-500 at 0–4 °C, a qualitative and quantitative content of cytoskeleton proteins is well preserved after freezing-thawing, though some loss of actine monomers occurs.

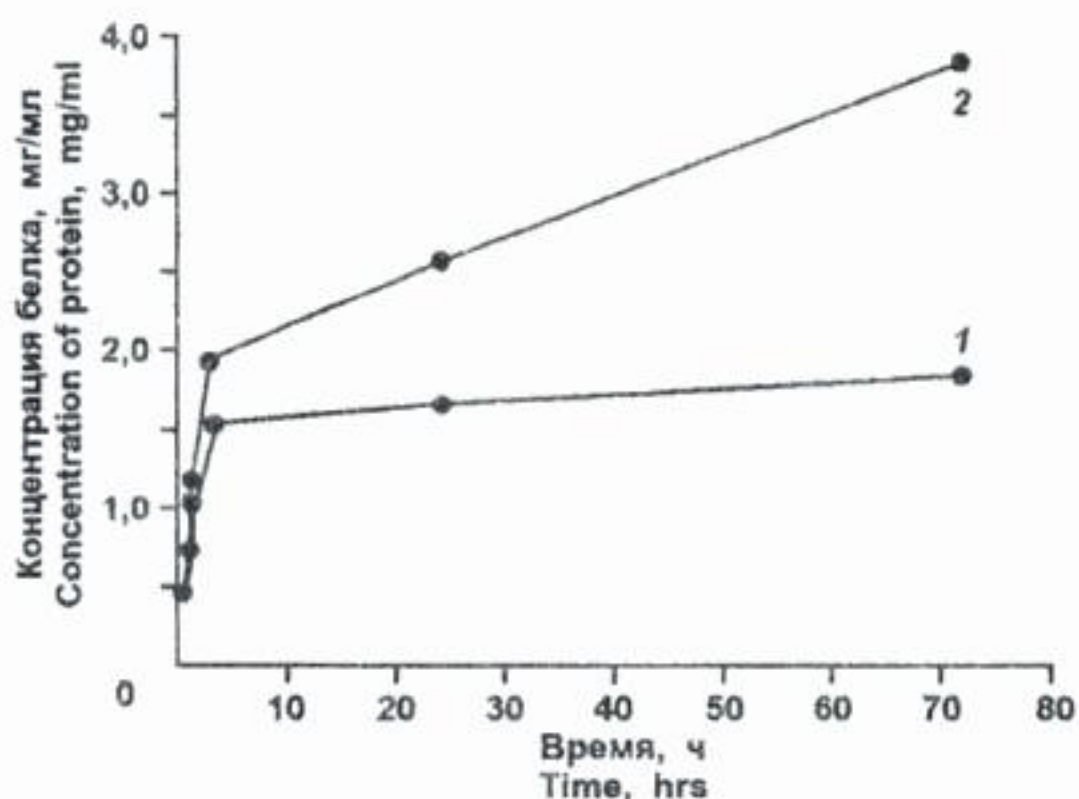
The PEG-1500 effect on the erythrocyte membrane protein content at the stage, preceeding freezing, is insufficiently studied. The aim of the given work is the investigation of the effect of cell contact duration with 30% PEG-1500 solution on a quantitative content of human erythrocyte membrane proteins, incubated at 4 and 22 °C. Erythrocytes of human donor's blood, preserved with the "Glugycyr" medium, up to 4 days storage, were the material for investigation. The cryoprotective medium containing PEG-1500 (30% PEG-1500 solution on 15 mM phosphate buffer, pH 7.4), with 150 mM of NaCl was used. After plasm removal, erythromass was twice washed by 0.9% NaCl (5 min, 1 200g). At the temperature of 4 or 22 °C cryoprotective solution 1:1 (v/v) was added to the erythrocyte suspension (hematocrit was  $0.8 \pm 0.05$  l/l). The samples were thermostated, then



мывали 0,9%-м NaCl (5 мин, 1 200g). К суспензии эритроцитов (гематокрит составлял  $0,8 \pm 0,05$  л/л) добавляли раствор криоконсерванта 1:1 (по объему) при температуре 4 или 22 °C. Образцы термостатировали, после чего центрифугированием смеси (10 мин, 1 200g) надосадочную жидкость отделяли от плотной суспензии клеток. Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм на спектрометре "Unicam SP8000 URS" (Великобритания) по методу Варбурга и Кристиана [4].

Спектры ПМР надосадочной жидкости с ПЭГ-1500 регистрировали на спектрометре "Tesla BS 597A" с рабочей частотой 100 МГц для протонов. В качестве внешнего эталона использовали ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия). Из рис. 1 видно, что уже после 5 мин инкубации эритроцитов с раствором полиэтиленгликоля в спектрах надосадочной жидкости обнаруживается белок. При этом количество белка, экстрагируемого ПЭГ-1500, не зависело от температурного режима обработки клеток. Увеличение длительности инкубации эритроцитов с раствором ПЭГ-1500 при комнатной температуре до 40 мин сопровождается возрастанием концентрации белка в надосадочной жидкости, в то время как при холодовой обработке этот процесс выражен слабее. Дальнейшее увеличение времени контакта клеток с раствором криоконсерванта приводит к росту концентрации белка в надосадке, достигая значения  $C = 1,53$  мг/мл ( $t = 4$  °C) и  $C = 1,91$  мг/мл ( $t = 22$  °C) после трехчасовой инкубации.

Исследования методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии указывают на связь полуширины линий в спектрах надосадочной жидкости и длительности эквilibрации эритроцитов в среде, содержащей ПЭГ-1500 (рис. 2). Экстракция полиэтиленгликолем белков способствует возрастанию гетерогенности образ-



**Рис. 1.** Зависимость концентрации белка в надосадочной жидкости (мг/мл) от времени инкубации эритроцитов с 30%-м раствором ПЭГ-1500 при температуре: 1 – 4 °C; 2 – 22 °C.

**Fig. 1.** Dependence of protein concentration in supernatant liquid (mg/ml) on time of erythrocytes' incubation with 30% solution of PEG-1500 at temperature: 1 – 4 °C; 2 – 22 °C.

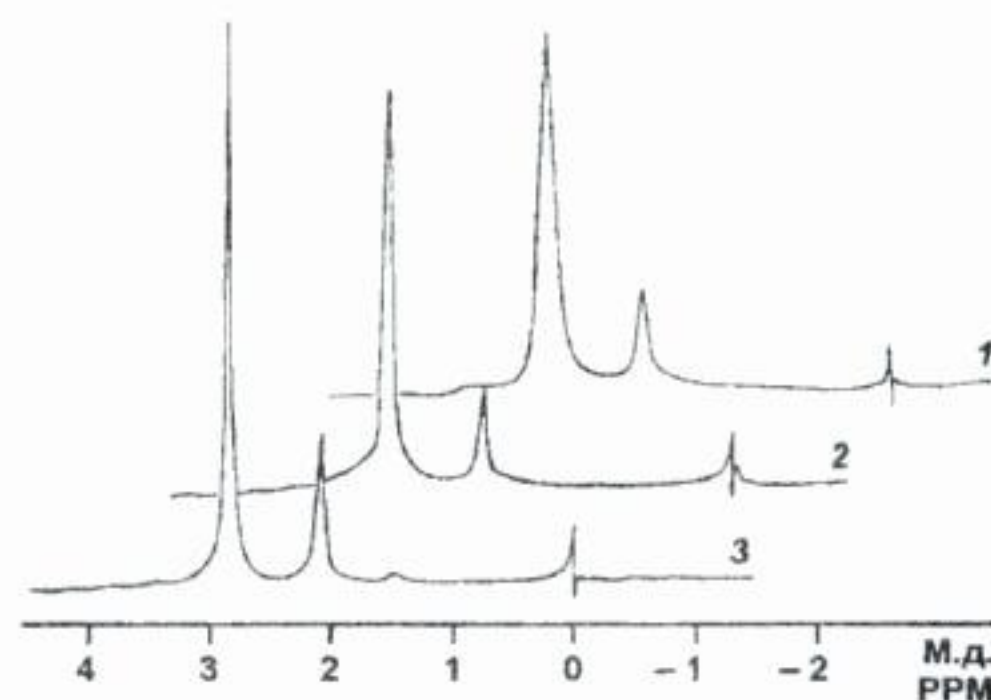
supernatant liquid was separated from a dense cell suspension by centrifugation (10 min, 1 200g). Protein concentration in the supernatant liquid was spectrophotometrically determined on the wave length of 280 nm by means of the "Unicam SP8000 URS" spectrometer (Great Britain) by Varburg's and Cristian's method [4].

PMR spectra of supernatant liquid with PEG-1500 were recorded by the "Tesla BS 597A" spectrometer with an operating frequency 100 MHz for protons. As an inner standard the DSS was used. Fig. 1 showed, that already after 5 min of erythrocyte incubation with polyethylene glycol solution, protein was revealed in the supernatant liquid spectra. Amount of protein, extracted by PEG-1500, did not depend on the temperature regime of cell treatment. An increase of erythrocytes' incubation duration with PEG-1500 solution at a room temperature up to 40 min accompanies with the increase of protein concentration in a supernatant liquid, where as at a cold treatment this process is slightly expressed.

The further increase in the time of cell exposition in cryoprotectant's solution results in the growth of protein concentration in supernatant, reaching the values of  $C = 1.53$  mg/ml ( $t = 4$  °C) and  $C = 1.91$  mg/ml ( $t = 22$  °C) after 3 hrs incubation.

The investigations by means of the  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy indicate the correlation of a halfwidth in the spectra of supernatant liquid and duration of erythrocytes' equilibration in the medium, containing PEG-1500 (Fig. 2). Protein extraction by polyethylene glycol promotes to the increase in sample heterogeneity, and consequently, to the halfwidth increase and amplitude reduction of a water and cryoprotectant signals.

Erythrocyte storage in a cryoprotective medium within 3 days at a room temperature results in the further increase of the membrane proteins' elimination into an outer medium and the erythrocytes hemolysis. Protein concentration in the erythrocytes' super-



**Рис. 2.**  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры надосадочной жидкости, содержащей ПЭГ-1500 ( $t = 22$  °C) после: 1 – 5 мин инкубации эритроцитов с 30%-м раствором ПЭГ-1500; 2 – 40 мин инкубации; 3 – инкубации в течение 1 сут.

**Fig. 2.**  $^1\text{H}$ -NMR spectra of supernatant liquid containing PEG-1500 ( $t = 22$  °C) after: 1 – 5 min of erythrocytes' incubation with 30% solution of PEG-1500; 2 – 40 min of incubation; 3 – incubation during 1 day.



цов, а следовательно, увеличению полуширины и уменьшению амплитуды сигналов поглощения воды и криопротектора.

Хранение эритроцитов в криозащитной среде в течение 3-х суток при комнатной температуре приводит к дальнейшему увеличению элиминации мембранных белков во внешнюю среду и гемолиза эритроцитов. Концентрация белка в надосадочной жидкости эритроцитов, инкубированных с ПЭГ-1500 при  $t = 4^\circ\text{C}$  в течение 3-х суток, изменялась незначительно, что, возможно, связано со стабилизацией структуры мембранных белков.

Таким образом, полученные в работе данные указывают, что изменение количественного состава белков эритроцитов человека (вероятнее всего, мембранных белков) проявляется на этапе предобработки клеток криозащитным раствором ПЭГ-1500 до замораживания. Количество экстрагируемого ПЭГ-1500 белка зависит от температуры и времени экспозиции клеток в растворе криопротектора.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичук Л. А., Землянский Н. Г. Влияние полиэтиленоксида-1500 и температуры на особенности модификации мембран эритроцитов // Пробл. криобиологии. — 1996. — № 4. — С. 32–38.
2. Белоус А. М. Роль белков цитоскелета в холодовой стабильности клеток // Криобиология. — 1990. — № 3. — С. 3–12.
3. Белоус А. М., Гулевский А. К., Бабичук Л. А. и др. Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. — 1990. — № 4. — С. 3–13.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991. — С. 464.
5. Faisst S., Seibicke S. A hypothesis on the mechanism of polyethylene glycol (PEG) — mediated membrane fusion // Cell. Biol. Int. Repts. — 1987. — 11, № 7. — P. 563.
6. Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G. I. L. Membrane alterations induced by amphiphiles // AILA. — 1989. — 16, № 3. — P. 274–280.

Поступила 06.10.98

natant liquid, incubated with PEG-1500 at  $4^\circ\text{C}$  within 3 days changed slightly, that is probably connected with the stabilization of membrane protein structure.

Thus, obtained in the work data point to the change in qualitative human erythrocyte protein composition (likely of membrane proteins) develops at the stage of cell pretreatment by cryoprotective solution PEG-1500 before freezing. The quantity of protein, extracted by PEG-1500 depends on the temperature and period of exposition of cells in a cryoprotectant solution.

### REFERENCES

1. Babichuk L. A., Zemlyanskikh N. G. Polyethylene oxide 1500 and the temperature effect on the peculiarities of erythrocyte membrane modification // Problemy kriobiologii. — 1996. — № 4. — P. 32–38.
2. Belous A. M. Role of cytoskeleton proteins in cell cold stability // Kriobiologia. — 1990. — № 3. — P. 3–12.
3. Belous A. M., Gulevsky A. K., Babichuk L. A. et al. Role of cytoskeleton proteins in the change of erythrocyte stability at the temperature and osmotic effect // Kriobiologia. — 1990. — № 4. — P. 3–13.
4. Doson R., Elliot D., Elliot U., Jones K. Ref. book of biochemistry. — M.: Mir, 1991. — P. 464.
5. Faisst S., Seibicke S. A hypothesis on the mechanism of polyethylene glycol (PEG) — mediated membrane fusion // Cell. Biol. Int. Repts. — 1987. — 11, № 7. — P. 563.
6. Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G. I. L. Membrane alterations induced by amphiphiles // AILA. — 1989. — 16, № 3. — P. 274–280.

Accepted in 06.10.98



## Влияние охлаждения на структурно-функциональное состояние обновляющихся клеток желудочно-кишечного тракта

В. Ф. КОЗЛОВА, Т. Н. ЮРЧЕНКО, М. И. ЩЕТИНСКИЙ

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

## Cooling Effect on Structural and Functional State of Renewed Gastroenteric Tract Cells

V. F. KOZLOVA, T. N. YURCHENKO, M. I. SCHETINSKY

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

Для обновляющихся тканей желудочно-кишечного тракта характерна клеточная форма регенерации с наличием всех частей дифферона. Низкие температуры в диапазоне криоустойчивости структур влияют на внутри- и междифферонные взаимоотношения клеток, активизируют ДНК-синтезирующую способность камбиальных элементов слизистых оболочек желудка и кишечника с последующей их пролиферацией, миграцией, дифференциацией и полным восстановлением органов после криодеструкции.

Для оновлюваних тканий шлунково-кишкового тракту характерна клітинна форма регенерації з наявністю всіх частин диферону. Низькі температури в діапазоні криостійкості структур впливають на внутрішньо- і міждиферонні взаємозв'язки клітин, активізують ДНК-синтезуючу здатність камбіальних елементів слизових оболонок шлунку і кишечника з подальшою їх проліферацією, міграцією, диференціацією і повним відновленням органів після криодеструкції.

For renewed tissues of gastroenteric tract a cellular form of regeneration is characteristic in the presence of all differone parts. Low temperatures in the range of structure cryoresistance affect intra- and interdifferone interactions of cells, activate DNA-synthesizing ability of cambial elements of mucous membranes of stomach and intestine with following their proliferation, migration, differentiation and a complete recovery of organs after cryodestruction.

При исследовании влияния охлаждения на состояние различных тканей как филогенетически сложившихся систем гистологических элементов, объединенных общей структурой, функцией и происхождением [2], важным моментом является учет их пролиферативной способности, поскольку именно характер клеточной популяции и особенности регенерации обуславливают развитие комплекса компенсаторно-приспособительных процессов в органах и возможность полного или неполного восстановления биообъектов после повреждения.

В настоящее время по типу регенерации [2, 9] принята следующая классификация тканей:

1) статические, или стабильные (миокард, ганглиозные клетки центральной нервной системы), высокой специализации, утратившие способность к делению (для них характерна только внутриклеточная форма регенерации);

2) растущие (печень, почки, легкие, скелетные и гладкие мышцы, вегетативная нервная система, эндокринные органы, поджелудочная железа), также высокоспециализированные, преимущественно с внутриклеточной формой регенерации, но в определенных экстремальных ситуациях способные к размножению и дифференциации;

3) обновляющиеся, или лабильные с клеточной формой регенерации (эпидермис, слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, мочеполовой системы, а также эндотелий,

When studying a cooling effect on the state of various tissues as phylogenetically settled systems of histological elements, combined by a general structure, function and origin [2], an important moment is taking into consideration their proliferative ability, since this character of cellular population and regeneration peculiarities stipulate the development of the complex of compensatory and adaptive processes in organs and possibilities of a complete or incomplete recovery of bioobjects after a damage.

Nowadays according to the type of regeneration [2, 9] the following classification of tissues was assumed:

1) static or stable (myocardium, ganglionic cells of central nerve system), high specialization, which lost the ability to divide (only intracellular form of regeneration is characteristic for them);

2) growing (liver, kidneys, lungs, skeletal and smooth muscles, vegetative nerve system, endocrinic organs, pancreas), as well as non-specialized, predominantly with intracellular form of regeneration, but in certain extreme situations capable to reproduction and differentiation;

3) renewed or labile with cellular form of regeneration (epidermis, mucuous membrane of gastroenteric tract, respiratory tract, urogenital system, as well as endothelium, mesothelium, crumb connective tissue, hemopoietic system).



мезотелий, рыхлая соединительная ткань, кровеносная система).

В физиологических условиях в слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта происходит естественное обновление структур, частые митозы и быстрое пополнение клеток начинают превышать потребность в них, что приводит к гибели части клеток и выведению их из ткани. При этом клеточная потеря уравнивается новообразованием клеток или продукция клеток слегка превышает их гибель. В обновляющихся тканях синхронно протекают процессы пролиферации, миграции и дифференциации, а также отторжения и гибели клеток, завершающих свой жизненный цикл [2, 9, 10].

В криобиологических ситуациях большое значение имеет клеточно-дифференциальный состав органов, определяющий характер деструкции и тип гистогенеза с преобладанием клеточной, внутриклеточной или смешанной форм регенерации соответственно для обновляющихся, стабильных и растущих тканей. Клеточный дифферон — это гистогенетический ряд клеток, в котором по степени пролиферативной активности условно выделяют камбиальную, среднюю дифференцирующуюся и конечную (высокоспециализированную) части [2, 4]. Для обновляющихся тканей характерна клеточная форма регенерации с одновременным наличием всех частей дифферона. Для регуляции протекающих процессов важно определить, на какой участок дифферона и каким образом действуют низкие температуры.

Адекватной моделью для изучения всех параметров спектра взаимодействия холода с биообъектом является локальное криовоздействие *in situ*, при котором согласно температурному профилю на разных расстояниях от места криоапликации выделяют три зоны охлаждения с повреждающим, стимулирующим и гипометаболическим эффектами [5, 7, 8].

Цель настоящего исследования — изучение особенностей локального действия низких температур *in situ* на морфофункциональное состояние обновляющихся тканей желудочно-кишечного тракта.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. Всем животным под эфирным наркозом после лапаротомии рассекали желудок по большой кривизне пищеводной части. В первой серии опытов криовоздействие на слизистую оболочку фундальной части желудка наносили в течение 180 с криоапликатором (диаметром 2 мм), охлажденным жидким азотом до температуры  $-84^{\circ}\text{C}$ . Термографический контроль во время операции выполняли с помощью трех медь-константовых термодатчиков, смонтированных в специальную подложку круглой формы и расположенных друг от друга на расстоянии 2 мм, начиная от центра. Показания регистрировали самописцем К-399. Животных забивали путем декапитации под легким эфирным наркозом. Материал (стенку желудка и прилежащий к ней участок двенадцати-

Under physiological conditions a natural renewal of structures occurs, frequent mitoses and rapid enlargement of cells begin to exceed the need in them, that results to the death of the part of the cells and their release from a tissue. In this case cellular loss is compensated by new formation of cells or the production of cells slightly exceeds its death. In renewing tissues the processes of proliferation, migration and differentiation, as well as rejection and death of the cells, completing their vital cycle take place [9, 10].

In cryobiological situations a cellular-different composition of the organs, determining the character of destruction and the type of histogenesis with a predomination of cellular, intracellular or combined forms of regeneration correspondingly for renewing, stable and growing tissues, has a great value. Cellular different is histogenetic row of cells, where on the extent of proliferative activity a cambial, middle differentiating and final (highly specified) parts are defined [2, 4]. For renewing tissues a regeneration cellular form with simultaneous existence of all different parts is characteristic one. For the regulation of proceeding processes it is important to determine what different site is affected by low temperatures and the way of this effect.

Local cryoeffect *in situ* is an adequate model for the studying of all the parameters of cold interaction spectrum with an bioobject, at which according to a temperature profile three cooling zones with damaging, stimulating and hypermetabolic effects are found at different distance from the cryoapplication location [5, 7, 8].

The aim of given investigation is the study of peculiarities of local low temperature effect *in situ* on morphofunctional state of renewing tissues of gastroenteric tract.

The experiments were carried out in white breedless male rats of 180–220 g. All animals under ether narcosis after laparotomy the stomach was dissected along esophageal part greater curvature. In the first series of experiments a cryoeffect on mucous membrane of stomach fundal part was applied within 180 sec by means of cryoapplicator (2 mm diameter), cooled by a liquid nitrogen down to the temperature of  $-84^{\circ}\text{C}$ . Thermographic control during the operation was accomplished by means of three copper-constantan thermocouples, mounted into a round special base and located in the 2 mm distance from each other, beginning from the center. The data were recorded by means of the K-399 recorder.

Animals were decapitated under a light ether narcosis. The material (stomach wall and adjacent duodenal site) was taken for morphological investigations in 1 and 24 hrs, as well as in 7, 14, 30, 60 and 90 days after cryoeffect, taking into account main phases of destructive-recovering processes. The control group consisted of stomach-operated animals but without cryoeffect. The material for histological and histochemical investigations was obtained at the same



лудка и прилежащий к ней участок двенадцатиперстной кишки) для морфологических исследований отбирали через 1 и 24 ч, а также через 7, 14, 30, 60 и 90 сут после криовоздействия с учетом основных фаз деструктивно-восстановительных процессов.

Контрольная группа состояла из животных, которым проведено оперативное вмешательство на желудке, но без криовоздействия. Материал для гистологических и гистохимических исследований брали в те же сроки, что и в первой серии опытов. Образцы органов фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Целлоидин-парафиновые срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, а также реактивом Шиффа и альциановым синим по Моури для определения гликопротеинов и гликозаминогликанов.

ДНК-синтезирующую способность клеток стенки желудка и кишечника изучали методом радиоавтографии на 30-е сутки после криовоздействия: животным контрольной и подопытной группы за 2 ч до забоя однократно внутривенно вводили  $^3\text{H}$ -тимидин в дозе 37 МБк/г массы тела (1 мКи/г) с молярной активностью 1 790 ТБк/моль (48 кКи/моль). Кусочки органов фиксировали в смеси Карнуа; целлоидин-парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с предварительной радиоавтографией мелкозернистой эмульсией типа М. Длительность экспозиции составила 3 недели. Радиоавтографы оценивали по показателям включения  $^3\text{H}$ -тимидина ядрами клеток указанных органов.

В результате проведенного исследования установлено, что в первой серии опытов после охлаждения температура стенок желудка животных под криоаппликатором снижалась до  $-28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  (зона I), на расстоянии 2 мм от его края — до  $-7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$  (зона II) и дистальнее следующих 2 мм (зона III) она достигала  $5,6 \pm 2,3^\circ\text{C}$ . Дозированное локальное криовоздействие на слизистую оболочку фундального отдела желудка вызывает четкую область замораживания всей толщи стенки желудка. После размораживания в ней отмечались геморрагии, отечность и повреждение тканей (рис. 1). В центре этой области, в основном в месте контакта ткани с криоаппликатором (зона I), в течение 24 ч развивается коагуляционный некроз с изъязвлением стенки желудка (рис. 2).

В первые часы после криовоздействия гистологически определялись альтерации покровного эпителия, клеток перешейка, шейки и дна желез фундального отдела желудка. Они носили некробиотический характер и выражались в изменении клетками тинкториальных свойств, гомогенизации и набухании цитоплазмы, кариорексисе и лизисе. При этом наблюдались артериальное и венозное полнокровие, стазы, тромбозы и кровоизлияния. В результате повышения сосудистой проницаемости в окружающую среду активно происходили экссу-

terms that in the first series of experiments. The samples of organs were fixed in 10%-solution of neutral formalin. Celloidin-paraffin sections of 7  $\mu\text{m}$  width were stained by Erlich hematoxylin and eosin, as well as Schiff reagent and alcian blue on Moury for the determination of glycoproteins and glycosaminoglycans. DNA-synthesizing ability of stomach wall and intestine cells were studied by the method of radioautography to the 30th day after cryoeffect: animals of the control and experimental groups in 2 hrs before slaughtering were once intraperitoneally injected with  $^3\text{H}$ -thymidine in the dose of 37 MBk/g of body mass (1  $\mu\text{Ci/g}$ ) with molar activity of 1 790 TBk/M (48 kCi/M). Pieces of the organs were fixed in the Carnua mixture; celloidin-paraffin slices of 5  $\mu\text{m}$  width were stained by hematoxylin and eosin with preliminary radioautography by finely grained emulsion of M type. The exposure duration made 3 weeks. Radioautographs were estimated by the indices of  $^3\text{H}$ -thymidine inclusion by cellular nuclei of the organs mentioned.

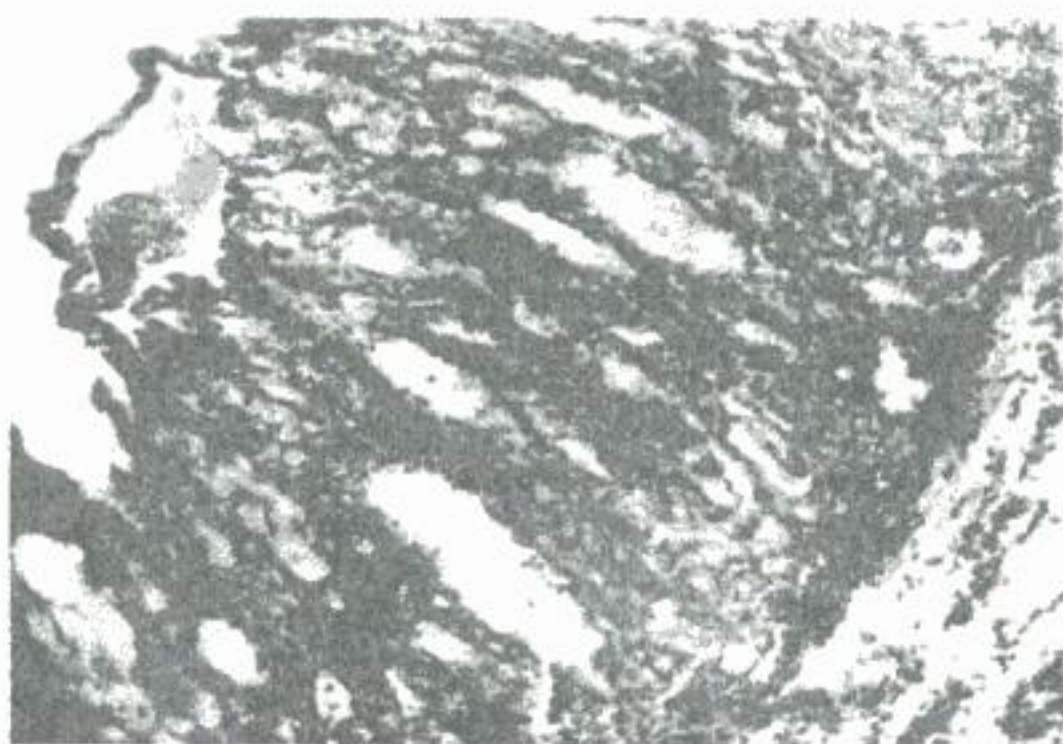
In the result of conducted investigation it has been established that in the first series of experiments after cooling the temperature of animals' stomach walls under cryoapplicator decreased down to  $-28.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$  (zone I), at the distance of 2 mm of its edge — down to  $-7.7 \pm 2.3^\circ\text{C}$  (zone II), at the distance of the next 2 mm (zone III), it reached  $5.6 \pm 2.3^\circ\text{C}$ . Dosed local cryoeffect on mucous membrane of fundal stomach part causes the appearance of a distinct region of freezing of the whole stomach wall width. After freeze-thawing hemorrhages, oedema and damage of tissues were found in it (Fig. 1). In this range center mainly in the site of tissue contact with cryoapplicator (zone I) during 24 hrs a coagulation necrosis with stomach wall ulceration develops (Fig. 2).

In the first hours after cryoeffect the alterations of covering epithelium, isthmus cells, neck and glands' fundus of stomach fundal part were histologically determined. They had necrobiotic character and represented the change in tinctorial properties by cell, homogenization and swelling of cytoplasm, karyorhexis and lysis. In this case we observed arterial and venous plethora, stases, thromboses and bleedings. In the result of an increase in vascular permeability into an environment the plasma exudation and emigration of blood form elements occurred.

In submucous base and muscular membrane a large number of young alcyonophylic labrocytes, glycosaminoglycans accumulated, tissue oedema developed, physiological balance of main substance of connective tissue impaired. However on a general background of alternative changes the cells of connective tissue were relatively cryoresistant.

To the end of the first day in the zone I a total cryonecrosis of mucous membrane and partially submucous base, limited by leucocyte torus from sublaying tissue, developed. Infiltration of necrotic mass





**Рис. 1.** Геморрагии, отечность и повреждение слизистой оболочки желудка после локального замораживания-размораживания. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 1.** Hemorrhage, oedema and damage of gastric mucous membrane after local freeze-thawing. Hematoxylin and eosin staining,  $\times 90$

дация плазмы и эмиграция форменных элементов крови.

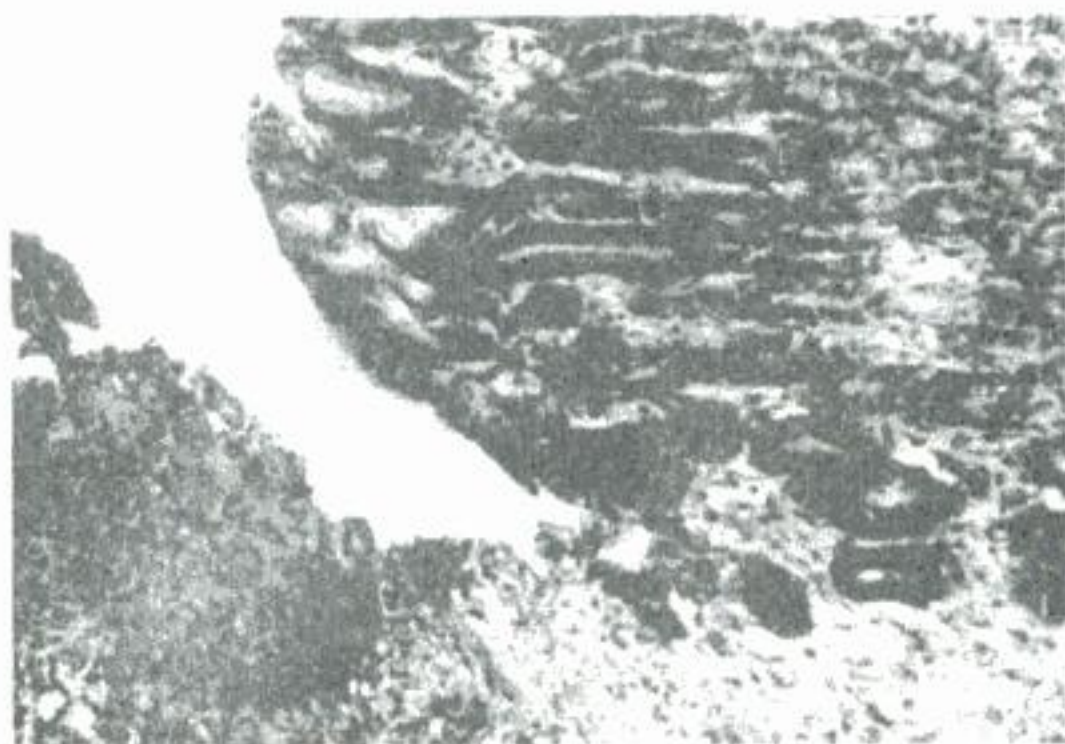
В подслизистой основе и мышечной оболочке накапливалось большое количество молодых альцианофильных лейкоцитов, гликозаминогликанов, развивался отек тканей, нарушалось физиологическое равновесие основного вещества соединительной ткани. Однако на общем фоне альтеративных изменений клетки соединительной ткани были относительно криоустойчивы.

К концу первых суток в зоне I развивался тотальный крионекроз слизистой оболочки и частично подслизистой основы, ограниченный от подлежащей ткани лейкоцитарным валом. Происходила инфильтрация некротической массы (рис. 3) и в меньшей мере окружающей ткани полиморфоядерными лейкоцитами (ПЯЛ).

В зоне II, где температура ткани при криовоздействии достигала  $-7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$ , в течение первых суток некробиозу подвергался только покровный эпителий. Дистрофические изменения париетальных, слизистых, а также главных и энтероэндокринных клеток фундальных желез желудка носили обратимый характер.

В слизистом секрете покровного эпителия и щечных клеток, в обычных условиях богатых гликопротеинами, преобладали гликозаминогликаны. Мукоидному набуханию подвергалась соединительно-тканная основа собственной пластинки слизистой оболочки желудка с накоплением гликозаминогликанов и плазменных белков, гидратацией и отечностью основного вещества, хотя многие компоненты рыхлой волокнистой соединительной ткани (фибробласты, лейкоциты, плазматические и другие клетки) оставались без видимых изменений.

В отдаленной зоне III, температура в которой снижалась до  $5,6 \pm 2,3^\circ\text{C}$ , в основном нарушались микроциркуляция и кровенаполнение сосудов стенки желудка, эпителиальные структуры не отличались от контроля.



**Рис. 2.** Коагуляционный некроз и изъязвление стенки желудка в месте контакта ткани с криоапликатором через сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 2.** Coagulation necrosis and ulceration of gastric wall in the site of tissue contact with cryoapplicator in 1 day after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining,  $\times 90$

(Fig. 3) and in a less extent surrounding tissue by polymorphonuclear leucocytes (PNL) took place.

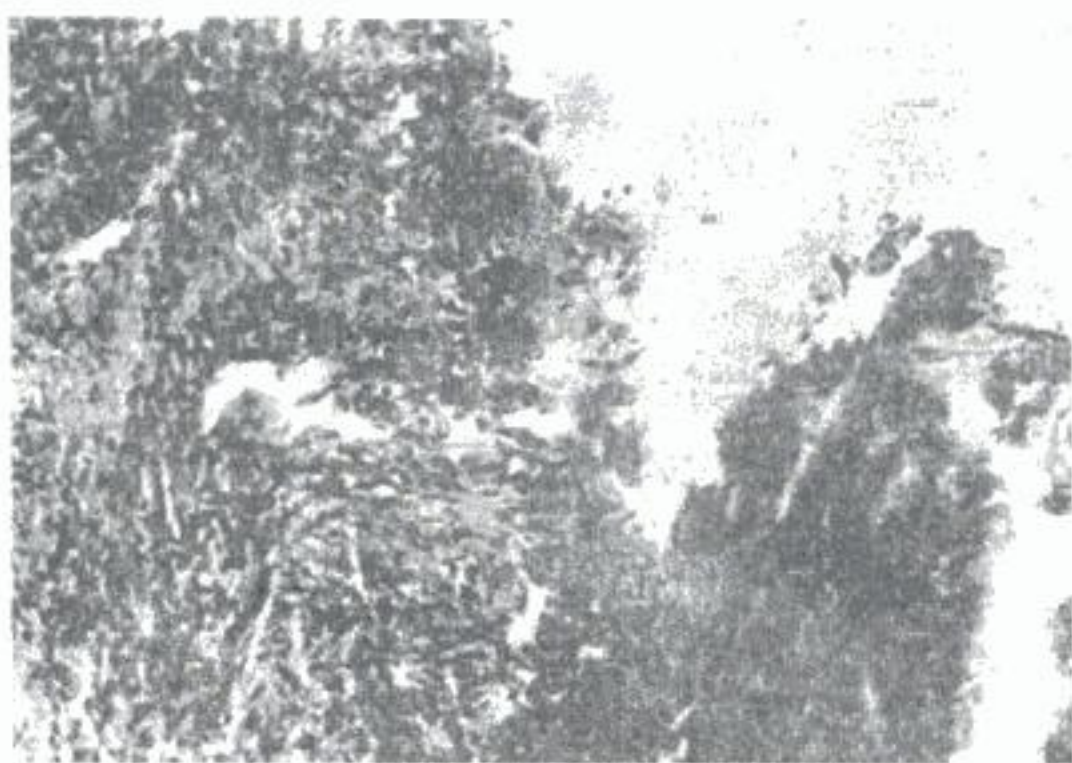
In the zone II, where the tissue temperature at cryoeffect reached  $-7.7 \pm 2.3^\circ\text{C}$  during the first day only covering epithelium was subjected to necrosis. Dystrophic changes of parietal, mucous, as well as main and enteroendocrine cells of stomach fundal glands had a reversible character.

In a mucous secretion of covering epithelium and cervical cells under usual conditions rich with glycoproteins, glycosaminoglycans predominated. Connective tissue base with of own plate of stomach mucous membrane with the accumulation of glycosaminoglycans and plasm proteins, hydration and oedema of main substance, although many components of crumb fibrous connective tissue (fibroblasts, leucocytes, plasm and other cells) remained without any visible changes.

In remote zone III the temperature in which reduced down to  $5.6 \pm 2.3^\circ\text{C}$  mainly the microcirculation and blood filling of stomach wall vessels impaired, epithelial structures did not differ from the control.

To the 7th day the zone I reduced in the dimensions, the ulceration with the diameter of  $1.05 \pm 0.06$  mm had an even roundish edges and was localized in a mucous membrane and submucous base, meanwhile almost complete mutilation of necrotic masses with destroyed PNL took place and ulcer edge epithelization began. Under the effect of proteolytic PNL enzymes also the tissue lysis and its phagocytosis by multiple macrophages, including siderophages, were observed, a big number of young labrocytes appeared. From the side of submucous base granulation tissue rich with cellular elements intensively developed. All this testifies to a typical and not complicated course of inflammation in tomach wall tissue and a rapid transfer of alternative and excudative phases into proliferative one.





**Рис. 3.** Лейкоцитарная инфильтрация некротической массы стенки желудка зоны I через сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 3.** Leucocyte infiltration of necrotic mass of stomach wall of the zone I in 24 hrs after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$

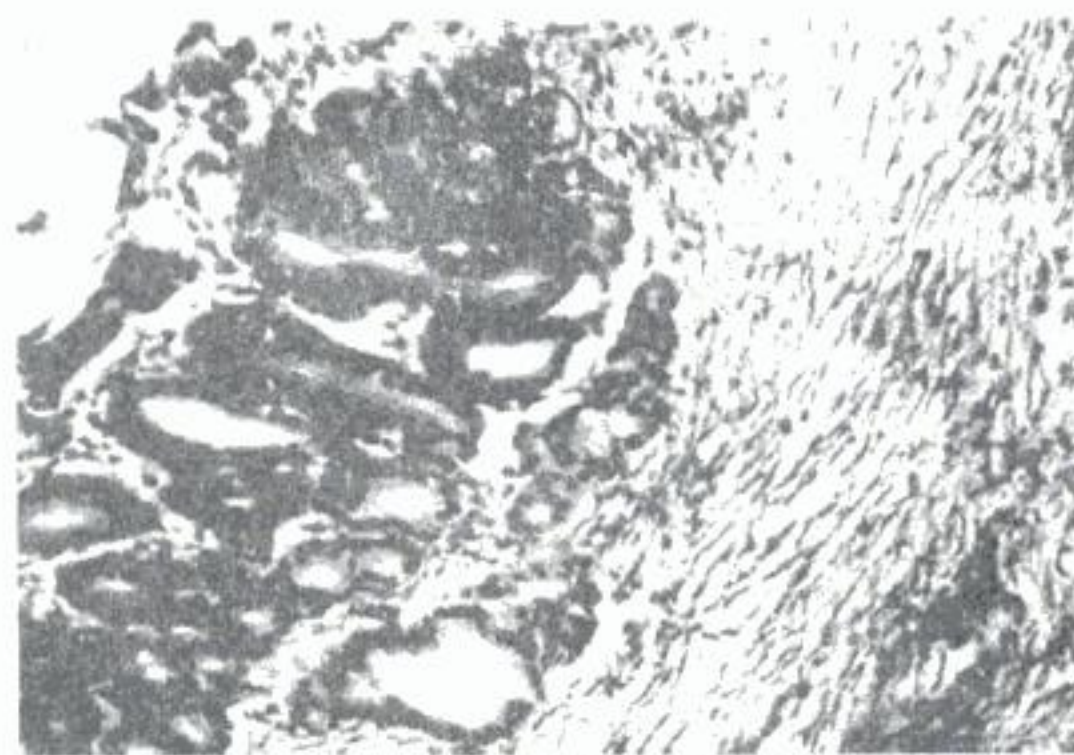
На 7-е сутки наблюдений зона I уменьшалась в размерах, изъязвление диаметром  $1,05 \pm 0,06$  мм имело ровные округлые края и локализовалось в слизистой оболочке и подслизистой основе, причем происходила почти полная мутляция некротических масс с разрушившимися ПЯЛ и начиналась эпителизация края язвы. Под влиянием протеолитических ферментов ПЯЛ наблюдался также лизис ткани и ее фагоцитоз многочисленными макрофагами, в том числе сидерофагами, появлялось большое количество молодых лаброцитов. Со стороны подслизистой основы интенсивно развивалась грануляционная ткань, богатая клеточными элементами. Все это свидетельствует о типичном и неосложненном течении воспаления в тканях стенки желудка и быстром переходе альтеративной и экссудативной фаз в пролиферативную.

Процессы пролиферации тканей наиболее выражены в прилежащей к крионекрозу зоне II. В слизистой оболочке наблюдались гипертрофия, гиперплазия всех эпителиальных элементов, клеток соединительной и мышечной тканей (рис. 4), что проявлялось в усиленном делении клеток перешейка и шейки фундальных желез, обновлении покровного эпителия и его наслоении на края изъязвления. При этом слизистые клетки вырабатывали большое количество мукоидного секрета, в котором преобладали гликозаминогликаны (ГАГ). Известна защитная роль ГАГ от повреждений для делящихся клеток. Поэтому их появление в генеративной зоне можно рассматривать как адаптационную реакцию, направленную на сохранение пула молодых клеток. ГАГ накапливались также в основном веществе собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы, что обуславливало повышение тканевой и сосудистой проницаемости, гидратацию тканей и эмиграцию клеток крови из сосудистого русла. Реактивное состояние соединительно-тканых элементов собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы развивалось и в более отдаленных участках стенки желудка при от-

Tissue proliferation processes are the most manifested in cryonecrosis-adjacent zone II. In mucuous membrane hypertrophy, hyperplasia of all epithelial elements, cells of connective and muscular tissues were observed (Fig. 4), that was manifested in intensified cell division of isthmus and fundal gland neck, renewal of covering epithelium and its stratification on the edges of ulceration. In this case mucuous cells produced a large number of mucuos secretion, where glycosamineglycans (GAG) predominated. Protective role of GAG against damage for dividing cells is known. Therefore their appearance in generative zone can be considered as adaptational response, directed to the preservation of young cells pool. GAG were also accumulated in main substance of own plate of mucuous membrane and submucuous base, that stipulated an increase in tissue and vascular permeability, tissue hydration and blood cell emigration from the vascular channel. Reactive state of connective tissue elements of own plate of mucuous membrane and submucuous base developed even in more remote sites of stomach wall at relatively stable state of epithelial elements.

To the 14th day the fundis and edges of ulceration were filled by maturing, rich with collagenous fibres granulation tissue, covered with stratified epithelium. We should pay an attention to the possibility of regeneration only at a proper epithelial and connective tissue interaction, since only at normal development and essential maturation of granulations an epithelial tissue may be completely recovered.

In the zone I the division, emigration and differentiation of epithelial cells, forming simple tubular glands, were observed. Mucuous membrane in given period had simplified, intestine type of structure (Fig. 5). Mucuous cells similar to goblet-like intestine cells, produced a secretion rich with glycoproteins and glycosamineglycans. In the zone II hyperplasia of covering epithelium, compensatory hypertrophy of fundal gland cells were noted and they gained the



**Рис. 4.** Гипертрофия и гиперплазия клеток эпителиальной, соединительной и мышечной тканей стенки желудка зоны II на 7-е сутки после криоапликации. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 4.** Hypertrophy and hyperplasia of cells of epithelial, connective and muscular tissue of gastric wall Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$



носителем стабильном состоянии эпителиальных элементов.

К 14-м суткам дно и края изъязвления заполнялись созревающей, богатой коллагеновыми волокнами грануляционной тканью, покрытой наслонившимся эпителием. Следует обратить внимание на возможность регенерации при соответствующем эпителиально-соединительно-тканном взаимоотношении, так как только при нормальном развитии и достаточном созревании грануляций может полностью восстановиться эпителиальная ткань.

В зоне I наблюдались деление, эмиграция и дифференцировка эпителиальных клеток, формирующих простые тубулярные железы. Слизистая оболочка в данный период имела упрощенный, кишечный тип строения (рис. 5). Слизистые клетки, подобно бокаловидным клеткам кишечника, вырабатывали секрет, богатый гликопротеинами и гликозаминогликанами.

В зоне II отмечались гиперплазия покровного эпителия, компенсаторная гипертрофия клеток фундальных желез и они приобретали вид кистообразных расширений (рис. 6). Слизистые клетки выделяли большое количество мукоидного секрета.

На 14-е сутки во всех зонах стенки желудка происходило выравнивание кислотно-основного равновесия основного вещества соединительной ткани, что выражалось в уменьшении альцианофильных и появлении Шифф-положительных элементов и свидетельствовало о замене ГАГ гликопротеинами. При этом снижались ацидоз и гидрофильность тканей, а также сосудисто-тканевая проницаемость, происходили усиленная пролиферация клеток соединительной ткани и гипертрофия мышечной. Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистая основа были богаты фибробластами, лимфоцитами, макрофагами и лаброцитами.

Таким образом, изменения морфофункционального состояния тканей всей стенки желудка, на-

view of cyst-like extensions (Fig. 6). Mucous cells produced a great quantity of mucoïd secretion.

To the 14th day in all zones of stomach wall a levelling of acid-base balance of main substance of connective tissue, that was manifested in a decrease of alcianophilic and appearance of Schiff-positive elements and testified on the GAG replacement by glycoproteins. In this case acidosis and hydrophilicity of tissues reduced, as well as vascular tissue permeability did, an intensified proliferation of cells of connective tissue and hypertrophy of muscular ones took place. Own plate of mucous membrane and submucos base were rich with fibroblasts, lymphocytes, macrophages and labrocytes.

Thus the changes in morphofunctional state of tissues and all stomach wall observed to the 14th days after cryoeffect reflect an intensified development of the processes of recovery and compensation of impaired structures and their incompleteness, that causes the necessity of conducting the further investigations with the prolongation of observation terms and with profound studying the proliferative activity of stomach cells by means of new methodical approaches, including DNA-synthesizing ability of gastroenteric tract cells.

As following investigations showed, to the 30th day a cryonecrosis organization occurred. Mature granulation tissue, decreasing in its size, transferred into a smooth scarry one. Reparative regeneration not only of covering epithelium and glands of mucous membrane, but also elements of connective and muscular tissues of lower laying layers were observed. On morphofunctional state recovered mucous membrane of the zone I with signs of compensatory hypertrophy resembled corresponding membrane of the zone II to the 7th day after cryoeffect (Fig. 7). Its epithelial elements renewal occurred due to the proliferation of cells of isthmus and upper part of fundal gland neck, that was confirmed by the data of historadioautography. Major number (80–90%) of labelled  $^3\text{H}$ -thymid-



**Рис. 5.** Кишечный тип строения слизистой оболочки желудка зоны I на 14-е сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 5.** Intestinal type of gastric mucous membrane of the 1st zone to the 14th day after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$



**Рис. 6.** Кистообразное расширение фундальных желез желудка в зоне II на 14-е сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 6.** Cyst-like widening of gastric fundal glands in the IInd zone to the 14th day after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$



блюдаемые на 14-е сутки после криовоздействия, отражают усиленное развитие процессов восстановления и компенсации нарушенных структур и их незавершенность, что вызывает необходимость проведения дальнейших исследований с продлением сроков наблюдений и с углубленным изучением пролиферативной активности клеток желудка с помощью новых методических подходов, включая ДНК-синтезирующую способность клеток желудочно-кишечного тракта.

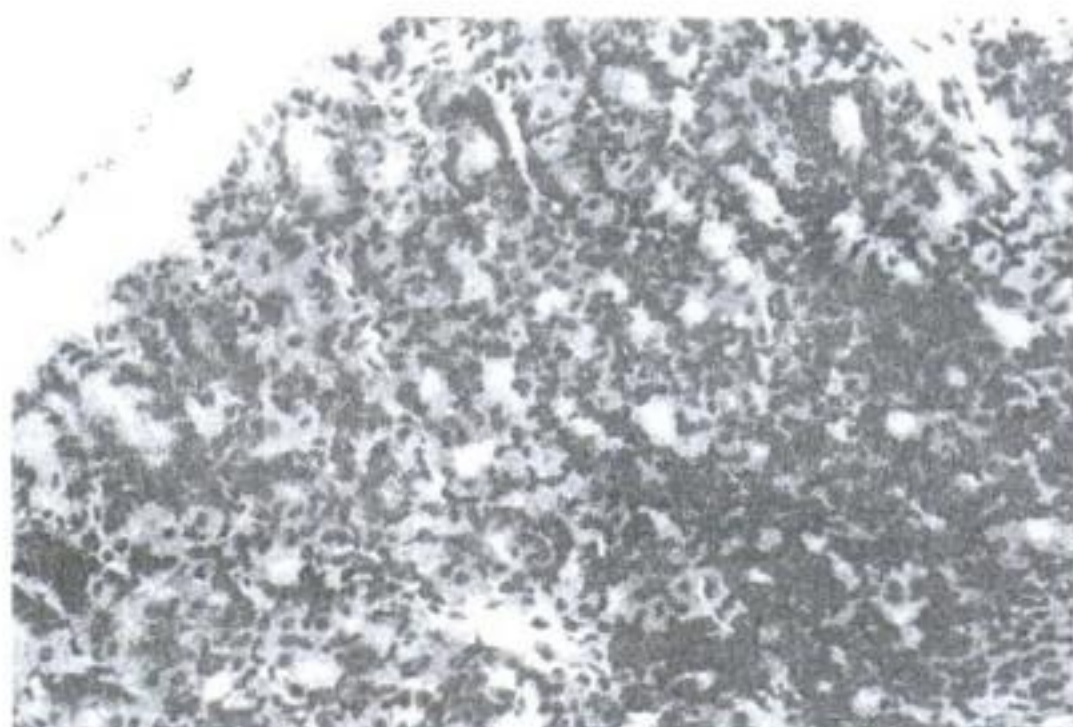
Как показали дальнейшие исследования, на 30-е сутки происходила организация крионекроза. Созревшая грануляционная ткань, уменьшаясь в размерах, превращалась в нежную рубцовую. Наблюдалась репаративная регенерация не только покровного эпителия и желез слизистой оболочки, но и элементов соединительной и мышечной тканей нижележащих слоев. По морфофункциональному состоянию восстановленная слизистая оболочка зоны I с признаками компенсаторной гипертрофии напоминала соответствующую оболочку зоны II на 7-е сутки после криовоздействия (рис. 7). Обновление ее эпителиальных элементов происходило за счет пролиферации клеток перешейка и верхней части шейки фундальных желез, что подтвердили данные гисторадиоавтографии. Основное количество (80–90%) меченных  $^3\text{H}$ -тимидином клеток находились в этой камбиальной, или генеративной зоне (рис. 8). В ней преобладали низкодифференцированные клетки, а также были выявлены гликопротеины и гликозаминогликаны, обеспечивающие защиту делящихся клеток от повреждения.

На 30-е сутки наблюдалось полное восстановление тканей слизистой оболочки в зоне II. Однако в ней все еще протекали более интенсивные биосинтетические процессы, в том числе синтез ДНК был больше, чем в зонах II и III. Индекс меченных  $^3\text{H}$ -тимидином ядер равнялся  $12,5 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,05$ ). Зона локализации таких клеток несколько расширена как в направлении поверхности слизистой

ine cells were in this cambial or regenerative zone (Fig. 8). Low differentiated cells predominated in it, as well as glycoproteins and glycosamineglycans, providing the protection of dividing cells against a damage, were revealed.

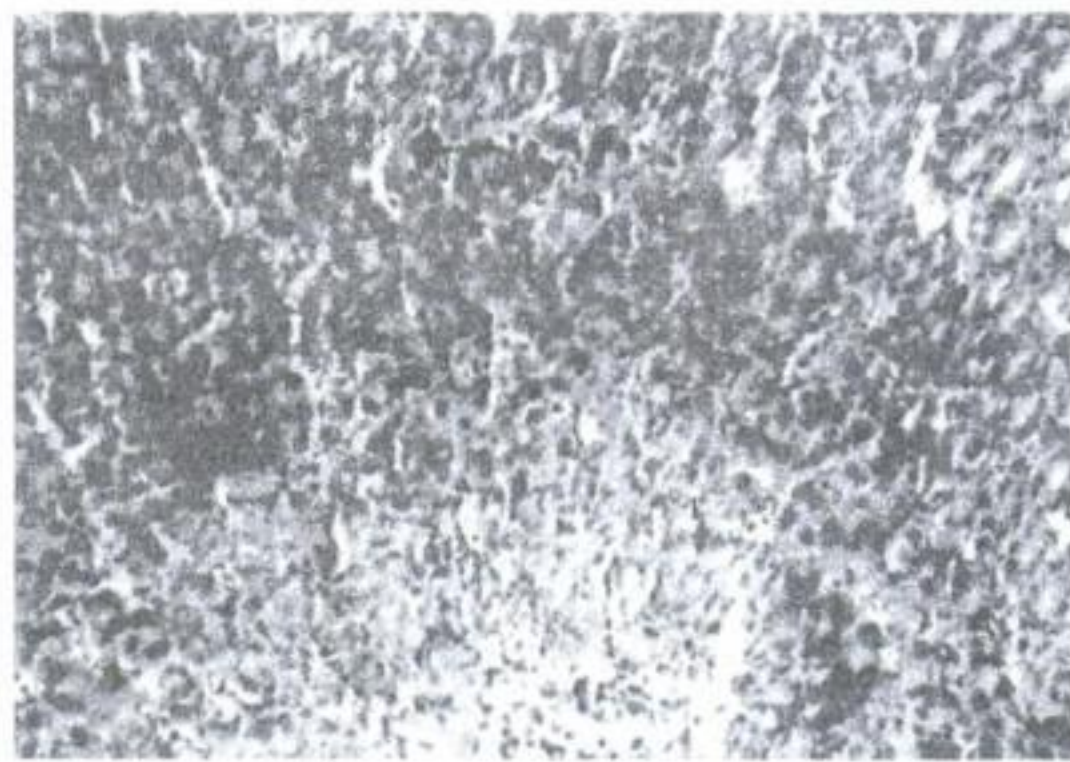
To the 30th day we observed a complete recovery of mucous membrane tissues in the zone II. However more intensive biosynthetic process were still in progress in it, including DNA synthesis was higher, than in the zones I and III. The index of  $^3\text{H}$ -thymidine labelled nuclei was equal to  $12.5 \pm 0.8\%$  ( $p < 0.05$ ). Localization zone of these cells is slightly widened both in the direction of mucous membrane surface and into the region of stomach fundal glands (Fig. 9). If now the sources of tumors, emigration ways and occurring at this differentiation, as well as involution and extrusion of covering epithelium are well studied and do not cause the contradictions, then in respect of the rest cells, forming fundal glands, common notions are absent. Our data confirm the view [1, 9, 11], that from generative zone the  $^3\text{H}$ -thymidine labelled cells migrate in two opposite directions: one type of them to the stomach surface, another one — to the fundus of fundal glands, simultaneously being subjected to differentiation correspondingly into surface epitheliocytes (mucocytes), other — into main and parietal cells of stomach fundal glands. Replenishment of the rest ones is generally accomplished by the differentiation from the cells-precursors, although the way of self-renewal is not excluded, since in our experiments in these cells the figures of mitosis were found. Probably, it is related to stimulating effect of low temperatures and one more proves an important role of structural components of the adjacent zone II in the processes of reparative regeneration of tissues even at its final stage.

In the zone III a stomach mucuous membrane has a characterstic structure, DNA-synthesizing ability of cells is slightly higher ( $10.7 \pm 0.3\%$ ), than in the zone I



**Рис. 7.** Восстановленная слизистая оболочка желудка зоны I на 30-е сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 7.** Recovered gastric mucuous membrane of the 1st zone to the 30th day after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$



**Рис. 8.** Меченные  $^3\text{H}$ -тимидином клетки камбиальной зоны слизистой оболочки желудка на 30-е сутки после криовоздействия. Гисторадиоавтография.  $\times 90$ .

**Fig. 8.**  $^3\text{H}$ -thymidine labelled cells of cambial zone of gastric mucuous membrane to the 30th day after cryoeffect. Historadioautography.  $\times 90$



оболочки, так и в область фундальных желез желудка (рис. 9). Если в настоящее время источники новообразования, пути эмиграции и происходящей при этом дифференциации, а также инволюции и экстрюзии поверхностного эпителия хорошо изучены и разногласий не вызывают, то в отношении остальных клеток, образующих фундальные железы, общепринятые представления отсутствуют. Наши данные подтверждают мнение [1, 9, 11], что из генеративной зоны меченные  $^3\text{H}$ -тимидином клетки мигрируют в двух противоположных направлениях: одни к поверхности желудка, другие — ко дну фундальных желез, одновременно подвергаясь дифференциации, соответственно в поверхностные эпителиоциты (мукоциты), а также в главные и париетальные клетки фундальных желез желудка. Пополнение последних осуществляется главным образом путем дифференциации из клеток предшественников, хотя не исключен и путь самообновления, поскольку в наших экспериментах в этих клетках встречались фигуры митоза. По всей вероятности, это связано со стимулирующим действием низких температур и доказывает важную роль структурных компонентов прилежащей зоны II в процессах репаративной регенерации тканей даже на ее завершающем этапе.

В зоне III слизистая оболочка желудка имеет характерное строение, ДНК-синтезирующая способность клеток несколько выше ( $10,7 \pm 0,3\%$ ), чем в зоне I и в контроле, но разница статистически недостоверна ( $p > 0,05$ ). Таким образом, в исследуемый период во всех зонах слизистая оболочка характеризовалась типичными для желудка железистым строением и высокой функциональной активностью. По качественному составу ее мукоидный секрет, как и в контроле, содержал смесь гликопротеинов и гликозаминогликанов, что свидетельствовало о полноценном защитном компоненте слизистой оболочки желудка (рис. 10). Наряду с этим, в глубоко лежащих слоях стенки



**Рис. 9.** Расширение зоны локализации меченных  $^3\text{H}$ -тимидином клеток за счет их эмиграции в разных направлениях слизистой оболочки желудка. Гисторадиоавтография.  $\times 90$ .

**Fig. 9.** Widening of the localization zone of  $^3\text{H}$ -thymidine labelled cells due to their emigration in different directions of gastric mucous membrane. Histoautoradiography.  $\times 90$

and in the control, but the difference is statistically not true ( $p > 0.05$ ). Thus in the studied period a mucous membrane in all zones was characterized by typical for a stomach glandular structure and a high functional activity. On qualitative content its mucoid secretion as well as in the control contained the mixture of glycoproteins and glycosamineglycanes, that testified to a integral protective component of stomach mucous membrane (Fig. 10). Together with this in deeply laying layers of stomach wall even to the 30th day after cryoeffect the signs of inflammatory reaction as leucocyte-macrophage infiltration of tissues of submucous and muscular membranes were revealed (Fig. 11). To the 2–3 months' term a complete organization and epithelization of the cryodestruction zone and normalization of morphofunctional state of all stomach wall occurred.

In the duodenal wall after local cryoeffect no manifested alternative changes in all periods of observations were found. However in early terms (1–7 days) the vessels blood filling and lymphoid infiltration of own late of mucous membrane and submucous base, as well as intensified release of mucus by goblet-like cells and epithelium rejection of villi took place. In later terms (7–14 days) some increase in mitotic activity of cells crypts was noted. To the 30th day after cryoeffect morphofunctional state of duodenal mucous membrane reached the control level. In epithelium of mucous membrane of experimental animals an intensive DNA synthesis was observed, at this not only stem elements of villi, but also a majority of crypt cells (85–90%), including dividing ones, except goblet-like ones, were intensively labelled by  $^3\text{H}$ -thymidine. A large number of labelled cells of connective tissue of experimental animals villi was noted, that testified to their reactive state (Fig. 12).

Summarizing the results of experimental investigations, we can state, that local cryoeffect ( $t = -28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  and lower) causes a damage in



**Рис. 10.** Полноценный качественный и количественный состав мукоидного секрета слизистой оболочки желудка на 30-е сутки после криовоздействия. Окраска по Моруи.  $\times 90$ .

**Fig. 10.** Integral qualitative and quantitative composition of mucoid secret of gastric mucous membrane to the 30th day after cryoeffect. Staining by Moury.  $\times 90$



желудка даже на 30-е сутки после криовоздействия все еще выявлялись признаки воспалительной реакции в виде лейкоцитарно-макрофагальной инфильтрации тканей подслизистой и мышечной оболочек (рис. 11). К 2–3-месячному сроку происходили полная организация и эпителизация зоны криодеструкции и нормализация морфофункционального состояния всей стенки желудка.

В стенке двенадцатиперстной кишки после локального криовоздействия не обнаружено выраженных альтеративных изменений во все периоды наблюдения. Однако в ранние сроки (1–7-е сутки) имели место кровенаполнение сосудов и лимфоидная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы, а также усиленное выделение слизи бокаловидными клетками и отторжение эпителия ворсинок.

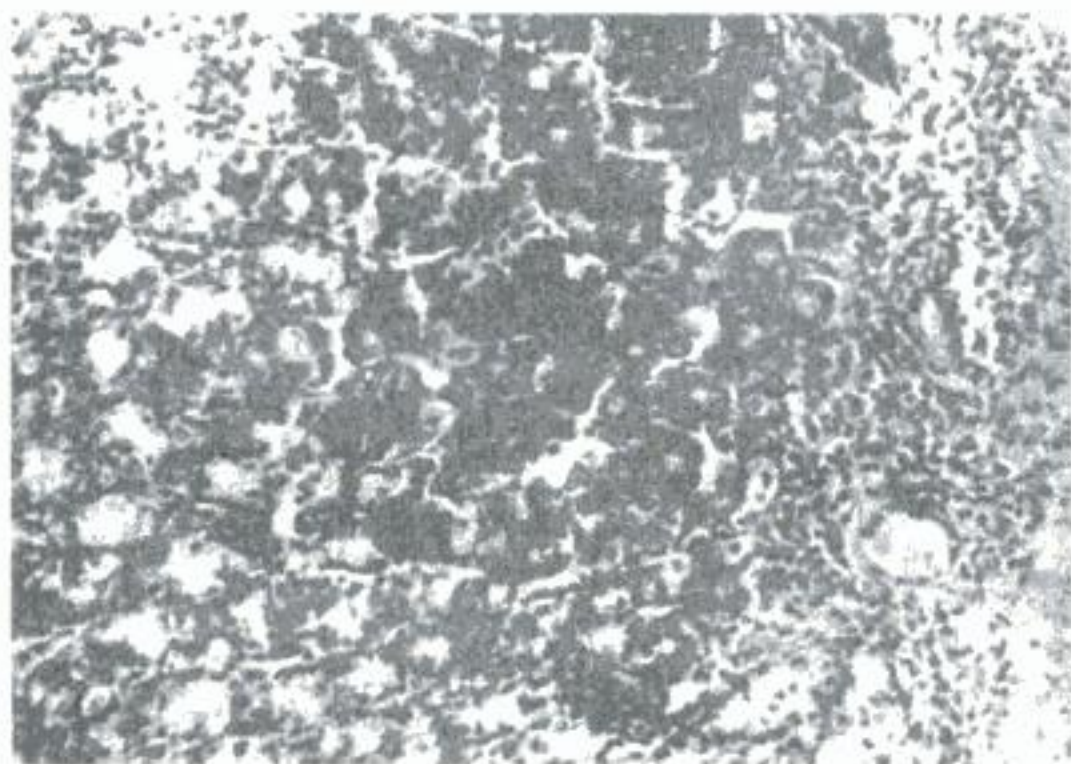
В более поздние сроки (7–14-е сутки) отмечалось некоторое повышение митотической активности клеток крипт. К 30-м суткам после криовоздействия морфофункциональное состояние слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки приближалось к уровню контроля. В эпителии слизистой оболочки подопытных животных наблюдался интенсивный биосинтез ДНК, при этом не только стволовые элементы ворсинок, к которым относят малодифференцированные цилиндрические клетки, но и большинство клеток крипт (85–90%), в том числе и делящиеся, кроме бокаловидных, интенсивно метились  $^3\text{H}$ -тимидином. Отмечалось большое количество меченых клеток соединительной ткани ворсинок подопытных животных, что свидетельствует об их реактивном состоянии (рис. 12).

Обобщая результаты экспериментальных исследований, можно утверждать, что локальное криовоздействие ( $t = -28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  и ниже) вызывает повреждение стенки желудка и развитие типичного неосложненного воспалительного процесса с быстрым переходом альтеративной и экссудативной фаз в пролиферативную. Источником репаративной регенерации эпителиальной ткани слизистой оболочки желудка в месте криодеструкции являют-

stomach wall and the development of typical non-complicated inflammatory process with a rapid transition of alternative and exudative phases into proliferative one. The source of reparative regeneration of epithelial tissue of stomach mucuous membrane in the site of cryodestruction are the cells of isthmus and neck of fundal glands of the adjacent zone ( $t = -7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$ ). Structures of this zone are characterized by non-lethal damages and more intensive biosynthetic and proliferative processes, including DNA-synthesizing ability of cells and an intensified function of glandular tissue. The obtained data are correlated with the results of studied and the hypothesis [10] of the tissue growth regulation, explaining an increase of proliferative activity of cells in the adjacent to cryonecrosis distinctly defined zone of stomach mucuous membrane of different concentration of keylons, acting mainly by not humoral way, but local one. We have noted the mediated stimulating low temperature effect in the range of  $-7.7 \pm 2.3^\circ\text{C}$  and higher on morphofunctional state of mucuos gastric and duodenal membranes, that was a ground for applying the mildest and most efficient cryotherapy of human duodenal peptic ulcers under clinical conditions [7].

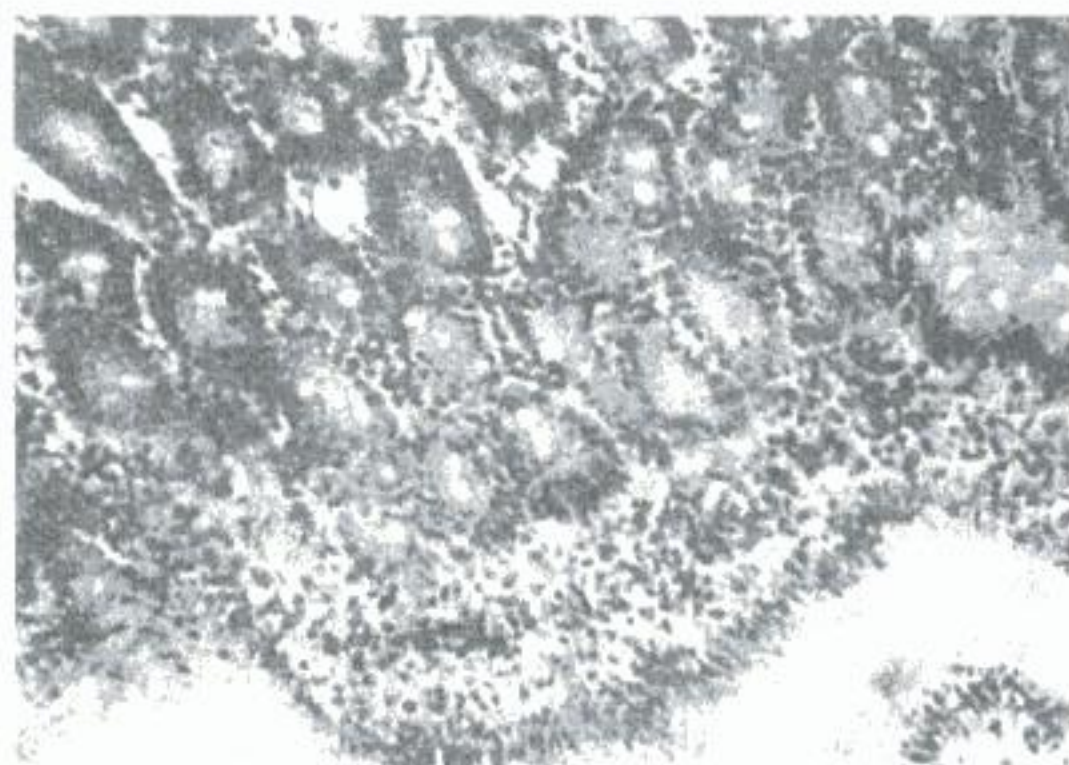
The hypothesis of "cryorenewal" [3, 6], according to which favorable stimulating effect is stipulated by the change in regulatory properties of cellular genome, causes a scientific interest.

We have established, that low temperatures in the range of cryoresistance of structures affect intra- and interdifferent interactions of renewed tissue cells, stimulate initial links of different by means of activation of DNA-synthesizing ability of cambial elements of mucuous gastric and duodenal membranes with following their proliferation and complete organ recovery.



**Рис. 11.** Лейкоцитарно-макрофагальная инфильтрация подслизистой основы стенки желудка на 30-е сутки после криовоздействия. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 90$ .

**Fig. 11.** Leucocyte-macrophage infiltration of submucous base of gastric wall to the 30th day after cryoeffect. Hematoxylin and eosin staining.  $\times 90$



**Рис. 12.** Интенсивная метка  $^3\text{H}$ -тимидином ядер клеток крипт и соединительной ткани ворсинок слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки на 30-е сутки после криовоздействия. Гисторадиоавтография.  $\times 180$ .

**Fig. 12.** Intensive labelling by  $^3\text{H}$ -thymidine of crypt cell nuclei of connective tissue of duodenal mucous membrane villi to the 30th days after cryoeffect. Historadioautography.  $\times 180$



ся клетки перешейки и шейки фундальных желез прилежащей зоны ( $t = -7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$ ). Структуры этой зоны характеризуются нелетальными повреждениями и более интенсивными биосинтетическими и пролиферативными процессами, в том числе ДНК-синтезирующей способностью клеток и усиленной функцией железистой ткани. Полученные данные согласуются с результатами исследований и гипотезой [10] регуляции роста тканей, объясняющей повышение пролиферативной активности клеток в прилежащей к крионекрозу четко ограниченной зоне слизистой оболочки желудка различной концентрацией кейлонов, которые действуют в большей мере не гуморальным путем, а локально. Нами отмечено опосредованное стимулирующее влияние низких температур в диапазоне  $-7,7 \pm 2,3^\circ\text{C}$  и выше на морфофункциональное состояние слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, что явилось обоснованием применения наиболее щадящей и эффективной криотерапии дуоденальных пептических язв человека в клинике [7].

Научный интерес вызывает гипотеза "криообновления" [3, 6], согласно которой благоприятное стимулирующее действие низких температур обусловлено изменением регуляторных свойств клеточного генома.

Нами установлено, что низкие температуры в диапазоне криоустойчивости структур влияют на внутри- и междифферонные взаимоотношения клеток обновляющихся тканей, стимулируют начальные звенья дифферона путем активизации ДНК-синтезирующей способности камбиальных элементов слизистых оболочек желудка и кишечника с последующей их пролиферацией и полным восстановлением органов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние охлаждения на структуру клетки / Под ред. Т. Н. Юрченко.— Киев: Наук. думка, 1992.— 147 с.
2. Гистология (введение в патологию) / Под ред. Э. Г. Улунбекова, Ю. А. Челышева.— М., 1997.— 960 с.
3. Грищенко В. И., Панков Е. Я., Обозная Э. И. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Успехи современной биологии.— 1989.— 106, Вып. 2(5).— С. 299–309.
4. Климов А. А., Графова Г. Я., Хилова Ю. К. и др. Клеточно-дифферонная организация тканей и проблема заживления ран // Архив патологии, гистологии и эмбриологии.— 1990.— 98, № 4.— С. 5–23.
5. Криохирurgia / Под ред. А. С. Когана, Э. П. Канделя.— Иркутск: Ин-т усовершенствования врачей, 1987.— 200 с.
6. Обозная-Печенежская Э. И., Грищенко В. И., Панков Е. Я. Криобиология обновления: факты и перспективы // Пробл. криобиологии.— 1993.— № 4.— С. 11–20.
7. Писанный О. Е. Применение криовоздействий при лечении язв двенадцатиперстной кишки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1985.— 16 с.
8. Практическая криомедицина / Под ред. В. И. Грищенко, Б. П. Сандомирского.— Киев: Здоров'я, 1987.— 248 с.
9. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Под ред. Д. С. Саркисова.— М.: Медицина, 1987.— 448 с.
10. Helppap B. Kryochirurgische Eingriff und seine Folgen. Morphologische und zell-histologische Analyse.— Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1980.— Bd. 40.— 88 s.
11. Tamura S., Fujita H. Fine structural aspects on the renewal and development of surface mucous cells and glandular cells of the gastric body // Arch. Histol. Jap.— 1983.— 46.— P. 511–526.

Поступила 19.10.98

## REFERENCES

1. The effect of cooling on cell structure / Ed. by T. N. Yurchenko.— Kiev: Naukova Dumka, 1992.— 147 p.
2. Histology (introduction into pathology) / Ed. by E. G. Ulunbekov, Yu. A. Chelyshev.— M., 1997.— 960 p.
3. Grisichenko V. I., Pankov E. Ya., Oboznaya E. I. Qualitative renewal of cellular properties after cryopreservation // Current progress in modern biology.— 1989.— 108, issue 2(5).— P. 299–309.
4. Klimov A. A., Grafova G. Ya., Khilova Yu. K. et al. Cellular-differone organization of tissues and the problem of wound healing // Arch. of pathology, histology and embryology.— 1990.— 98, № 4.— P. 5–23.
5. Cryosurgery / Ed. by A. S. Kogan, E. P. Kandel.— Irkutsk: Institute of Physicians' Advanced Training, 1987.— 200 p.
6. Oboznaya-Pechenezhskaya E. I., Grisichenko V. I., Pankov E. Ya. Cryobiology of renewal: facts and perspectives // Problemy kriobiologii.— 1993.— № 4.— P. 11–20.
7. Pisanny O. E. Application of cryoeffects when treating the duodenal ulcers: Author's abstract of PhD thesis in medicine.— Kharkov, 1985.— 16 p.
8. Practical cryomedicine / Ed. by V. I. Grisichenko, B. P. Sandomirsky.— Kiev: Zdorov'ya, 1987.— 248 p.
9. Structural grounds of adaptation and compensation of impaired functions / Ed. by D. S. Sarkisov.— M: Meditsina, 1987.— 448 p.
10. Helppap B. Kryochirurgische Eingriff und seine Folgen. Morphologische und zell-histologische Analyse.— Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1980.— Bd. 40.— 88 s.
11. Tamura S., Fujita H. Fine structural aspects on the renewal and development of surface mucous cells and glandular cells of the gastric body // Arch. Histol. Jap.— 1983.— 46.— P. 511–526.

Accepted in 19.10.98



## Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде

В. В. РАМАЗАНОВ, Н. А. ЛУПИЛОВА, А. Ф. ТОДРИН, Т. П. БОНДАРЕНКО

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

## Proton Transport Osmotic Modification in Erythrocytes in a Sulphatic Medium

V. V. RAMAZANOV, N. A. LUPILOVA, A. F. TODRIN, T. P. BONDARENKO

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

Исследовали котранспорт протонов и анионов в эритроцитах человека. Полученные результаты позволяют предположить, что транспорт в гипертонических средах по сравнению с изотонической средой определяется состоянием белков цитоскелета.

Досліджували котранспорт протонів і аніонів в еритроцитах людини. Отримані результати дозволяють припустити, що транспорт аніонів у гіпертонічних середовищах у порівнянні з ізотонічним середовищем визначається станом білків цитоскелета.

Anion and proton cotransport in human erythrocytes was investigated. The results obtained permit to suppose, that anion transport in hypertonic media in comparison with an isotonic medium is determined by cytoskeleton protein state.

Перераспределение анионов между клеткой и средой после выхода воды также является ответом на осмотическое воздействие [6] и может быть одним из основных контролирующих факторов в динамике потери катионов калия и развитии холодового повреждения эритроцитов [2].

Гидрофобные фрагменты трансмембранного домена белка полосы 3 мембран эритроцитов образуют каналоподобную структуру и осуществляют анион-транспортную функцию [11], тогда как цитоплазматический домен содержит связывающие сайты для белков цитоскелета, гликолитических ферментов и гемоглобина [12]. Домены могут быть протеолитически разделены, при этом транспортная способность мембранного фрагмента значительно не изменяется [17, 18]. Однако функциональные взаимоотношения двух частей одного белка присутствуют [5, 14, 18]. Трансмембранный фрагмент может пересекать липидный бислой до 12 раз [11] и, следовательно, выполнять, наряду с цитоскелетом, армирующую функцию мембраны [15]. Модификация взаимодействия белка полосы 3 с цитоскелетом приводит к потере способности эритроцитов изменять свою форму при осмотическом воздействии и приобретать устойчивость к гипертоническому шоку [3].

Согласно приведенным данным, можно предположить, что функционирование анионного канала при осмотическом воздействии будет определяться состоянием цитоскелета. Функциональная взаимосвязь указанных структур может служить основой для развития повреждения эритроцитов в условиях холодового и осмотического воздействия.

Эритроциты получали из донорской крови четырехкратным отмыванием в среде, содержащей 150 ммоль/л NaCl и 10 ммоль/л трис (pH 7,4).

Anion redistribution between a cell and a medium after water release is also the response to an osmotic effect [6] and can be one of the main controlling factors in the dynamics of potassium cation loss and development of erythrocyte cold damage [2]. Hydrophobic fragments of a transmembranous domain of band 3 protein of erythrocytes form a channel-like structure and accomplish an anion-transport function [11], meanwhile a cytoplasmic domain contains binding sites for cytoskeleton proteins, glycolytic enzymes and hemoglobin [12]. The domains can be proteolitically divided, thereat a transport ability of a membranous fragment does not significantly change [17, 18]. However, the functional interactions of two parts of one protein are present [5, 14, 18]. A transmembranous fragment can cross a lipid bilayer upto 12 times [11] and, consequently, perform, among with cytoskeleton, membrane reinforcing function [15]. The modification of band 3 protein interaction with a cytoskeleton results in a loss of erythrocyte ability to change their shape during osmotic effect and gain the resistance to a hypertonic shock [3].

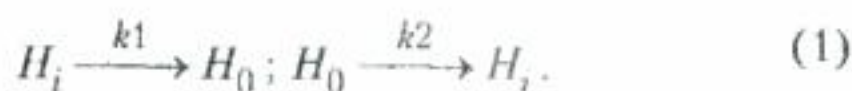
According to the data mentioned, one can suppose, that the anion channel functioning during osmotic effect will be determined by the cytoskeleton state. Functional interaction of the structures indicated can serve as the basis for development of erythrocyte damage under conditions of cold and osmotic effects.

Erythrocytes were obtained from a donor blood by a fourfold washing-out in the medium containing NaCl 150 mMol/l and tris (pH 7.4) 10 mMol/l. Cellular sediment (50  $\mu$ l) was combined with 2 ml of experimental medium (7.0 pH value without buffer) in a thermostated cell with pH-electrode. The change in pH of erythrocyte suspension was controlled using a recorder.



Осадок клеток (50 мкл) комбинировали с 2 мл экспериментальной среды (значение  $pH$  7,0 без буфера) в термостатируемой ячейке с  $pH$  электродом. Изменение  $pH$  суспензии эритроцитов контролировали самописцем.

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в незабуференной среде сопровождается последовательно фазой закисления и фазой защелачивания суспензии эритроцитов [16]. Транспорт протонов из клетки и в клетку можно представить реакциями первого порядка:



В данном случае кинетика процесса описывается системой уравнений:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i]; \\ -\frac{d[H_0]}{dt} &= k_2[H_0]. \end{aligned} \quad (2)$$

Разделение переменных и интегрирование уравнений (2) при начальных условиях  $t = 0$ ;  $[H_i] = [H_i]^0$ ;  $[H_0] = [H_0]^0$  дает:

$$\begin{aligned} [H_i] &= [H_i]^0 \exp(-k_1 t); \\ [H_0] &= [H_0]^0 \exp(-k_2 t). \end{aligned} \quad (3)$$

Подстановка уравнений (3) в (2) приводит систему (2) к виду:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i]^0 \exp(-k_1 t); \\ -\frac{d[H_0]}{dt} &= k_2[H_0]^0 \exp(-k_2 t). \end{aligned} \quad (4)$$

Экспериментальные данные показывают, что количество протонов, транспортируемое из клетки, равно количеству протонов, поступившему в клетку. Следовательно,  $[H_i]^0 = [H_0]^0 = [H]_0$ . С учетом этого выполним комбинирование уравнений системы (4):

$$-\frac{d[H]}{dt} = [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t) - k_2 \exp(-k_2 t)]. \quad (5)$$

Интегрирование приводит уравнение (5) к виду:

$$[H] = [H]^0 [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)]. \quad (6)$$

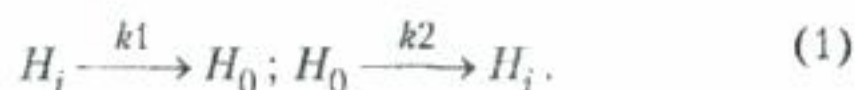
Экспериментальная двухфазная  $pH$  кривая имеет максимум в момент времени  $t_{\max}$ , определяемый уравнением (5),

$$\begin{aligned} -\left(\frac{d[H]}{dt}\right)_{t=t_{\max}} &= \\ &= [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t_{\max}) - k_2 \exp(-k_2 t_{\max})] = 0, \end{aligned} \quad (7)$$

откуда

$$t_{\max} = \ln \left( \frac{k_2/k_1}{k_2 - k_1} \right). \quad (8)$$

The change of an intracellular chloride for an extracellular sulphate in a medium without buffer is consequently accompanied by the oxidation phase and alkalization phase of erythrocyte suspension [16]. Proton transport out of a cell and into a cell can be presented by the first order reactions:



In the given case the process kinetics is described by the equations system:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i]; \\ -\frac{d[H_0]}{dt} &= k_2[H_0]. \end{aligned} \quad (2)$$

The variables separation and equations integration (2) under initial conditions  $t = 0$ ;  $[H_i] = [H_i]^0$ ;  $[H_0] = [H_0]^0$  makes:

$$\begin{aligned} [H_i] &= [H_i]^0 \exp(-k_1 t); \\ [H_0] &= [H_0]^0 \exp(-k_2 t). \end{aligned} \quad (3)$$

The equation (3) substitution in (2) results the system (2) in the form:

$$\begin{aligned} -\frac{d[H_i]}{dt} &= k_1[H_i]^0 \exp(-k_1 t); \\ -\frac{d[H_0]}{dt} &= k_2[H_0]^0 \exp(-k_2 t). \end{aligned} \quad (4)$$

The experimental data show, that the proton quantity, being transported out of a cell is equal to the proton number entered a cell. Consequently,  $[H_i]^0 = [H_0]^0 = [H]_0$ . Taking that into consideration, let's perform the system (4) equations combining:

$$-\frac{d[H]}{dt} = [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t) - k_2 \exp(-k_2 t)]. \quad (5)$$

The integration results the equation (5) in the form:

$$[H] = [H]^0 [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)]. \quad (6)$$

An experimental two-phase  $pH$  curve has maximum in the time moment  $t_{\max}$ , determined by the equation (5),

$$\begin{aligned} -\left(\frac{d[H]}{dt}\right)_{t=t_{\max}} &= \\ &= [H]^0 [k_1 \exp(-k_1 t_{\max}) - k_2 \exp(-k_2 t_{\max})] = 0, \end{aligned} \quad (7)$$

where

$$t_{\max} = \ln \left( \frac{k_2/k_1}{k_2 - k_1} \right). \quad (8)$$

Correspondingly, a maximum proton concentration is

$$\begin{aligned} [H]_{t_{\max}} &= [H]^0 [(k_2/k_1)^{-1/(k_2/k_1-1)} - \\ &- (k_2/k_1)^{-(k_2/k_1)/(k_2/k_1-1)}]. \end{aligned} \quad (9)$$



Соответственно максимальная концентрация протонов

$$[H]t_{\max} = [H]^0 [(k_2/k_1)^{-1/(k_2/k_1-1)} - (k_2/k_1)^{-(k_2/k_1)/(k_2/k_1-1)}] \quad (9)$$

Используя экспериментальные параметры  $t_{\max}$ ,  $[H]_{\max}$ ,  $[H]^0$ , по уравнениям (8) и (9) можно рассчитать константы  $k_1$  и  $k_2$ . Перенос протонов через мембрану эритроцитов определялся по сдвигу значения  $pH$  во внеклеточной среде, поэтому  $[H]^0 = [H]_0 - [H]_{\infty}$ ;  $[H]t_{\max} = [H]_{\max} - [H]_0$ , где  $[H]_0$ ,  $[H]_{\max}$ ,  $[H]_{\infty}$  — концентрации протонов в среде в начале эксперимента, в момент  $t_{\max}$  и при максимальном закислении в присутствии 100–200 мкМ дипиридамола (концентрация, необходимая для ингибирования транспорта протонов в клетку) соответственно.

На основе полученных констант согласно теории переходного состояния и соответствующего уравнения [4]

$$k = (k_B T/h) \exp(\Delta S^*/R) \exp(-\Delta H^*/RT), \quad (10)$$

после преобразования которого

$$\lg(kh/k_B T) = (\Delta S^*/2,303R) - (\Delta H^*/2,303R)(1/T), \quad (11)$$

строили графики температурной зависимости в координатах  $\lg(kh/k_B T)$  от  $1/T$ , где  $k$  — константа скорости;  $h$  — постоянная Планка;  $k_B$  — константа Больцмана;  $T$  — абсолютная температура;  $R$  — газовая постоянная;  $\Delta S^*$ ,  $\Delta H^*$  — энтропия и энтальпия активации.

Свободную энергию активации определяли по формуле

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*. \quad (12)$$

Используя метод наименьших квадратов, вычисляли термодинамические параметры транспорта протонов.

Исследование температурной зависимости транспорта протонов из клетки выявило два прямолинейных участка в интервале температур 1–6,5 и 6,5–56 °C (рис. 1) с энтальпиями активации, равными 32,3 и 4,8 ккал/моль. При этом энтропия активации составляла 51,4 и –47,1 кал/моль/град соответственно (табл. 1). Свободная энергия активации значительно не изменялась при переходе от одного температурного участка к другому. Гипертоническое воздействие при возрастании концентрации сульфата до 800 ммоль/л или комбинирование среды инкубации с 900 ммоль/л сахарозы вызывает некоторое ингибирование транспорта, а также появление дополнительных изломов в интервале 13–15, 20–30, и 37 °C. В общем случае гипертоническое воздействие привело к уменьшению значений энтальпии активации и перемене знака энтропии с положительного на отрицательный в интервале 1–6,5 °C, повышению значений энталь-

Using  $t_{\max}$ ,  $[H]_{\max}$ ,  $[H]^0$  experimental parameters, according to the equations (8) and (9) one can calculate  $k_1$  and  $k_2$  constants. Proton transfer through erythrocyte membrane was determined by the shift of  $pH$  value in an extracellular medium, therefore  $[H]^0 = [H]_0 - [H]_{\infty}$ ;  $[H]t_{\max} = [H]_{\max} - [H]_0$ ; where  $[H]_0$ ,  $[H]_{\max}$ ,  $[H]_{\infty}$  — proton concentrations in the medium in the experiment beginning, in  $t_{\max}$  moment and at a maximum oxidation in the presence of 100–200  $\mu M$  of dipyridamole (the concentration, necessary for the proton transport inhibition into a cell), correspondingly.

Basing on the constants obtained, according to the transitive state theory and the corresponding equation [4]

$$k = (k_B T/h) \exp(\Delta S^*/R) \exp(-\Delta H^*/RT), \quad (10)$$

after the transformation of which

$$\lg(kh/k_B T) = (\Delta S^*/2,303R) - (\Delta H^*/2,303R)(1/T), \quad (11)$$

one plotted the temperature dependence graphs in  $\lg(kh/k_B T)$  coordinates on  $1/T$ , where  $k$  — rate constant;  $h$  — the Planck's constant;  $k_B$  — the Boltzmann's constant;  $T$  — absolute temperature;  $R$  — gas constant;  $\Delta S^*$ ,  $\Delta H^*$  — the activation entropy and enthalpy.

The activation free energy was determined using the formula

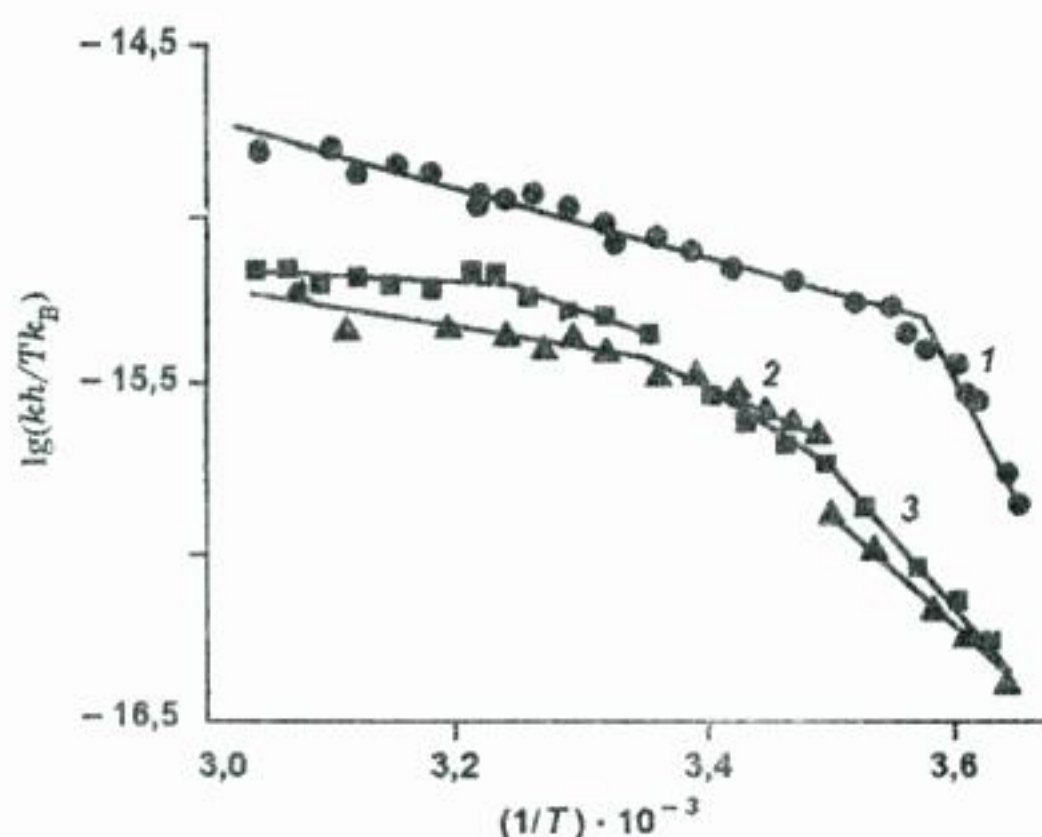
$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*. \quad (12)$$

Using the method of the least squares the proton transport state variables were calculated.

The investigation of a temperature dependence of proton transport out of a cell have revealed two rectilinear sites in 1–6.5 and 6.5–56 °C temperature range (Fig. 1) with the activation enthalpies, equal to 32.3 and 4.8 kcal/mol. Thereat the activation entropy made 51.4 and –47.1 cal/mol/grad, correspondingly (Table 1). Activation free energy did not significantly change during the transfer from one temperature site to another. A hypertonic effect during an increase in sulphate concentration upto 800 mMol/l or the incubation medium combining with 900 mMol/l of sucrose causes a certain transport inhibition as well as the appearance of additional bendings in 13–15, 20–30 and 37 °C range. In general case a hypertonic effect resulted in values reduction in activation enthalpy and change of the entropy sign from a positive to negative one in 1–6.5 °C range, an increase in enthalpies values in 13–37 °C range and decrease in enthalpies in the range of 37–57 °C (Table 1).

The investigation of proton transport into a cell has revealed another character of a temperature dependence. Two rectilinear sites in 15–35 and 35–53 °C temperature range (Fig. 2) with corresponding activation enthalpies, equal to 27 and 10.8 kcal/mol and the activation entropies of 22.15 and –30.6 cal/mol/grad were determined. Activation





**Рис. 1.** Температурные зависимости транспорта протонов из клетки в средах, содержащих: 1 — 120 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2 — 800 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 3 — 120 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 900 ммоль/л сахарозы.

**Fig. 1.** Temperature dependences of proton transport out of a cell in the media, containing: 1 — 120 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 2 — 800 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 3 — 120 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 900 mM sucrose.

пий в интервале 13–37 °C и уменьшению энтальпий в области 37–57 °C (табл. 1).

Исследование транспорта протонов в клетку выявило иной характер температурной зависимости. Определялось два прямолинейных участка в

free energy did not practically change (Table 2). Their common peculiarity is the observed transport inactivation in hypertonic medium at the temperature, higher than 40 °C. Thereat the rate of transport inhibition is higher in a sulphate medium (Fig. 2, curve 2).

Thus, the results obtained demonstrate a different sensitivity to the temperature and hypertonic effects of two differently directed proton fluxes. In isotonic medium the changes in proton transport system are observed at 6.5 °C, meanwhile proton transport into a cell shows a bending at 37 °C. An osmotic effect does not cause the activation of proton transport out of a cell, proton transport into a cell is more sensitive to the temperature change and its activation at the temperature higher than 40 °C is noted. However a partial inhibition during hypertonic effect is revealed in both cases.

According to the [17] in the erythrocytes, placed into a sulphate medium, chloride and proton release in oxidation phase and chloride exchange for an extracellular sulphate and proton in alkalization phase occur. It is evident, that the mechanisms of the given transport processes are not similar, their behaviour in response to the change in the incubation medium temperature and osmolarity (Fig. 1, 2, Table 1, 2) is different. Chlorine anion release out of a cell according to the electrochemical potential gradient can occur by

**Таблица 1**

**Table 1**

**Термодинамические параметры транспорта протонов из клетки в сульфатных средах**

**Thermodynamic parameters of proton transport out of a cell in sulphate media**

| Условия эксперимента<br>Experiment conditions    | 120 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$<br>120 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ |        | 800 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$<br>800 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ |       |       | 120 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ + 900 mM сахарозы<br>120 mM of $\text{Na}_2\text{SO}_4$ + 900 mM sucrose |       |       |       |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------|-------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
| Интервал температур, °C<br>Temperature range, °C | 1–6,5                                                              | 6,5–53 | 1,5–12,5                                                           | 15–25 | 30–53 | 3–12,5                                                                                                   | 13–20 | 25–37 | 37–57 |
| $\Delta H^*$ ккал/моль<br>kcal/mol               | 32,3                                                               | 4,8    | 15,1                                                               | 7,8   | 2,7   | 18                                                                                                       | 11,5  | 6,4   | 1,1   |
| $\Delta S^*$ кал/моль/град<br>cal/mol/grad       | 51,4                                                               | –47,1  | –12,1                                                              | –38,9 | –55,9 | –9,2                                                                                                     | –26,5 | –43,2 | –60,5 |
| $\Delta G^*$ ккал/моль<br>kcal/mol               | 18,1                                                               | 18,3   | 19,1                                                               | 19,0  | 19,0  | 19,0                                                                                                     | 19,1  | 19,4  | 20,2  |

интервалах температур 15–35 и 35–53 °C (рис. 2) с соответствующими энтальпиями активации, равными 27 и 10,8 ккал/моль и энтропиями активации 22,15 и –30,6 кал/моль/град. Свободная энергия активации практически не изменялась (табл. 2). Гипертоническое воздействие приводит к ингибированию транспорта протонов, однако выявляется некоторое отличие между средами с различными составами (рис. 2). Общей особенностью их является то, что в гипертонических средах отмечается инактивация транспорта при температуре выше 40 °C. При этом скорость ингибирования транспорта выше в сульфатной среде (рис. 2, кривая 2).

Таким образом, полученные результаты показывают различную чувствительность к температуре и гипертоническим воздействиям двух разнонаправленных потоков протонов. В изотонической среде

a channel mechanism [8], meanwhile the transport exchangeable type includes the conformational fluctuations of membranous fragments of an anion carrier [11]. Transport exchangeable type, not depending on anion structure possesses the activation energies in the limits of 19–32 kcal/mol [9, 10]. A considerable difference in the enthalpies of proton transport activation out of a cell and into a cell (Table 1, 2) may testify to the existence of a channel and exchangeable type of chloride transport. Thereat a channel type is characterized by a lower activation enthalpy (5 kcal/mol). Probably anion transport, not accompanying by considerable changes in channel conformation, requires lesser energy. At the anion transport exchangeable type, when the transfer cycle is accompanied by significant changes in the orientation of



изменения в системе транспорта протонов из клетки отмечаются при 6,5 °С, тогда как транспорт протонов в клетку показывает излом при 37 °С. Осмотическое воздействие не вызывает инактивации транспорта протонов из клетки, транспорт протонов в клетку более чувствителен к изменению температуры и отмечается его инактивация при температуре выше 40 °С. Однако частичное ингибирование при гипертоническом воздействии выявляется в обоих случаях.

Согласно [17], в эритроцитах, помещенных в сульфатную среду, происходит выход хлорида и протона в фазе закисления и обмен хлорида на внеклеточный сульфат и протон в фазе защелачивания. Очевидно, механизмы данных транспортных процессов отличаются, соответственно и различно поведение их в ответ на изменение температуры и осмолярности среды инкубации (рис. 1, 2, табл. 1, 2). Выход анионов хлора из клетки по градиенту электрохимического потенциала может происходить по каналному механизму [8], тогда как обменный тип транспорта включает конформационные флуктуации мембранных фрагментов анионного переносчика [11].

Обменный тип транспорта независимо от структуры анионов обладает энергиями активации в пределах 19–32 ккал/моль [9, 10]. Значительное различие в энтальпиях активации транспорта протонов из клетки и в клетку (табл. 1, 2) может свидетельствовать о существовании каналного и обменного типа транспорта хлорида. При этом каналный тип характеризуется более низкой энтальпией активации (5 ккал/моль). Вероятно, транспорт анионов, который не сопровождается значительными изменениями конформации каналов, требует меньше энергии. При обменном типе транспорта анионов, когда цикл переноса сопровождается значительными изменениями в ориентации мембранных фрагментов белка полосы 3 относительно друг друга, энергия активации намного выше (19–32 ккал/моль). Полученная величина энтальпии активации в фазе защелачивания в интервале температур 15–35 °С (табл. 2) соответствует данным [9, 10].

Таблица 2

Термодинамические параметры транспорта протонов в клетку в сульфатных средах

Thermodynamic parameters of proton transport into a cell in sulphate media

| Условия эксперимента<br>Experiment conditions    | 120 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>120 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |       | 800 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>800 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |       |       |       | 120 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 900 mM сахаразы<br>120 mM of Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 900 mM sucrose |       |       |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| Интервал температур, °С<br>Temperature range, °C | 15–35                                                                            | 35–53 | 15–20                                                                            | 22–28 | 28–40 | 40–48 | 15–22                                                                                                                  | 30–40 | 40–53 |
| ΔH* ккал/моль<br>kcal/mol                        | 27,0                                                                             | 10,8  | 29,8                                                                             | 26,6  | 7,3   | –65,1 | 23,8                                                                                                                   | 17,8  | –35,0 |
| ΔS* кал/моль/град<br>cal/mol/grad                | 22,2                                                                             | –30,6 | 29,4                                                                             | 20,3  | –43,9 | –275  | 8,9                                                                                                                    | –10,0 | –178  |
| ΔG* ккал/моль<br>kcal/mol                        | 20,2                                                                             | 20,7  | 21,1                                                                             | 20,6  | 20,6  | 21,6  | 21,2                                                                                                                   | 20,8  | 21,7  |

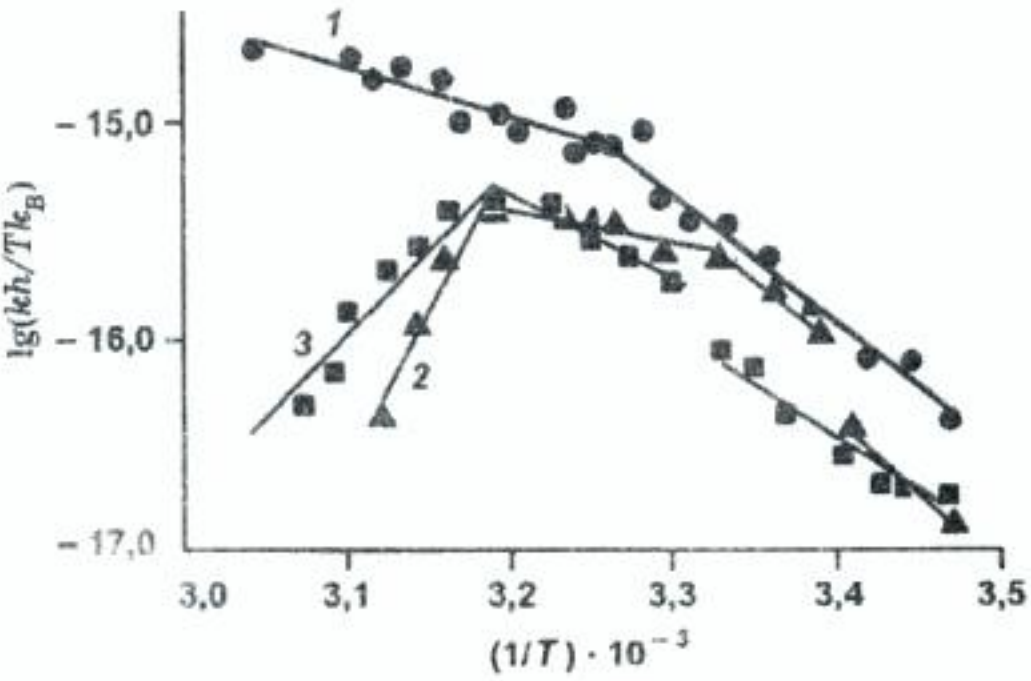


Рис. 2. Температурные зависимости транспорта протонов в клетку в средах, содержащих: 1 – 120 ммоль/л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2 – 800 ммоль/л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3 – 120 ммоль/л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 900 ммоль/л сахаразы.

Fig. 2. Temperature dependences of proton transport into a cell in the media, containing: 1 – 120 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2 – 800 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3 – 120 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 900 mM sucrose.

membranous fragments of band 3 protein regarding to each other, the activation energy is much higher (19–32 kcal/mol). The obtained value of the activation enthalpy in alkalization phase in 15–35 °C temperature range (Table 2) corresponds to the data [9, 10].

The bendings revealed at the temperature 6.5 (Fig. 1) and 35 °C (Fig. 2) do not correspond to the phase transfers of lipids in erythrocyte membranes and, obviously, are the consequence of the change in a structural and functional state of the band 3 protein. In the given case the change in a phase state of membranous lipids may not affect the function of anion channel. However at a hypertonic effect additional bendings in the curves of a temperature dependence of 20 and 25 °C (Fig. 1), 20 and 22 °C (Fig. 2) are observed, that, probably, are determined by physical state of membranous lipids.

According to the [10], the investigation of a temperature dependency of sulphate exchange has revealed a bending in Arrhenius plot at 30 °C. One supposes, that such a phase transfer may be related to the change of a rate-limiting step in an exchangeable type of anion transport [10] or with a temperature modification of only an entrance step in the exchange transport cycle [9]. A sharp change in the temperature

Table 2



Выявленные изломы при температуре 6,5 (рис. 1) и 35 °C (рис. 2) не соответствуют фазовым переходам липидов в мембранах эритроцитов и, очевидно, являются следствием изменения структурно-функционального состояния белка полосы 3. В данном случае изменение фазового состояния мембранных липидов может не сказываться на функции анионного канала. Однако при гипертоническом воздействии отмечаются дополнительные изломы на кривых температурной зависимости 20 и 25 °C (рис. 1), 20 и 22 °C (рис. 2), которые, вероятно, определяются физическим состоянием мембранных липидов.

Согласно [10], исследование температурной зависимости обмена сульфата выявило излом на графике Аррениуса при 30 °C. Предполагают, что такой фазовый переход может быть связан с переменной скоростью-лимитирующего шага в обменном типе транспорта анионов [10] или с температурной модификацией только входного шага в транспортном цикле обмена [9]. Перелом на кривой температурной зависимости при 35 °C при обменном типе транспорта хлорида на сульфат и протон (рис. 2), вероятно, не связан с переключением скорость-лимитирующего шага, так как хлорид при обмене транспортируется на 4–5 порядков быстрее сульфата.

Относительно высокое значение энтальпии активации (27 ккал/моль) и положительная величина энтропии активации (22 кал/моль/град) в интервале температур 15–35 °C (табл. 2) указывают на то, что обмен анионов сопровождается конформационными изменениями большинства мембранных сегментов белка полосы 3 [9, 10]. Полученные значения термодинамических параметров (табл. 2) незначительно отличаются от имеющихся в литературе и характерны для большинства неорганических анионов независимо от их валентности и структуры [9].

Транспорт хлорида с протоном из клетки в фазе закисления в интервале температур 6,5–56 °C (рис. 1), вероятно, происходит канальным способом. На данное предположение указывают низкое значение энтальпии активации (4,8 ккал/моль) и отрицательная величина энтропии активации (–47 кал/моль/град) (табл. 1). Однако в низкотемпературном интервале (1–6,5 °C) энтальпия активации намного выше и составляет 32 ккал/моль, а энтропия является положительной и соответствует 51 кал/моль/град. Такие термодинамические параметры указывают, что в данной области температур энтальпия активации канального типа транспорта хлорида может изменяться вследствие модификации взаимодействий белка полосы 3 с мембранными структурами. Излом температурной зависимости транспорта протонов в области 6,5 °C может определяться фазовым разделением липидов, которое опосредуется взаимодействием белка полосы 4.1 с мембраной [7]. В отношении последнего предположения известно, что протеолиз белка

dependence curve at 35 °C at an exchangeable type of chloride transport for sulphate and proton (Fig. 2), probably, is not related to the switching of a rate-limiting step, because during the exchange, chloride is transported by 4–5 orders more rapidly than sulphate.

A relatively high value of the activation enthalpy (27 kcal/mol) and a positive value of the activation entropy (22 cal/mol/grad) in 15–35 °C temperature range (Table 2) point to the fact, that anion exchange is accompanied by conformational changes of the majority of membranous segments of band 3 protein [9, 10]. The values of thermodynamic parameters obtained (Table 2) slightly differ from the literature ones and are typical for the majority of inorganic anions independently on their valency and structure [9].

Chloride transport with a proton out of a cell in the oxidation phase in 6.5–56 °C temperature range (Fig. 1), probably occurs by a channel way. The activation enthalpy low value (4.8 kcal/mol) and a negative value of the activation entropy (–47 cal/mol/grad) (Table 1) point to the given supposition. However in a low temperature range (1–6.5 °C) the activation enthalpy is much higher and makes 32 kcal/mol, but the entropy is positive and corresponds to 51 cal/mol/grad. Such thermodynamic parameters point to the fact, that in the given temperature field the activation enthalpy of a channel type of chloride transport can change due to the modification of the band 3 protein interaction with membranous structures.

The bending of the proton transport temperature dependence in the field of 6.5 °C may be determined by the lipid phase division, that is mediated by the interaction of band 4.1 protein with a membrane [7]. Regarding the last supposition it is known, that the band 4.1 protein proteolysis, providing the cytoskeleton integration and its attachment to a membrane, or erythrocyte treatment with A23187 ionophore contributes to the transfer disappearance at 8 °C [13].

A hypertonic effect to cells results in the interaction modification of membranous proteins and lipids [1]. Probably, due to this fact not only the inhibition of proton transport, but the appearance of additional fractures and vertical shifts in the curves of a temperature dependence are observed (Fig. 1, 2). Vertical ruptures of temperatural dependences when investigating the membranes using spin labels [12] or erythrocyte hemolysis [1] are the typical phenomenon at a hypertonic effect. Not only the distinction in the sensitivity to a temperature of proton transport out of a cell into a cell, but the fact, that higher than 40 °C a hypertonic medium causes the inactivation of sulphate entrance with proton in the alkalization phase (Fig. 2), point to the existence of two types of chloride transport mechanisms. At the same time proton release with chloride in the oxidation phase is not activated higher than the mentioned temperature, but the curve bending is observed (Fig. 1). According to the [12] a phase transfer at 40 °C in a hypertonic medium, de-



полосы 4.1, который обеспечивает интеграцию цитоскелета и прикрепление его к мембране, или обработка эритроцитов ионофором A23187 способствует исчезновению перехода при 8 °C [13].

Гипертоническое воздействие на клетки приводит к модификации взаимодействий мембранных белков и липидов [1]. Вероятно, вследствие этого отмечается не только ингибирование транспорта протонов, но и появление дополнительных переломов и вертикальных смещений на кривых температурной зависимости (рис. 1, 2). Вертикальные разрывы температурных зависимостей при исследовании мембран спиновыми метками [12] или гемолиза эритроцитов [1] являются характерным явлением при гипертоническом воздействии. На существование двух типов механизмов транспорта хлорида указывает не только различие в чувствительности к температуре транспорта протонов из клетки и в клетку, но и то, что выше 40 °C гипертоническая среда вызывает инактивацию входа сульфата с протоном в фазе защелачивания (рис. 2). В то же время выход протонов с хлоридом в фазе закисления не инактивируется выше указанной температуры, хотя излом кривой отмечается (рис. 1). Согласно [12], фазовый переход при 40 °C в гипертонической среде, определяемый стеариновой меткой, отражает изменение структурного состояния спектрина в цитоскелете. Следовательно, можно предположить, что при гипертоническом воздействии как канальный, так и обменный способ транспорта анионов значительно определяется белок-липидными взаимодействиями в мембранах и состоянием белков цитоскелета.

Как было отмечено, гипертоническое воздействие вызывает вертикальные разрывы и смещения в температурной зависимости не только транспорта протонов (рис. 1, 2), но и подвижности спиновой метки [12] и осмотического гемолиза эритроцитов [1]. Наиболее выраженный разрыв в фазе закисления выявляется при 12,5 °C в гипертонической сульфатной среде, а в гипертонической сахарозной среде здесь отмечается излом без разрыва кривой (рис. 1, табл. 1). Кривые температурной зависимости транспорта протонов в клетку также подвергаются разрывам при гипертоническом воздействии. В сульфатной среде смещение наступает при 20 °C, в сахарозной — при 27 °C. Кроме того, в сульфатной среде разрыв более выражен. При транспорте протонов из клетки в интервале температур 1–6,5 °C гипертоническое воздействие приводит к снижению энтальпии активации (рис. 1, табл. 1). В фазе защелачивания на участке 15–27 °C энтальпия активации значительно не изменяется (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, основываясь на различной температурной чувствительности и вычисленных термодинамических параметрах, можно предположить, что транспорт протонов и анионов хлора из эритроцитов в сульфатной среде происходит по канальному механизму, тогда как вход протонов и

terminated by a stearin label, reflects the change in spectrine structural state in a cytoskeleton. Consequently, one can suppose, that during a hypertonic effect both channel and exchangeable ways of anion transport are considerably determined by protein-lipid interactions in membranes and by cytoskeleton protein state.

As it has been noted, a hypertonic effect causes vertical ruptures and shifts in a temperature dependence of not only proton transport (Fig. 1, 2), but the spin label motility [12] and erythrocyte osmotic hemolysis [1]. The most manifested rupture in the oxidation phase is revealed at 12.5 °C in a hypertonic sulphate medium, but in hyperetonic succrose medium a bending without curve rupture in oxidation phase is revealed at 12.5 °C in a hypertonic sulphate medium, but in a hypertonic succrose medium a bending without curve rupture if observed here (Fig. 1, Table 1). The temperature dependence curves of proton transport into a cell are subjected to the ruptures at a hypertonic effect too. In a sulphate medium a shift occurs at 20 °C, in a succrose one — at 27 °C. Besides, in a sulphate medium the rupture is more manifested. During proton transport out of a cell in 1–6.5 °C temperature range a hypertonic effect results in a decrease of the activation enthalpy (Fig. 1, Table 1). In the alkalization phase in the site of 15–27 °C the activation enthalpy does not significantly change (Fig. 2, Table 2).

Thus, basing on a different temperature sensitivity and calculated thermodynamic parameters one can suppose, that chlorine proton and anion transport from erythrocytes in a sulphate medium occurs by a channel mechanism, meanwhile the proton and sulphate entrance is realized by an exchangeable type of transport as the exchange for an intracellular chloride. The results obtained point to the fact, that under hypertonic effect the functioning of an anion channel and a carrier are determined by cytoskeletal proteins state and protein-lipid interactions in a membrane.

## REFERENCES

1. Bondarenko V. A. Development and prevention of erythrocyte temperature shock: Abstr. Thesis... Doctor Biol. Sci.—Kharkov, 1988.— 38 p.
2. Ramazanov V. V., Rudenko S. V., Bondarenko V. A. The bond of chlorine and potassium ion fluxes at an osmotic stress with a cold chock of erythrocytes // *Fundamental and applied problems of cryobiology*.— Kharkov, 1993.— P. 106–111.
3. Ramazanov V. V., Rudenko S. V., Bondarenko V. A. Effect of cytoskeleton modifiers on erythrocyte sensitivity to a hypertonic shock at the preincubation medium osmolarity increase // *Problemy kribiologii*.— 1994.— № 2.— P. 11–16.
4. Williams V., Williams X. *Physical chemistry for biologists*.— M.: Mir, 1976.— 600 p.
5. Appell K. C., Low P. S. Evaluation of structural interdependence of membrane - spanning and cytoplasmic domains of band 3 // *Biochemistry*.— 1982.— 21.— P. 2151–2157.
6. Bisognano J. D., Dix J. A., Pratap P. R., et al. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // *J. Gen. Physiol.*— 1993.— 102, № 1.— P. 99–123.



сульфата осуществляется обменным типом транспорта в обмен на внутриклеточный хлорид. Полученные результаты указывают на то, что при гипертоническом воздействии функционирование анионного канала и переносчика определяется состоянием белков цитоскелета и белок-липидными взаимодействиями в мембране.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В. А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.— Харьков, 1988.— 38 с.
2. Рамазанов В. В., Руденко С. В., Бондаренко В. А. Связь ионных потоков хлора и калия при осмотическом стрессе с холодовым шоком эритроцитов // *Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии*.— Харьков, 1993.— С. 106–111.
3. Рамазанов В. В., Руденко С. В., Бондаренко В. А. Влияние модификаторов цитоскелета на чувствительность эритроцитов к гипертоническому шоку при повышении осмолярности среды прединкубации // *Пробл. криобиологии*.— 1994.— № 2.— С. 11–16.
4. Уильямс В., Уильямс Х. Физическая химия для биологов.— М.: Мир, 1976.— 600 с.
5. Appell K. C., Low P. S. Evaluation of structural interdependence of membrane - spanning and cytoplasmic domains of band 3 // *Biochemistry*.— 1982.— 21.— P. 2151–2157.
6. Bisognano J. D., Dix J. A., Pratap P. R., et al. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // *J. Gen. Physiol.*— 1993.— V. 102, № 1.— P. 99–123.
7. Forte T., Leto T. L., Minetti M., Marchesi V. T. Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of the red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid // *Biochemistry*.— 1985.— V. 24.— P. 7876–7880.
8. Frohlich O. Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // *J. Gen. Physiol.*— 1984.— V. 84.— P. 877–893.
9. Galanter W. L., Labotka R. J. The temperature dependences of human erythrocyte transport of phosphate, phosphite and hypophosphite // *Biochem. Biophys. Acta*.— 1990.— V. 1027.— P. 65–71.
10. Glibowika M., Winckler B., Aranibar N. et al. Temperature dependence of anion transport in the human red blood cell // *Biochem. Biophys. Acta*.— 1988.— V. 946.— P. 345–358.
11. Jennings M. L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein // *Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem.*— 1989.— V. 18.— P. 397–420.
12. Low P. S. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane peripheral protein interactions // *Biochem. Biophys. Acta*.— 1986.— V. 864, № 2.— P. 145–167.
13. Minetti M., Ceccarini M., Stasi A. M. M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells // *J. Cell. Biochem.*— 1984.— V. 25, № 2.— P. 61–72.
14. Oikawa K., Lieberman D. M., Reithmeier A. F. Conformation and stability of the anion transport protein of human erythrocyte membranes // *Biochemistry*.— 1985.— V. 24.— P. 2843–2848.
15. Peters L. L., Shivdasani R. A., Liu S. C. et al. Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton // *Cell*.— 1996.— V. 86.— P. 917–927.
16. *Red cell membranes — a methodological approach* / Eds. J. C. Ellory, J. D. Young.— Lnd. etc.: Acad. press, 1982.— 369 p.
17. Snow J. W., Brandts J. F., Low P. S. The effects of anion transport inhibitors on structural transitions in erythrocyte membrane // *Biochem. Biophys. Acta*.— 1978.— V. 512.— P. 579–591.
18. Snow J. W., Vincentelli J., Brandts J. F. Relationship between anion transport and structural transition of the human erythrocyte membrane // *Biochem. Biophys. Acta*.— 1981.— V. 642.— P. 418–428.

Accepted in 09.02.99

Поступила 09.02.99



# Влияние охлаждения на содержание биоэлементов в тканях животных половозрелого и пубертатного возраста

В. А. БОНДАРЕНКО

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

В. Н. ЗОВСКИЙ

*Институт гигиены труда и профзаболеваний, г. Харьков*

И. Н. НИКИШКОВА, А. Е. КУТИКОВ

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина*

## Cooling Effect on the Contents of Bioelements in Tissues of Animals of Mature and Pubertant Age

V. A. BONDARENKO

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

V. N. ZOVSKY

*Institute of Occupational Hygiene and Professional Diseases, Kharkov*

I. N. NIKISHKOVA, A. E. KUTIKOV

*Kharkov National University named by V. N. Karazin*

Исследована динамика содержания биоэлементов (БЭ) в тканях головного мозга и других органов белых крыс в возрасте 3-х и 6-ти месяцев под влиянием холода. У интактных животных установлены достоверные возрастные различия содержания БЭ в головном мозге и других органах и отсутствие различий в сыворотке крови. Общее охлаждение при температуре  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  вызывало изменения содержания БЭ в обеих группах, но в разной степени. В пубертатном возрасте значительные изменения содержания БЭ, особенно меди, отмечены в гипоталамусе, а также в печени и легких; у половозрелых животных в печени и легких изменялся преимущественно уровень кальция, магния и натрия. В неокортексе обеих возрастных групп изменения были достоверны, но в меньшей степени.

Досліджено динаміку вмісту біоелементів (БЕ) у тканинах головного мозку та інших органів білих щурів у віці 3-х та 6-ти місяців під впливом загального охолодження. У інтактних тварин встановлено вірогідні вікові відмінності складу БЕ у головному мозку та інших органах, відсутність різниці у сироватці крові. Загальне охолодження при температурі  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  викликало різного ступеня зміни вмісту БЕ у обох групах. У пубертатному віці значні зміни вмісту БЕ, особливо міді, спостерігалися у гіпоталамусі, а також у печінці та легенях; у статевозрілих щурів у печінці та легенях змінювався рівень кальцію, магнію та натрію. У неокортексі обох вікових груп зміни БЕ були також вірогідні, але меншою мірою.

Dynamics of bioelements (BE) contents in tissues of white rats' brain and other organs in the age of 3 and 6 months under cold effect was investigated. In intact animals statistically significant age differences in the BE content in brain and other organs, as well as the absence of differences in blood serum were established. General cooling at the temperature of  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  caused the changes in the BE content in both groups but in various extent. In pubertant age the considerable changes of the BE contents, especially copper were found in hypothalamus and also in liver and lungs; in mature animals in liver and lungs generally the level of calcium, magnesium and sodium changed. In neocortex of both age groups the changes were statistically true but in less expressed.

Равновесие БЭ, необходимых для реализации обменных процессов, регуляции, развития организма, является важным показателем его состояния. Отклонения в микроэлементном гомеостазе под влиянием экзо- и эндогенных факторов определяют нарушение нормального функционирования тех или иных систем [1, 6]. Особенно это важно в возрастном аспекте, поскольку в период соматополового созревания организм, вследствие неустойчивости и незрелости его функциональных систем,

The equilibrium of the BE, necessary for the realization of metabolic processes, regulation, organism development, is an important index of its state. Deviations in microelement homeostasis under the effect of exo- and endogenic factors determine the disorder of normal functioning of these or those systems [1, 6]. Especially it is important in an age aspect, because in the period of somatosexual maturation an organism due to instability and immaturity of its functional



более уязвим и подвержен негативным влияниям неблагоприятных и повреждающих факторов [2, 8]. Одним из распространенных факторов влияния окружающей среды на организм является холод. Цель работы — исследование динамики БЭ в разных тканях животных при содержании их в условиях пониженной температуры. Общее охлаждение животных осуществлялось в камере оригинальной конструкции, оборудованной индивидуальными клетками для животных, системой вентиляции и поддерживающей температуру на уровне  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . Белые крысы-самцы линии Вистар подвергались общему охлаждению в течение 3-х дней по 1 ч в одно и то же время суток.

Сравнительный анализ содержания БЭ в тканях интактных животных (табл. 1) не выявил возрастных различий в сыворотке крови. Достоверная разница отмечена в структурах головного мозга (неокортексе и гипоталамусе), почках, селезенке и легких, а в меньшей степени — в печени и сердце. Влияние общего охлаждения по-разному отразилось на динамике содержания БЭ в различных органах, которая имела как сходство, так и различия в обеих возрастных группах (табл. 2, 3).

Достоверные изменения БЭ наблюдали практически во всех органах животных и пубертатного и половозрелого возраста, но в различной степени. С высокой степенью достоверности различалось содержание БЭ во многих исследуемых тканях (по нисходящей): цинка, меди, магния и кальция; изменения содержания натрия наблюдалось только в 4-х органах. Однако эти изменения достигают максимума у половозрелых животных — в печени и легких, у животных пубертатного возраста — гипоталамусе, селезенке, а также печени и легких. Более выраженная динамика отмечалась у 3-месячных животных и в сыворотке крови.

У животных пубертатного возраста во всех исследуемых тканях интенсивнее всего изменялось содержание меди, а затем кальция, магния и цинка. У половозрелых животных в большей степени изменялся уровень натрия, кальция и магния, а затем калия и меди. Минимальные изменения в тканях пубертатной группы претерпевал натрий, а в тканях половозрелой группы — цинк.

Такая разная степень динамики содержания БЭ, которые тесно взаимосвязаны с ферментными системами, гормональной регуляцией, витаминами и другими биологически активными соединениями [4, 5], является, возможно, следствием изменения метаболических процессов под влиянием охлаждения. Разными оказываются и органы-«мишени» организма в зависимости от возраста, а следовательно, и от степени зрелости структурно-функциональной организации жизнеобеспечения организма. Изменчивость уровня кальция и магния, как и других важных БЭ, в частности натрия, калия, меди и цинка, в высокой мере определяет состояние обменных процессов, нервной регуляции [5],

systems is more vulnerable and subjected to negative effects of unfavorable and damaging factors [2, 8]. Cold is one of widely spreaded factors of the environmental effect on an organism. The aim of this work is the study of the BE dynamics in different animal tissues when keeping them under conditions of lowered temperature. General cooling of animals was accomplished in the chamber of original design, equipped with individual cages for animals, ventilation system and maintaining the temperature at the level of  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . White male rats of Wistar line were subjected to general cooling within 3 days by 1 hr at the same time of a day.

Comparative analysis of the BE contents in tissues of intact animals (Table 1) did not reveal any age differences in blood serum. Statistically true difference was noted in the brain structures (neocortex and hypothalamus), kidneys, spleen and lungs, and in less extent — in liver and heart. The effect of general cooling in different way affected the dynamics of the BE contents in various organs, that was both similar and differences in both age groups (Tables 2, 3).

Statistically true changes in the BE were observed in practically all organs of animals both of pubertant and mature age, but in various extent. With a high degree of statistical significance the BE contents differed in many studied tissues (in descending order): zinc, copper, magnesium and calcium; the changes of sodium contents were observed only in 4 organs. However these changes reached the maximum in mature animals in liver and lungs, in animals of pubertant age in hypothalamus and spleen. More manifested dynamics was noted in 3 months' animals and in blood serum.

In animals of pubertant age in all studied tissues the copper contents changed much more intensively, and than of calcium, magnesium and zinc. In mature animals in a greater extent the level of sodium, calcium and magnesium changed and then of potassium and copper. Minimal changes in tissues of pubertant group were observed for sodium, and in the tissues of mature one — zinc.

Such a different degree of the BE contents dynamics, that are very tightly connected to enzymic systems, hormonal regulation, vitamins and other biologically active compounds [4, 5] is probably the consequence of the change in metabolic processes under cooling effect. The organs-«targets» occurred to be different depending on the age, and consequently on the maturity degree of structural and functional organization of an organism's vital providing. The changeability of calcium and magnesium level, as well as other important BE, in particular sodium, potassium, copper, zinc in a high extent determines the state of metabolic processes, nerve regulation [5], reactivity and adaptational opportunities of an organism.

The obtained data on more versatile and multidirectional dynamics of the BE content in the group of 3-month's animals (pubertant age), in particular in



**Таблица 1**  
**Содержание БЭ в тканях (мг/кг сырого веса) и сыворотке крови (ммоль/л — для К, Na, Ca, Mg; мкмоль/л — для Zn и Cu) интактных животных в возрасте 3-х и 6-ти месяцев**

| Биообъек-<br>ты    | Биоэлементы      |                 |              |                  |               |                  |             |                |              |                |              |                |
|--------------------|------------------|-----------------|--------------|------------------|---------------|------------------|-------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|                    | К                |                 | Na           |                  | Ca            |                  | Mg          |                | Zn           |                | Cu           |                |
|                    | Возраст животных |                 |              |                  |               |                  |             |                |              |                |              |                |
|                    | 3 мес            | 6 мес           | 3 мес        | 6 мес            | 3 мес         | 6 мес            | 3 мес       | 6 мес          | 3 мес        | 6 мес          | 3 мес        | 6 мес          |
| Кора               | 87,64 ± 1,36     | 80,97 ± 5,20**  | 80,93 ± 2,22 | 69,46 ± 3,08***  | 1,49 ± 0,12   | 1,82 ± 0,09**    | 1,27 ± 0,04 | 1,29 ± 0,059   | 1,39 ± 0,091 | 1,19 ± 0,15**  | 1,90 ± 0,04  | 1,99 ± 0,14*   |
| Подкорка           | 87,05 ± 2,51     | 102,6 ± 5,2***  | 78,19 ± 3,92 | 118,02 ± 8,01*** | 2,49 ± 0,07   | 2,79 ± 0,17***   | 1,61 ± 0,07 | 1,69 ± 0,16    | 1,50 ± 0,083 | 1,80 ± 0,21**  | 1,70 ± 0,10  | 2,87 ± 0,25*** |
| Печень             | 136,0 ± 2,66     | 141,6 ± 3,68*** | 77,31 ± 2,87 | 85,99 ± 4,46     | 0,154 ± 0,003 | 0,146 ± 0,003*** | 1,71 ± 0,06 | 1,77 ± 0,05*   | 1,68 ± 0,04  | 1,72 ± 0,08    | 0,39 ± 0,02  | 0,39 ± 0,01    |
| Сердце             | 137,2 ± 2,42     | 135,1 ± 3,07    | 94,73 ± 1,59 | 93,83 ± 1,37     | 2,48 ± 0,09   | 2,53 ± 0,04***   | 1,83 ± 0,05 | 1,90 ± 0,03**  | 1,25 ± 0,06  | 1,44 ± 0,06*** | 0,41 ± 0,015 | 0,35 ± 0,02*** |
| Почки              | 145,2 ± 8,41     | 153,57 ± 4,89*  | 94,78 ± 2,95 | 106,0 ± 2,05***  | 1,29 ± 0,045  | 1,41 ± 0,07***   | 1,98 ± 0,10 | 2,36 ± 0,10*** | 2,60 ± 0,17  | 2,13 ± 0,11*** | 0,29 ± 0,01  | 0,29 ± 0,02    |
| Селезенка          | 161,7 ± 2,86     | 146,6 ± 2,86*** | 101,4 ± 5,10 | 100,5 ± 2,61     | 2,70 ± 0,06   | 2,86 ± 0,07***   | 1,90 ± 0,08 | 2,60 ± 0,05*** | 1,82 ± 0,08  | 1,65 ± 0,05*** | 0,32 ± 0,02  | 0,21 ± 0,02*** |
| Легкие             | 133,4 ± 1,56     | 139,6 ± 2,10*** | 93,71 ± 4,16 | 94,66 ± 1,71     | 2,32 ± 0,04   | 3,05 ± 0,09***   | 1,65 ± 0,33 | 1,80 ± 0,068** | 1,96 ± 0,065 | 2,06 ± 0,09*   | 0,42 ± 0,02  | 0,30 ± 0,01*** |
| Сыворотка<br>крови | 4,19 ± 0,16      | 4,34 ± 0,19     | 134,5 ± 2,97 | 136,4 ± 1,82     | 2,23 ± 0,11   | 2,19 ± 0,18      | 0,97 ± 0,05 | 0,94 ± 0,07    | 27,44 ± 0,51 | 26,97 ± 0,62   | 20,22 ± 0,58 | 19,49 ± 0,96*  |

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Table 1**  
**BE content in tissues (mg/kg of raw weight) and blood serum (mM/l — for K, Na, Ca, Mg;  $\mu$ M/l — for Zn and Cu) of intact animals in the age of 3 and 6 months**

| Bioobjects  | Bioelements  |                 |              |                  |               |                  |             |                |              |                |              |                |
|-------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|---------------|------------------|-------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|             | K            |                 | Na           |                  | Ca            |                  | Mg          |                | Zn           |                | Cu           |                |
|             |              |                 |              |                  |               |                  |             |                |              |                |              |                |
|             | Animals age  |                 |              |                  |               |                  |             |                |              |                |              |                |
|             | 3 months     | 6 months        | 3 months     | 6 months         | 3 months      | 6 months         | 3 months    | 6 months       | 3 months     | 6 months       | 3 months     | 6 months       |
| Cortex      | 87.64 ± 1.36 | 80.97 ± 5.20**  | 80.93 ± 2.22 | 69.46 ± 3.08***  | 1.49 ± 0.12   | 1.82 ± 0.09**    | 1.27 ± 0.04 | 1.29 ± 0.059   | 1.39 ± 0.091 | 1.19 ± 0.15**  | 1.90 ± 0.04  | 1.99 ± 0.14*   |
| Subcortex   | 87.05 ± 2.51 | 102.6 ± 5.2***  | 78.19 ± 3.92 | 118.02 ± 8.01*** | 2.49 ± 0.07   | 2.79 ± 0.17***   | 1.61 ± 0.07 | 1.69 ± 0.16    | 1.50 ± 0.083 | 1.80 ± 0.21**  | 1.70 ± 0.10  | 2.87 ± 0.25*** |
| Liver       | 136.0 ± 2.66 | 141.6 ± 3.68*** | 77.31 ± 2.87 | 85.99 ± 4.46     | 0.154 ± 0.003 | 0.146 ± 0.003*** | 1.71 ± 0.06 | 1.77 ± 0.05*   | 1.68 ± 0.04  | 1.72 ± 0.08    | 0.39 ± 0.02  | 0.39 ± 0.01    |
| Heart       | 137.2 ± 2.42 | 135.1 ± 3.07    | 94.73 ± 1.59 | 93.83 ± 1.37     | 2.48 ± 0.09   | 2.53 ± 0.04***   | 1.83 ± 0.05 | 1.90 ± 0.03**  | 1.25 ± 0.06  | 1.44 ± 0.06*** | 0.41 ± 0.015 | 0.35 ± 0.02*** |
| Kidneys     | 145.2 ± 8.41 | 153.57 ± 4.89*  | 94.78 ± 2.95 | 106.0 ± 2.05***  | 1.29 ± 0.045  | 1.41 ± 0.07***   | 1.98 ± 0.10 | 2.36 ± 0.10*** | 2.60 ± 0.17  | 2.13 ± 0.11*** | 0.29 ± 0.01  | 0.29 ± 0.02    |
| Spleen      | 161.7 ± 2.86 | 146.6 ± 2.86*** | 101.4 ± 5.10 | 100.5 ± 2.61     | 2.70 ± 0.06   | 2.86 ± 0.07***   | 1.90 ± 0.08 | 2.60 ± 0.05*** | 1.82 ± 0.08  | 1.65 ± 0.05*** | 0.32 ± 0.02  | 0.21 ± 0.02*** |
| Lungs       | 133.4 ± 1.56 | 139.6 ± 2.10*** | 93.71 ± 4.16 | 94.66 ± 1.71     | 2.32 ± 0.04   | 3.05 ± 0.09***   | 1.65 ± 0.33 | 1.80 ± 0.068** | 1.96 ± 0.065 | 2.06 ± 0.09*   | 0.42 ± 0.02  | 0.30 ± 0.01*** |
| Blood serum | 4.19 ± 0.16  | 4.34 ± 0.19     | 134.5 ± 2.97 | 136.4 ± 1.82     | 2.23 ± 0.11   | 2.19 ± 0.18      | 0.97 ± 0.05 | 0.94 ± 0.07    | 27.44 ± 0.51 | 26.97 ± 0.62   | 20.82 ± 0.58 | 19.49 ± 0.96*  |

Notes: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Таблица 2**  
Динамика БЭ в тканях (мг/кг сырого веса) и сыворотке крови (ммоль/л — для K, Na, Ca, Mg; мкмоль/л — для Zn и Cu) животных в возрасте 3-х месяцев под влиянием общего охлаждения

| Биобъекты       | Биоэлементы    |                 |              |                 |               |                  |             |                |              |                |              |                 |           |             |           |             |
|-----------------|----------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------|------------------|-------------|----------------|--------------|----------------|--------------|-----------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|                 | K              |                 |              | Na              |               |                  | Ca          |                |              | Mg             |              |                 | Zn        |             | Cu        |             |
|                 | Ткани животных |                 |              |                 |               |                  |             |                |              |                |              |                 |           |             |           |             |
|                 | интактные      | охлажденные     | интактные    | охлажденные     | интактные     | охлажденные      | интактные   | охлажденные    | интактные    | охлажденные    | интактные    | охлажденные     | интактные | охлажденные | интактные | охлажденные |
| Кора            | 87,64 ± 1,36   | 81,7 ± 1,81***  | 80,93 ± 2,22 | 76,91 ± 3,33*** | 1,49 ± 0,12   | 1,56 ± 0,04      | 1,27 ± 0,04 | 1,30 ± 0,035   | 1,39 ± 0,091 | 1,39 ± 0,03    | 1,90 ± 0,04  | 2,06 ± 0,06***  |           |             |           |             |
| Подкорка        | 74,5 ± 4,74    | 76,83 ± 1,10*   | 65,97 ± 1,33 | 78,0 ± 1,79***  | 1,59 ± 0,14   | 1,59 ± 0,035     | 1,30 ± 0,03 | 1,47 ± 0,03*** | 1,03 ± 0,03  | 1,52 ± 0,12*** | 1,90 ± 0,04  | 1,78 ± 0,04***  |           |             |           |             |
| Печень          | 136,0 ± 2,66   | 130,8 ± 1,05*** | 77,31 ± 2,87 | 73,32 ± 2,62**  | 0,154 ± 0,003 | 0,150 ± 0,002*** | 1,71 ± 0,06 | 1,73 ± 0,05    | 1,68 ± 0,04  | 1,91 ± 0,12*** | 0,39 ± 0,02  | 0,31 ± 0,02***  |           |             |           |             |
| Сердце          | 137,2 ± 2,42   | 139,1 ± 3,49    | 94,73 ± 1,59 | 92,86 ± 2,24    | 2,48 ± 0,09   | 2,23 ± 0,05***   | 1,83 ± 0,05 | 1,89 ± 0,04**  | 1,25 ± 0,06  | 1,77 ± 0,11*** | 0,41 ± 0,015 | 0,52 ± 0,05***  |           |             |           |             |
| Почки           | 145,2 ± 8,41   | 141,2 ± 2,42    | 94,78 ± 2,95 | 94,86 ± 1,32    | 1,29 ± 0,045  | 1,24 ± 0,03*     | 1,98 ± 0,10 | 2,15 ± 0,16*   | 2,60 ± 0,17  | 2,25 ± 0,07*** | 0,29 ± 0,01  | 0,27 ± 0,01***  |           |             |           |             |
| Селезенка       | 161,7 ± 2,86   | 158,4 ± 3,56*   | 101,4 ± 5,10 | 100,7 ± 12,46   | 2,70 ± 0,06   | 2,78 ± 0,097*    | 1,90 ± 0,08 | 2,63 ± 0,08*** | 1,82 ± 0,08  | 2,35 ± 0,10*** | 0,32 ± 0,02  | 0,25 ± 0,01***  |           |             |           |             |
| Легкие          | 133,4 ± 1,56   | 134,3 ± 2,90    | 93,71 ± 4,16 | 103,0 ± 2,46*** | 2,32 ± 0,04   | 2,10 ± 0,1       | 1,65 ± 0,33 | 1,78 ± 0,08*** | 1,96 ± 0,065 | 2,50 ± 0,10*** | 0,42 ± 0,02  | 0,30 ± 0,02***  |           |             |           |             |
| Сыворотка крови | 4,19 ± 0,16    | 4,60 ± 0,22***  | 134,5 ± 2,97 | 134,7 ± 1,77    | 2,23 ± 0,11   | 2,68 ± 0,14***   | 0,97 ± 0,05 | 1,02 ± 0,047*  | 27,44 ± 0,51 | 27,14 ± 0,57   | 20,22 ± 0,58 | 21,05 ± 0,68*** |           |             |           |             |

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Table 2**  
BE dynamics in tissues (mg/kg of raw weight) and blood serum (mM/l — for K, Na, Ca, Mg;  $\mu$ M/l — for Zn and Cu) of animals in the age of 3 months under general cooling effect

| Bioobjects  | Bioelements     |                   |              |                   |               |                   |             |                   |              |                   |              |                   |        |                   |        |                   |  |  |
|-------------|-----------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------------|-------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--|--|
|             | K               |                   |              | Na                |               |                   | Ca          |                   |              | Mg                |              |                   | Zn     |                   |        | Cu                |  |  |
|             | Animals tissues |                   |              |                   |               |                   |             |                   |              |                   |              |                   |        |                   |        |                   |  |  |
|             | intact          | under cold effect | intact       | under cold effect | intact        | under cold effect | intact      | under cold effect | intact       | under cold effect | intact       | under cold effect | intact | under cold effect | intact | under cold effect |  |  |
| Cortex      | 87.64 ± 1.36    | 81.7 ± 1.81***    | 80.93 ± 2.22 | 76.91 ± 3.33***   | 1.49 ± 0.12   | 1.56 ± 0.04       | 1.27 ± 0.04 | 1.30 ± 0.035      | 1.39 ± 0.091 | 1.39 ± 0.03       | 1.90 ± 0.04  | 2.06 ± 0.06***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Subcortex   | 74.5 ± 4.74     | 76.83 ± 1.10*     | 65.97 ± 1.33 | 78.0 ± 1.79***    | 1.59 ± 0.14   | 1.59 ± 0.035      | 1.30 ± 0.03 | 1.47 ± 0.03***    | 1.03 ± 0.03  | 1.52 ± 0.12***    | 1.90 ± 0.04  | 1.78 ± 0.04***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Liver       | 136.0 ± 2.66    | 130.8 ± 1.05***   | 77.31 ± 2.87 | 73.32 ± 2.62**    | 0.154 ± 0.003 | 0.150 ± 0.002***  | 1.71 ± 0.06 | 1.73 ± 0.05       | 1.68 ± 0.04  | 1.91 ± 0.12***    | 0.39 ± 0.02  | 0.31 ± 0.02***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Heart       | 137.2 ± 2.42    | 139.1 ± 3.49      | 94.73 ± 1.59 | 92.86 ± 2.24      | 2.48 ± 0.09   | 2.23 ± 0.05***    | 1.83 ± 0.05 | 1.89 ± 0.04**     | 1.25 ± 0.06  | 1.77 ± 0.11***    | 0.41 ± 0.015 | 0.52 ± 0.05***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Kidneys     | 145.2 ± 8.41    | 141.2 ± 2.42      | 94.78 ± 2.95 | 94.86 ± 1.32      | 1.29 ± 0.045  | 1.24 ± 0.03*      | 1.98 ± 0.10 | 2.15 ± 0.16*      | 2.60 ± 0.17  | 2.25 ± 0.07***    | 0.29 ± 0.01  | 0.27 ± 0.01***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Spleen      | 161.7 ± 2.86    | 158.4 ± 3.56*     | 101.4 ± 5.10 | 100.7 ± 12.46     | 2.70 ± 0.06   | 2.78 ± 0.097*     | 1.90 ± 0.08 | 2.63 ± 0.08***    | 1.82 ± 0.08  | 2.35 ± 0.10***    | 0.32 ± 0.02  | 0.25 ± 0.01***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Lungs       | 133.4 ± 1.56    | 134.3 ± 2.90      | 93.71 ± 4.16 | 103.0 ± 2.46***   | 2.32 ± 0.04   | 2.10 ± 0.1        | 1.65 ± 0.33 | 1.78 ± 0.08***    | 1.96 ± 0.065 | 2.50 ± 0.10***    | 0.42 ± 0.02  | 0.30 ± 0.02***    |        |                   |        |                   |  |  |
| Blood serum | 4.19 ± 0.16     | 4.60 ± 0.22***    | 134.5 ± 2.97 | 134.7 ± 1.77      | 2.23 ± 0.11   | 2.68 ± 0.14***    | 0.97 ± 0.05 | 1.02 ± 0.047*     | 27.44 ± 0.51 | 27.14 ± 0.57      | 20.22 ± 0.58 | 21.05 ± 0.68***   |        |                   |        |                   |  |  |

Notes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



Таблица 3

Динамика содержания БЭ в тканях (мг/кг сырого веса) и сыворотке крови (ммоль/л — для К, Na, Ca, Mg; мкмоль/л — для Zn и Cu) животных в возрасте 6-ти месяцев под влиянием общего охлаждения

| Биобъекты       | Биоэлементы   |                 |              |                 |              |                 |             |                |              |                |
|-----------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|----------------|--------------|----------------|
|                 | K             |                 | Na           |                 | Ca           |                 | Mg          |                | Zn           |                |
|                 | интактные     | охлажденные     | интактные    | охлажденные     | интактные    | охлажденные     | интактные   | охлажденные    | интактные    | охлажденные    |
| Кора            | 80,97 ± 5,20  | 66,54 ± 2,90*** | 69,46 ± 3,68 | 64,47 ± 3,50**  | 1,82 ± 0,09  | 1,51 ± 0,10     | 1,29 ± 0,06 | 1,05 ± 0,05*** | 1,19 ± 0,15  | 1,23 ± 0,06    |
| Подкорка        | 79,5 ± 7,37   | 75,09 ± 3,49    | 98,07 ± 6,04 | 74,42 ± 2,65*** | 2,98 ± 0,34  | 1,80 ± 0,06***  | 1,80 ± 0,29 | 1,47 ± 0,11**  | 1,59 ± 0,13  | 1,56 ± 0,13    |
| Печень          | 141,63 ± 3,68 | 135,81 ± 3,53** | 85,99 ± 4,46 | 76,88 ± 2,62*** | 0,15 ± 0,003 | 0,16 ± 0,006*** | 1,77 ± 0,05 | 1,59 ± 0,12    | 1,72 ± 0,08  | 1,64 ± 0,06**  |
| Сердце          | 135,1 ± 3,07  | 143,5 ± 4,64*** | 93,83 ± 1,37 | 92,50 ± 1,68    | 2,53 ± 0,04  | 2,41 ± 0,10**   | 1,90 ± 0,03 | 1,76 ± 0,08*** | 1,44 ± 0,06  | 1,47 ± 0,05    |
| Почки           | 153,6 ± 4,89  | 148,68 ± 2,76** | 106,0 ± 2,05 | 98,13 ± 1,63*** | 1,41 ± 0,07  | 1,45 ± 0,06***  | 2,36 ± 0,10 | 1,64 ± 0,07*** | 2,13 ± 0,11  | 2,20 ± 0,10    |
| Селезенка       | 146,6 ± 2,86  | 150,8 ± 9,87    | 100,5 ± 2,61 | 95,2 ± 3,07**   | 2,86 ± 0,07  | 3,28 ± 0,18***  | 2,60 ± 0,05 | 2,07 ± 0,05*** | 1,65 ± 0,05  | 1,95 ± 0,14*** |
| Легкие          | 139,6 ± 2,00  | 165,9 ± 3,40*** | 94,70 ± 1,70 | 107,0 ± 2,10    | 3,0 ± 0,09   | 2,50 ± 0,10***  | 1,80 ± 0,07 | 1,30 ± 0,05*** | 2,06 ± 0,10  | 2,50 ± 0,12*** |
| Сыворотка крови | 4,34 ± 0,19   | 3,76 ± 0,25***  | 136,4 ± 1,82 | 131,4 ± 4,09**  | 2,19 ± 0,18  | 2,26 ± 0,15***  | 0,94 ± 0,07 | 0,98 ± 0,06    | 26,97 ± 0,62 | 27,25 ± 0,35   |

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Table 3

BE content dynamics in tissues (mg/kg of raw weight) and blood serum (mM/l — for K, Na, Ca, Mg;  $\mu$ M/l — for Zn and Cu) of animals in the age of 6 months under general cooling effect

| Bioobjects  | Bioelements   |                   |              |                   |              |                   |             |                   |              |                   |
|-------------|---------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------|-------------------|--------------|-------------------|
|             | K             |                   | Na           |                   | Ca           |                   | Mg          |                   | Zn           |                   |
|             | intact        | under cold effect | intact       | under cold effect | intact       | under cold effect | intact      | under cold effect | intact       | under cold effect |
| Cortex      | 80,97 ± 5,20  | 66,54 ± 2,90***   | 69,46 ± 3,68 | 64,47 ± 3,50**    | 1,82 ± 0,09  | 1,51 ± 0,10       | 1,29 ± 0,06 | 1,05 ± 0,05***    | 1,19 ± 0,15  | 1,23 ± 0,06       |
| Subcortex   | 79,5 ± 7,37   | 75,09 ± 3,49      | 98,07 ± 6,04 | 74,42 ± 2,65***   | 2,98 ± 0,34  | 1,80 ± 0,06***    | 1,80 ± 0,29 | 1,47 ± 0,11**     | 1,59 ± 0,13  | 1,56 ± 0,13       |
| Liver       | 141,63 ± 3,68 | 135,81 ± 3,53**   | 85,99 ± 4,46 | 76,88 ± 2,62***   | 0,15 ± 0,003 | 0,16 ± 0,006***   | 1,77 ± 0,05 | 1,59 ± 0,12       | 1,72 ± 0,08  | 1,64 ± 0,06**     |
| Heart       | 135,1 ± 3,07  | 143,5 ± 4,64***   | 93,83 ± 1,37 | 92,50 ± 1,68      | 2,53 ± 0,04  | 2,41 ± 0,10**     | 1,90 ± 0,03 | 1,76 ± 0,08***    | 1,44 ± 0,06  | 1,47 ± 0,05       |
| Kidneys     | 153,6 ± 4,89  | 148,68 ± 2,76**   | 106,0 ± 2,05 | 98,13 ± 1,63***   | 1,41 ± 0,07  | 1,45 ± 0,06***    | 2,36 ± 0,10 | 1,64 ± 0,07***    | 2,13 ± 0,11  | 2,20 ± 0,10       |
| Spleen      | 146,6 ± 2,86  | 150,8 ± 9,87      | 100,5 ± 2,61 | 95,2 ± 3,07**     | 2,86 ± 0,07  | 3,28 ± 0,18***    | 2,60 ± 0,05 | 2,07 ± 0,05***    | 1,65 ± 0,05  | 1,95 ± 0,14***    |
| Lungs       | 139,6 ± 2,00  | 165,9 ± 3,40***   | 94,70 ± 1,70 | 107,0 ± 2,10      | 3,0 ± 0,09   | 2,50 ± 0,10***    | 1,80 ± 0,07 | 1,30 ± 0,05***    | 2,06 ± 0,10  | 2,50 ± 0,12***    |
| Blood serum | 4,34 ± 0,19   | 3,76 ± 0,25***    | 136,4 ± 1,82 | 131,4 ± 4,09**    | 2,19 ± 0,18  | 2,26 ± 0,15***    | 0,94 ± 0,07 | 0,98 ± 0,06       | 26,97 ± 0,62 | 27,25 ± 0,35      |

Notes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



реактивности и адаптационных возможностей организма.

Полученные данные о более разнообразной и разнонаправленной динамике содержания БЭ в группе 3-месячных животных (пубертатный возраст), в частности, в такой важной структуре, как гипоталамус, возможно, отражают большую уязвимость в этом возрасте церебральных механизмов регуляции функций. С другой стороны, что подтверждается и данными [3, 7], такие изменения могут играть определенную положительную роль в реорганизации деятельности центральных регуляторных механизмов, поскольку они предоставляют более широкие возможности для формирования адаптивных реакций организма на экзо- и эндогенные воздействия в пубертатном возрасте.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риж М. А., Строчкова Я. С. Микроэлементозы человека. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
2. Артемчук А. П. Зміни вмісту деяких гормонів у плазмі крові підлітків на різних етапах формування алкогольної залежності // Укр. вісник психоневрології. – 1996. – Т. 4, вип. 4(11). – С. 146–148.
3. Бажанова Е. Д., Черниговская Е. В., Данилова О. А. Гипоталамическая регуляция функции коры надпочечников у старых и молодых крыс // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1998. – Т. 34, № 2. – С. 233–239.
4. Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Действие двухвалентных катионов на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому стрессу и холодовому шоку // Пробл. криобиологии. – 1998. – № 1. – С. 30–35.
5. Райцес В. С. Нейрофизиологические основы действия микроэлементов. – Л.: Медицина, 1981. – 152 с.
6. Смоляр В. И. Гипо- и гиперэлементозы. – Киев: Здоров'я, 1989. – 150 с.
7. Хайцев Н. В. Роль возрастных, половых и индивидуальных особенностей организма в устойчивости к гипоксии // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1998. – Т. 34, № 6. – С. 734–736.
8. Черниговская Е. В., Бажанова Е. Д., Тибо Ж., Данилова О. А. Участие моноаминергических клеток гипоталамуса в регуляции стрессорной реакции организма при старении // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1999. – Т. 35, № 1. – С. 48–52.

Поступила 22.10.99

such an important structure as hypothalamus, probably, reflect a great vulnerability of cerebral mechanisms of the functions regulation in this age. From another hand, that is confirmed by the data [3, 7] these changes may play a certain positive role in the reorganization of the activity of central regulatory mechanisms, since they render wider opportunities to form adaptive responses of an organism to exo- and endogenic effects in pubertant age.

### REFERENCES

1. Avtsyn A. P., Zhavoronkov A. A., Rish M. A., Storchkova Ya. S. Human microelementoses. – M: Meditsina, 1991. – 496 p.
2. Artemchuk A. P. Changes in the content of some hormones in blood plasm of teenagers at different stages of alcohol dependency forming // Ukr. visnyk psukhonevrologii. – 1996. – 4, issue 4(11). – P. 146–148.
3. Bazhanova E. D., Chernigovskaya E. V., Danilova O. A. Hypothalamic regulation of adrenal cortex regulation in old and young rats // J. of Evolutional Biochemistry and Physiology. – 1998. – 34, № 2. – P. 233–239.
4. Orlova N. V., Shpakova N. M. Effect of two-valent cations on the sensitivity of erythrocytes to hyperosmotic stress and cold shock // Problemy Kriobiologii. – 1998. – № 1. – P. 30–35.
5. Raitses V. S. Neurophysiological grounds of microelements effect. – L: Meditsina, 1981. – 152 p.
6. Smolyar V. I. Hypo- and hyperelementoses. – Kiev: Zdorov'ya, 1989. – 150 p.
7. Khaitsev N. V. The role of age, sexual and individual peculiarities in the resistance to hypoxia // J. of Evolutional Biochemistry and Physiology. – 1998. – 34, № 6. – P. 734–736.
8. Chernigovskaya E. V., Bazhanova E. D., Tibo Zh., Danilova O. A. Participation of hypothalamus monoaminergic cells in the regulation of an organism's stress response during ageing // J. of Evolutional Biochemistry and Physiology. – 1999. – 35, № 1. – P. 48–52.

Accepted in 22.10.99



## **Влияние условий хранения на сахаролитические свойства криоконсервированных и лиофилизированных бактерий *Escherichia coli***

И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Л. В. СТЕПАНЮК

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

## **Effect of Storage Conditions on Sugar-lytic Properties of Cryopreserved and Frozen-dried Bacteria *Escherichia Coli***

I. P. VYSEKANTSEV, L. V. STEPANYUK

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

Установлено, что криоконсервирование и лиофилизация не изменяют спектр сахаролитических свойств бактерий. В то же время активность  $\beta$ -галактозидазы в процессе замораживания-отогрева, лиофилизации и хранения лиофилизированных бактерий при температурах от 37 до  $-25^{\circ}\text{C}$  снижается. Наличие в среде консервирования антиоксиданта тиомочевины способствует более высокой сохранности активности  $\beta$ -галактозидазы в лиофилизированных бактериях.

Встановлено, що криоконсервування і ліофілізація не змінюють спектр сахаролітичних властивостей бактерій. У той же час активність  $\beta$ -галактозидази в процесі заморожування-відігрівання, ліофілізації і зберігання ліофілізованих бактерій при температурах від 37 до  $-25^{\circ}\text{C}$  знижується. Наявність у середовищі консервування антиоксиданту тіомочевини сприяє більш високій цілості активності  $\beta$ -галактозидази в ліофілізованих бактеріях.

It has been established, that cryopreservation and freeze-drying do not change the spectrum of bacteria sugar-lytic properties. At the same time the  $\beta$ -galactosidase activity in the process of freeze-thawing, freeze-drying and storage of frozen-dried bacteria at the temperatures from 37 down to  $-25^{\circ}\text{C}$  decreases. Thiourea presence as an antioxidant in cryopreservation medium contributes to a higher integrity of  $\beta$ -galactosidase activity in frozen-dried bacteria.

Основные требования к способам консервирования микроорганизмов — обеспечение сохранности их жизнеспособности, генотипа и функционального состояния, связанного с сохранением фенотипических свойств [8, 9]. Наиболее эффективными методами консервирования микроорганизмов являются криоконсервирование и лиофилизация [4, 8]. Большое значение в обеспечении сохранности микроорганизмов при криоконсервировании и лиофилизации имеет состав среды консервирования, а при лиофилизации — еще и температура хранения лиофилизированных образцов [2]. Поскольку бактерии *E. coli* являются С-гетеротрофами и их потребность в углеводе обеспечивают сахаролитические ферменты за счет таких источников, как сахара и многоатомные спирты [3], целью настоящего исследования было изучение влияния состава защитных сред и температуры хранения на сахаролитические свойства криоконсервированных и лиофилизированных бактерий *E. coli*.

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* B (штамм получен из Российской коллекции промышленных микроорганизмов, ГНИИ генетика, Москва). Бактерии выращивали в минеральной среде М9 [7] при  $37^{\circ}\text{C}$  с аэрацией до начала стационарной фазы роста, осаждали центрифугирова-

Main requirements to cryopreservation ways of microorganisms are the providing of their viability, gene type and functional state, related to the preservation of phenotypic properties [8, 9]. Cryopreservation and freeze-drying are the most efficient cryopreservation methods of microorganisms [4, 8]. A significant value in providing microorganism integrity at cryopreservation and freeze-drying belongs to the composition of cryopreservation medium, and at freeze-drying — the storage temperature of frozen-dried samples [2]. Since *E. coli* bacteria are C-heterotrophs and their need in carbon is provided by sugar-lytic enzymes due to such sources as sugars and multiatom alcohols [3]. The aim of this study was to investigate the effect of composition of protective media and storage temperature on sugar lytic properties of cryopreserved and frozen-dried *E. coli* bacteria.

*E. coli* B bacteria (the strain was received from the Russian collection of industrial microorganisms, State R&D Institute of genetics, Moscow). Bacteria were grown in the M9 mineral medium [7] at  $37^{\circ}\text{C}$  with an aeration before starting a stationary growth phase. Bacteria were sedimented by centrifugation (15 min at 4 000 rot/min) and were resuspended in cryopreservation media. The following media were used for



нием (15 мин при 4 000 об/мин) и ресуспендировали в средах консервирования. Для криоконсервирования использовали следующие среды: минеральная среда М9, среда М9 + 10% ДМСО, среда М9 + 10% глицерина, среда М9 + 10% сахарозы, среда М9 + 10% ПЭО-400. Лиофилизировали бактерии в среде 1 (среда М9 + 10% сахарозы + 1% желатина) и в среде 2 (среда М9 + 10% сахарозы + 1% желатина + 1% тиомочевина).

Бактерии замораживали погружением в жидкий азот, используя металлические контейнеры объемом 10 мл. Хранили образцы в жидком азоте, отогревали на водяной бане при 37 °С.

Для лиофилизации (на установке УЗВ-2 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, Харьков) бактерии вносили по 1 мл в пенициллиновые флаконы. Образцы замораживали в камере до -30 °С со скоростью 2 °С/мин. Сублимацию проводили при остаточном давлении в камере 130–180 мПа. Конечная температура сушки 17–20 °С. Остаточная влажность лиофилизированных образцов 1,5–3%. Хранили образцы герметично упакованными при температурах 37, 4, -10, -25, -70 °С, регидратировали дистиллированной водой.

Сахаролитическую активность бактерий изучали по способности ферментировать сахара (глюкозу, мальтозу, лактозу, маннит, сахарозу) [5].

Активность β-галактозидазы, фермента, катализирующего гидролиз β-галактозидов, определяли по методу, описанному в [7]; бактерии отмывали от среды консервирования и ресуспендировали до концентрации  $1 \cdot 10^8$  кл/мл в среде 1×А. Жизнеспособность бактерий определяли по способности формировать макроколонии на агаризованной среде [5]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методикам [5].

cryopreservatoin: M9 mineral medium, M9 medium + 10% DMSO, M9 medium + 10% glycerol, M9 medium + 10% sucrose, M9 medium + 10% PEO-400. Bacteria were frozen-dried in the medium 1 (M9 medium + 10% sucrose + 1% gelatin) and in the medium 2 (M9 medium + 10% sucrose + 1% gelatin + 1% thiourea).

Bacteria were frozen by means of the immersion into a liquid nitrogen using metal containers with the volume of 10 ml. Samples were stored in a liquid nitrogen, thawed on a water bath at 37 °C.

For freeze-drying bacteria were placed by 1 ml into penicillin bottles by means of UZV-2 produced by Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. The samples were frozen in the chamber down to -30 °C with the rate of 2 °C/min. Sublimation was carried out at residual pressure in the chamber of 130–180 mPa. Final temperature of drying made 17–20 °C. Residual humidity of frozen-dried samples made 1.5–3%. Samples were stored as hermetically sealed at the temperature of 37, 4, -10, -25, -70 °C and were rehydrated by distilled water.

Sugar-lytic activity of bacterium was studied on the ability to fermentate glucose, maltose, lactose, mannitol, sucrose [5].

β-galactosidase activity, enzyme, catalizing β-galactosides hydrolysis was determined according to the method described in [7]; bacteria were washed out of cryopreservation medium and resuspended up to the concentration of  $1 \cdot 10^8$  cells/ml in the 1×А medium. Bacteria viability was determined on the ability to form macrocolonies on a dense medium [5]. Statistical processing of obtained results was conducted on common methods [5].

Таблица 1

Table 1

Количество жизнеспособных бактерий *E. coli*, хранившихся при температуре -196 °С в различных защитных средах

Number of viable *E. coli* bacteria, stored at the temperature of -196 °C in various protective media

| Срок хранения, мес<br>Term of storage, months                                                 | Количество жизнеспособных бактерий в 1 мл после хранения в защитных средах<br>Number of viable bacteria in 1 ml after storage in protective media |                                 |                                         |                                       |                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                                                               | M9                                                                                                                                                | M9 + 10% ДМСО<br>M9 + 10% DMSO  | M9 + 10% глицерина<br>M9 + 10% glycerol | M9 + 10% сахарозы<br>M9 + 10% sucrose | M9 + 10% ПЭО-400<br>M9 + 10% PEO-400 |
| До криоконсервирования<br>(контроль 1)<br>Before cryopreservation<br>(control 1)              | $(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^9$                                                                                                                        | $(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^9$      | $(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^9$              | $(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^9$            | $(4,1 \pm 0,3) \cdot 10^9$           |
| Сразу после криоконсервирования<br>(контроль 2)<br>Just after cryopreservation<br>(control 2) | $(3,9 \pm 0,2) \cdot 10^9^{**}$                                                                                                                   | $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^9^{**}$ | $(3,5 \pm 0,3) \cdot 10^9^{**}$         | $(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^9^{**}$       | $(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^9^{**}$      |
| 12                                                                                            | $(3,9 \pm 0,4) \cdot 10^9^*$                                                                                                                      | $(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^9^*$    | $(3,3 \pm 0,5) \cdot 10^9^*$            | $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^9^*$          | $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^9^*$         |
| 24                                                                                            | $(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^9^*$                                                                                                                      | $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^9^*$    | $(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^9^*$            | $(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^9^*$          | $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^9^*$         |

Примечания: \* уровень доверительной вероятности между средними значениями сразу после замораживания и после хранения в жидком азоте,  $p > 0,05$ ; \*\* уровень доверительной вероятности между средними значениями до и сразу после замораживания,  $p_1 > 0,05$ .

Notes: \* level of confidential probability between average values just after freezing and after storage in a liquid nitrogen,  $p > 0.05$ ; \*\* the level of confidential probability between average values before and just after freezing;  $p_1 > 0.05$ .



При хранении криоконсервированных бактерий в течение двух лет их жизнеспособность не изменялась. Количество жизнеспособных лиофилизированных бактерий зависело от состава среды и температуры хранения (табл. 1). Более высокую сохранность бактерий как на этапах лиофилизации, так и в процессе их хранения обеспечивала среда 2 с добавлением тиомочевина (табл. 2). Так, в среде 1 количество бактерий, погибших на этапах процесса лиофилизации, было больше, чем в среде 2. При температуре хранения 37 °С бактерии, лиофилизированные в среде 1, погибали через 1 месяц, при 4 °С — между 3-м и 12-м месяцами хранения. При температурах -10, -25, -70 °С в образцах с бактериями, лиофилизированными в среде 1, жизнеспособные бактерии сохранялись в течение двух лет, однако их количество в процессе хранения достоверно снижалось. С понижением

During the storage of cryopreserved bacteria within two years their viability did not change. The number of viable frozen-dried bacteria depended on the medium composition and storage temperature (Table 1). The medium 2 with adding thiourea provided a higher bacteria integrity both at the stages of freeze-drying and in the process of their storage (Table 2). Thus in the medium 1 the bacteria died at the stages of freeze-drying process were more, than in the medium 2. At the storage temperature of 37 °C the bacteria. Frozen-dried in the medium 1, died in a month, at 4 °C — between the 3rd and 12th months of their storage. At the temperatures of -10, -25, -70 °C viable bacteria were preserved within 2 years in the samples with bacteria, frozen-dried in the medium 1, but their number in the storage process significantly decreased. In the medium 2 viable bacteria preserved within 2 years at the temperatures of 4,

Таблица 2

Table 2

Влияние среды консервирования и температуры хранения на количество жизнеспособных лиофилизированных бактерий *E. coli*

The effect of cryopreservation medium and storage temperature on the number of viable frozen-dried *E. coli* bacteria

| Срок хранения, мес<br>Storage term, months                                    | Среда консервирования<br>Cryopreservation medium | Количество жизнеспособных бактерий в 1 мл, хранившихся в лиофилизированном состоянии при температурах, °С<br>Number of frozen-dried bacteria in 1 ml, stored in a frozen-dried state under temperatures, °C |                                |                                |                                |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|                                                                               |                                                  | 37                                                                                                                                                                                                          | 4                              | -10                            | -25                            | -70                             |
| До лиофилизации (контроль 1)<br>Before freeze-drying (control 1)              | 1                                                | $(1,68 \pm 0,30) \cdot 10^9$                                                                                                                                                                                |                                |                                |                                |                                 |
| Сразу после лиофилизации (контроль 2)<br>Just after freeze-drying (control 2) |                                                  | $(8,03 \pm 0,27) \cdot 10^8$ ***                                                                                                                                                                            |                                |                                |                                |                                 |
| 1                                                                             |                                                  | $(1,28 \pm 0,30) \cdot 10^2$ *                                                                                                                                                                              | $(1,24 \pm 0,27) \cdot 10^6$ * |                                |                                |                                 |
| 2                                                                             |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | $(1,01 \pm 0,32) \cdot 10^6$ * | $(2,49 \pm 0,39) \cdot 10^8$ * |                                |                                 |
| 3                                                                             |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | $(1,21 \pm 0,25) \cdot 10^3$ * |                                |                                |                                 |
| 12                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | 0                              | $(3,34 \pm 0,21) \cdot 10^7$ * | $(2,44 \pm 0,32) \cdot 10^8$ * | $(4,28 \pm 0,30) \cdot 10^8$ ** |
| 20                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             |                                | $(5,33 \pm 0,76) \cdot 10^4$ * | $(8,40 \pm 0,35) \cdot 10^7$ * | $(4,30 \pm 0,34) \cdot 10^8$ ** |
| 24                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             |                                | $(1,52 \pm 0,30) \cdot 10^4$ * | $(6,0 \pm 0,38) \cdot 10^7$ *  | $(4,40 \pm 0,40) \cdot 10^8$ ** |
| До лиофилизации (контроль 1)<br>Before freeze-drying (control 1)              | 2                                                | $(1,40 \pm 0,28) \cdot 10^9$                                                                                                                                                                                |                                |                                |                                |                                 |
| Сразу после лиофилизации (контроль 2)<br>Just after freeze-drying (control 2) |                                                  | $(6,56 \pm 0,30) \cdot 10^8$ ***                                                                                                                                                                            |                                |                                |                                |                                 |
| 1                                                                             |                                                  | $(2,34 \pm 0,41) \cdot 10^3$ *                                                                                                                                                                              | $(3,10 \pm 0,34) \cdot 10^8$ * |                                |                                |                                 |
| 2                                                                             |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | $(1,50 \pm 0,31) \cdot 10^8$ * | $(3,01 \pm 0,50) \cdot 10^8$ * |                                |                                 |
| 3                                                                             |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | $(7,40 \pm 0,22) \cdot 10^6$ * |                                |                                |                                 |
| 12                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | $(6,23 \pm 0,30) \cdot 10^8$ * | $(2,13 \pm 0,28) \cdot 10^8$ * | $(4,77 \pm 0,25) \cdot 10^8$ * | $(6,86 \pm 0,59) \cdot 10^8$ ** |
| 20                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | $(3,14 \pm 0,31) \cdot 10^4$ * | $(5,18 \pm 0,29) \cdot 10^7$ * | $(4,10 \pm 0,30) \cdot 10^8$ * | $(5,40 \pm 0,47) \cdot 10^8$ ** |
| 24                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                             | $(1,06 \pm 0,36) \cdot 10^3$ * | $(3,79 \pm 0,36) \cdot 10^7$ * | $(1,27 \pm 0,36) \cdot 10^8$ * | $(4,96 \pm 0,80) \cdot 10^8$ ** |

Примечания: 0 — жизнеспособные бактерии отсутствуют; \* уровень доверительной вероятности между средними значениями сразу после лиофилизации и в процессе хранения,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$ ; \*\*\* уровень доверительной вероятности между средними значениями до и после лиофилизации,  $p_1 < 0,05$ .

Notes: 0 — viable bacteria are absent; \* level of confidential probability between average values just after freeze-drying and in storage process,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$ ; \*\*\* the level of confidential probability between average values before and just after freeze-drying,  $p_2 < 0,05$ .



Таблица 3

Table 3

Активность  $\beta$ -галактозидазы бактерий *E. coli*, хранившихся при температуре  $-196^\circ\text{C}$  в различных защитных средах

$\beta$ -galactosidase activity of *E. coli* bacteria, stored at the temperature of  $-196^\circ\text{C}$  in various protective media

| Срок хранения, мес<br>Term of storage, months                                                 | Активность $\beta$ -галактозидазы, ед./мг белка, после хранения в защитных средах<br>$\beta$ -galactosidase activity, units/mg of protein, after storage in protective media |                                |                                         |                                       |                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                                                               | M9                                                                                                                                                                           | M9 + 10% ДМСО<br>M9 + 10% DMSO | M9 + 10% глицерина<br>M9 + 10% glycerol | M9 + 10% сахарозы<br>M9 + 10% sucrose | M9 + 10% ПЭО-400<br>M9 + 10% PEO-400 |
| До криоконсервирования<br>(контроль 1)<br>Before cryopreservation<br>(control 1)              | 806 $\pm$ 24                                                                                                                                                                 | 790 $\pm$ 17                   | 794 $\pm$ 23                            | 840 $\pm$ 19                          | 802 $\pm$ 26                         |
| Сразу после криоконсервирования<br>(контроль 2)<br>Just after cryopreservation<br>(control 2) | 716 $\pm$ 23*                                                                                                                                                                | 680 $\pm$ 19*                  | 702 $\pm$ 24*                           | 786 $\pm$ 21*                         | 702 $\pm$ 28*                        |
| 12                                                                                            | 714 $\pm$ 16**                                                                                                                                                               | 680 $\pm$ 24**                 | 704 $\pm$ 23**                          | 786 $\pm$ 24**                        | 702 $\pm$ 28**                       |
| 24                                                                                            | 714 $\pm$ 31**                                                                                                                                                               | 672 $\pm$ 34**                 | 702 $\pm$ 30**                          | 786 $\pm$ 28**                        | 704 $\pm$ 20**                       |

Примечания: \* уровень доверительной вероятности между средними значениями до криоконсервирования и в процессе хранения криоконсервированных образцов,  $p < 0,05$ ; \*\* уровень доверительной вероятности между средними значениями сразу после замораживания до  $-196^\circ\text{C}$  и после хранения криоконсервированных образцов,  $p_1 > 0,05$ .

Notes: \* level of confidential probability between average values before cryopreservation and in the process of storage of cryopreserved samples;  $p < 0,05$ ; \*\* level of confidential probability just after freezing down to  $-196^\circ\text{C}$  and after storage of cryopreserved samples;  $p_1 > 0,05$ .

Таблица 4

Table 4

Активность  $\beta$ -галактозидазы лиофилизированных бактерий *E. coli* после хранения при разных температурах в различных защитных средах

$\beta$ -galactosidase activity of frozen-dried *E. coli* bacteria, after storage at various temperatures in different protective media

| Срок хранения, мес<br>Storage term, months                                                  | Среда консервирования<br>Cryopreservation medium | Активность $\beta$ -галактозидазы, ед./мг белка, после хранения при температурах, $^\circ\text{C}$<br>$\beta$ -galactosidase activity, units/mg of protein, after storage at temperatures, $^\circ\text{C}$ |                |                |                |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                                                             |                                                  | 37                                                                                                                                                                                                          | 4              | -10            | -25            | -70            |
| До лиофилизации<br>(контроль 1)<br>Before freeze-drying<br>(control 1)                      | 1                                                | 814 $\pm$ 19                                                                                                                                                                                                |                |                |                |                |
| Через 6 ч после лиофилизации<br>(контроль 2)<br>In 6 hrs after freeze-drying<br>(control 2) |                                                  | 680 $\pm$ 14*                                                                                                                                                                                               | 680 $\pm$ 16*  | 680 $\pm$ 19*  | 680 $\pm$ 21*  | 680 $\pm$ 20*  |
| 1                                                                                           |                                                  | 342 $\pm$ 24**                                                                                                                                                                                              | 540 $\pm$ 20** | 672 $\pm$ 23*  |                |                |
| 3                                                                                           |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 470 $\pm$ 11** |                |                |                |
| 12                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 0              | 420 $\pm$ 32** | 590 $\pm$ 26** | 602 $\pm$ 29** |
| 20                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 0              |                |                |                |
| 24                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 0              | 398 $\pm$ 23** | 512 $\pm$ 36** | 602 $\pm$ 32** |
| До лиофилизации<br>(контроль 1)<br>Before freeze-drying<br>(control 1)                      | 2                                                | 808 $\pm$ 15                                                                                                                                                                                                |                |                |                |                |
| Через 6 ч после лиофилизации<br>(контроль 2)<br>In 6 hrs after freeze-drying<br>(control 2) |                                                  | 668 $\pm$ 18*                                                                                                                                                                                               | 668 $\pm$ 23*  | 668 $\pm$ 17*  | 668 $\pm$ 24*  | 668 $\pm$ 22*  |
| 1                                                                                           |                                                  | 386 $\pm$ 21**                                                                                                                                                                                              | 548 $\pm$ 29** | 668 $\pm$ 26** |                |                |
| 3                                                                                           |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 488 $\pm$ 18** |                |                |                |
| 12                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 412 $\pm$ 18** | 434 $\pm$ 21** | 604 $\pm$ 24** | 640 $\pm$ 20** |
| 20                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 402 $\pm$ 16** |                |                |                |
| 24                                                                                          |                                                  | 0                                                                                                                                                                                                           | 386 $\pm$ 34** | 408 $\pm$ 32** | 584 $\pm$ 22** | 640 $\pm$ 24** |

Примечания: 0 — отсутствие жизнеспособных клеток; \* уровень доверительной вероятности между средними значениями до и после лиофилизации,  $p < 0,05$ ; \*\* уровень доверительной вероятности между средними значениями после лиофилизации и в процессе хранения лиофилизированных образцов,  $p_1 < 0,05$ .

Notes: 0 — viable bacteria are absent; \* the level of confidential probability between average values before and after freeze-drying;  $p < 0,05$ ; \*\* level of confidential probability between average values after freeze-drying and in the storage process of frozen-dried samples,  $p_1 < 0,05$ .



температуры хранения количество погибших бактерий уменьшалось. В среде 2 жизнеспособные бактерии сохранялись в течение двух лет при температурах 4, -10, -25, -70 °C. При температурах 4, -10, -25 °C количество жизнеспособных бактерий снижалось в процессе хранения, но оставалось достаточно высоким по сравнению с образцами, лиофилизированными в среде 1. При температуре -70 °C бактерии в среде 2 не погибали.

У всех жизнеспособных бактерий, хранившихся в криоконсервированном и лиофилизированном состоянии, полностью сохранялся спектр сахаролитической активности. Активность фермента  $\beta$ -галактозидазы снижалась после замораживания-отогрева. При последующем хранении при -196 °C активность фермента не изменялась (табл. 3).

При лиофилизации бактерий, как и при последующем хранении, активность  $\beta$ -галактозидазы снижалась на всех этапах (табл. 4). Наличие тиомочевины в среде 2 обеспечивало более высокую сохранность фермента. В образцах, хранившихся при -70 °C, активность  $\beta$ -галактозидазы не снижалась.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процессы криоконсервирования и лиофилизации обеспечивают качественную сохранность структур бактериальных клеток, участвующих в ферментации перечисленных выше сахаров. Однако в клетках возникают нелетальные повреждения, в результате которых снижается активность фермента  $\beta$ -галактозидазы. Во время хранения образцов при -196 °C дополнительных повреждений не происходит и активность фермента не снижается. В процессе хранения лиофилизированных бактерий ферментативные и неферментативные реакции, в основном катаболические, по-видимому, не прекращаются. В результате развиваются дополнительные летальные (снижается количество жизнеспособных клеток при увеличении сроков и повышении температуры хранения) и нелетальные (снижается активность  $\beta$ -галактозидазы) повреждения. Добавление в среду консервирования тиомочевины или снижение температуры хранения до -70 °C оказывает защитный эффект и обеспечивает повышение сохранности  $\beta$ -галактозидазы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бекер М. Е., Ламберг А. Н., Рапопорт А. И. Анабиоз микроорганизмов. — Рига: Зинатне, 1981. — 247 с.
2. Белоус А. М., Цветков Д. У. Научные основы технологии сублимационного консервирования. — Киев: Наук. думка, 1985. — 208 с.
3. Готтшлак Г. Метаболизм бактерий. — М.: Мир, 1982. — 310 с.
4. Калакуцкий Л. В., Сидякина Т. М. Анабиоз и консервация микроорганизмов // Криобиология. — 1988. — № 4. — С. 3–9.
5. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. — М.: Медицина, 1978. — 344 с.
6. Лапин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 239 с.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
8. Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цуцаевой. — Киев: Наук. думка, 1991. — 176 с.
9. Lapage S. P. Preservation of microorganisms // Handb. Microbiol. Cleveland, Ohio. — 1973. — 1. — P. 713–724.

Поступила 02.03.99

-10, -25, -70 °C. At temperatures of 4, -10, -25 °C the number of viable bacteria reduced in the storage process, but remained quite a high in comparison with the samples being frozen-dried in the medium 1. At the temperature of -70 °C the bacteria in the medium 2 did not die. In all viable bacteria, stored in cryopreserved and frozen-dried state, the spectrum of sugar-lytic activity was completely kept. The activity of  $\beta$ -galactosidase enzyme reduced after freeze-thawing. During following storage at -196 °C the enzyme activity did not change (Table 3). Both during bacteria freeze-drying and following storage the  $\beta$ -galactosidase activity decreased (Table 4). The thiourea presence in the medium 2 provided a higher enzyme integrity. In the samples stored at -70 °C the  $\beta$ -galactosidase activity did not reduce. The results obtained testify that the processes of cryopreservation and freeze-drying provide a qualitative integrity of bacterial structures of the cells, participating in the fermentation of the mentioned above sugars.

However in cells non-lethal damages appear, resulted in a decrease of the  $\beta$ -galactosidase enzyme activity. During the storage at -196 °C no additional impairments occur and its activity does not reduce. In the storage process of frozen-dried bacteria enzymatic and non-enzymatic reactions, mainly catabolic ones, probably do not stop. As the result additional lethal (number of viable cells with an increase of the terms and storage temperature decreases) and non-lethal ( $\beta$ -galactosidase activity reduces) damages develop. An addition of thiourine or storage temperature decrease down to -70 °C cause a protective effect and provide an increase in  $\beta$ -galactosidase integrity.

## REFERENCES

1. Beker M. E., Lamberg A. I., Rapoport A. I. Anabiosis of microorganisms. — Riga: Zinatne, 1981. — 247 p.
2. Belous A. M., Tsvetkov D. U. Scientific grounds of the technology of sublimational preservation. — Kiev: Naukova Dumka, 1985. — 208 p.
3. Gottshlak G. Metabolism of bacteria. — M.: Mir, 1982. — 310 p.
4. Kalakutsky L. V., Sidiyagina T. M. Anabiosis and preservation of microorganisms // Kriobiologiya. — 1988. — № 4. — P. 3–9.
5. Labinskaya A. S. Microbiology with a technique of microbiological studies. — M.: Meditsina, 1978. — 344 p.
6. Lapin G. F. Biometry. — M.: Vysshaya shkola, 1980. — 239 p.
7. Miller J. Experiments in molecular genetics. — M.: Mir, 1976. — 436 p.
8. Tsutsayeva A. A., Mikulinsky Yu. E., Vysekantsev I. P. et al. Cold stress and biological systems. — Kiev: Naukova Dumka, 1991. — 176 p.
9. Lapage S. P. Preservation of microorganisms // Handb. Microbiol. Cleveland, Ohio. — 1973. — V. 1. — P. 713–724.

Accepted in 02.03.99



# Влияние эквilibрации спермы карпа (*Cyprinus Carpio L.*) с криопротекторами на скорость эмбрионального развития

С. В. ТВОРОВСКИЙ

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

В. В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Carp (*Cyprinus carpio L.*) Sperm Equilibration with Cryoprotectants on the Rate of Embryonic Development

S. V. TVOROVSKY

Kharkov National University named by V. N. Karazin

V. V. CHEREPANOV

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

Изучено влияние охлаждения и эквilibрации спермы карпа с криозащитной средой, содержащей проникающие криопротекторы этиленгликоль (ЭГ) и диметилсульфоксид (ДМСО), на оплодотворяющую способность спермиев и развитие эмбрионов карпа (*Cyprinus carpio L.*). Установлено, что охлаждение и эквilibрация спермы карпа с криозащитной средой, содержащей ЭГ и ДМСО в 10%-х концентрациях, не изменяют оплодотворяющей способности спермы и течения эмбриогенеза. Доказано, что среда с ДМСО в 10%-й концентрации не оказывает влияния на оплодотворяющую способность спермиев, но значительно изменяет скорость течения эмбриогенеза. Вылупление личинок происходит на 2 ч 20 мин раньше, чем в контроле.

Вивчено вплив охолодження та еквilibрації сперми коропа з криозахисним середовищем, яке містить проникаючі криопротектори етиленгліколь (ЕГ) і диметилсульфоксид (ДМСО), на запліднюючу здатність спермій і розвиток ембріонів коропа (*Cyprinus carpio L.*). Установлено, що охолодження та еквilibрація сперми коропа з криозахисним середовищем, яке містить ЕГ і ДМСО в 10%-х концентраціях, не змінює запліднюючої здатності сперми і перебіг ембріогенезу. Доведено, що середовище з ДМСО в 10%-й концентрації не впливає на запліднюючу здатність спермій, але значно змінює швидкість перебігу ембріогенезу. Вилуплення личинок відбувається на 2 год 20 хв раніше, ніж у контролі.

The effect of carp sperm cooling and equilibration with the cryoprotective medium, containing ethylene glycol (EG) and dimethylsulphoxide (DMSO) penetrating cryoprotectants on the spermatozoa fertilizing activity and carp (*Cyprinus carpio*) embryos development has been studied. It has been established, that carp sperm cooling and equilibration with the cryoprotective medium, containing EG and DMSO in the 10% concentrations does not change the sperm fertilizing ability and embryogenesis course. It is proved, that the medium with DMSO in the 10% concentration does not affect the spermatozoa fertilizing ability, but considerably changes the rate of embryogenesis course. Larvae hatching occurs by 2 hrs 20 min earlier, than in the control.

Охлаждение и эквilibрация спермы с криозащитной средой — первый этап подготовки спермы к криоконсервации. На этом этапе в спермиях происходят различные биохимические и физиологические процессы, которые могут модулировать изменения основных физиологических параметров спермиев: движение, пенетрацию и оплодотворение яйцеклетки. Возможны также изменения генетических свойств сперматозоидов и механизмов, регулирующих экспрессию генома [6–9].

Цель данной работы — изучение воздействия проникающих криопротекторов (этиленгликоля и диметилсульфоксида) в различной концентрации на оплодотворяющую способность спермиев и развитие эмбрионов карпа (*Cyprinus carpio L.*), полученных с использованием этой спермы. Работы

Sperm cooling and equilibration with cryoprotective medium is the first stage of sperm preparing to cryopreservation. At this stage different biochemical and physiological processes, that may modulate the changes in main spermatozoa physiological parameters occur in spermatozoa: motility, penetration and oocyte fertilization. The changes in spermatozoa genetic characteristics and mechanisms, regulating genome expression are also feasible [6, 9].

The aim of the given work is to study the effect of penetrating cryoprotectants (EG and DMSO) in different concentrations on the sperm fertilizing ability and carp embryo development (*Cyprinus carpio L.*), obtained using this sperm. The experiments were carried-out at the base of Limansky warm water fishery farm in Kharkov region, the sex carp products were



проводились на базе Лиманского тепловодного рыбного хозяйства в Харьковской области, были использованы половые продукты карпа. Стимуляцию созревания проводили по традиционной рыбноводной методике, самцам одноразово вводили внутримышечно гомогенат гипофиза из расчета 2 мг/кг массы и через 24 ч получали сперму. Самкам массой 3–4 кг проводили стимуляцию овогенеза двукратной инъекцией гомогената гипофиза карпа из расчета 3 мг/кг массы тела. Яйцеклетки и сперму собирали в сухие и чистые емкости. Качество спермы до и после эквilibрации определяли визуально под микроскопом при увеличении  $\times 200$  и выражали в процентах подвижных клеток, движущихся прямолинейно, поступательно, к общему количеству клеток в поле зрения микроскопа. Для проведения эксперимента сперму охлаждали в холодильнике, осторожно смешивали в отношении 1:1 с охлажденной криозащитной средой (КЗС) и эквilibрировали в течение часа при температуре около 4 °C, после чего проводили осеменение икры полусухим способом. КЗС содержала следующие компоненты (мМ): NaCl – 59, KCl – 0,68, CaCl<sub>2</sub> – 0,68, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,1, NaHCO<sub>3</sub> – 27, сахароза – 3,4, D-маннит – 69, глутатион – 0,7, Трис-HCl – 118 (pH 8,1) [4] и криопротекторы диметилсульфоксид или этиленгликоль, наиболее часто используемые при замораживании спермы рыб, в 10-, 15- и 20%-й концентрации. При проведении эксперимента в чашку Петри к икре (около 200 клеток) приливали 0,1 мл нативной или 0,2 мл эквilibрированной спермы, 20 мл прудовой воды и перемешивали пером. Средняя температура инкубации икры 21,5 °C. За течением эмбриогенеза наблюдали при помощи бинокуляра. Эксперименты проводили 6 раз на икре и сперме, полученной от 6 самок и 12 самцов.

В результате экспериментов было установлено, что эквilibрация спермы с ЭГ в концентрации от 5 до 10% не оказывает влияния на активность и оплодотворяющую способность спермиев карпа. Не обнаружены изменения и в скорости течения эмбриогенеза. Аналогичные результаты были получены нами при оплодотворении икры спермиями, эквilibрированными с ДМСО в 5- и 7,5%-й концентрации.

При инкубации икры, оплодотворенной спермой, эквilibрированной с 10%-м ДМСО, обратили внимание на более ранний выклев личинки, в среднем на 2 ч 20 мин. Детальное исследование этого эффекта показало, что опережение развития у этих эмбрионов фиксировалось, уже начиная со стадии первого деления дробления (рисунок), т.е. до начала фенотипического проявления функции генома, начинающегося со стадии поздней бластулы. В промежутке между бластулой и мелкоклеточной морулой наблюдалась максимальная скорость эмбриогенеза. Высокая скорость опережения в развитии по отношению к контролю отмечалась в тече-

used. Maturation stimulation was conducted according to the traditional fishery methods, hypophysis homogenate was once intramuscularly injected to the males in respect of 2 mg/kg of the mass and in 24 hrs the sperm was obtained. The stimulation of ovogenesis by means of twofold injection of carp hypophysis homogenate in respect of 3 mg/kg of body mass was done to 3–4 kg females. Oocytes and sperm were taken into dry and clean vessels. Sperm quantity before and after equilibration was visually determined by means of microscope at  $\times 200$  magnification and was presented in the percentage of motile cells, moving forwardly to a total number of cells in the microscope vision field. To conduct the experiment the sperm was cooled in a refrigerator, carefully mixed in the ratio 1:1 with cooled cryoprotective medium (CCM) and equilibrated within an hour at the temperature about 4 °C, after that the larve insemination was carried out by means of semi-dry method. The CCM contained the following components (mM): NaCl – 59, KCl – 0.68, CaCl<sub>2</sub> – 0.68, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2.1, NaHCO<sub>3</sub> – 27, sucrose – 3.4, D-Mannit – 69, glutathione – 0.7, Tris-HCl – 118 (pH 8.1) [4] and DMSO or EG cryoprotectants, that are frequently used for fish sperm freezing in 10, 15 and 20% concentrations. When conducting the experiments 0.1 ml of native or 0.2 ml of equilibrated sperm, 20 ml pond water were added to the Petri dish to the larvae (about 200 cells) and then mixed by feather. An average temperature of larve incubation made 21.5 °C. The embryogenesis course was observed by means of binocular. The experiments were carried out 6 times in larvae and sperm, obtained from 6 females and 12 males.

In the results of these experiments it has been established, that sperm equilibration with EG in the concentration from 5 to 10% does not affect the activity and fertilizing ability of carp spermatozoa. No changes were found in the rate of embryogenesis course. Similar results were obtained by us when fertilizing the larvae by the spermatozoa, equilibrated with 10% DMSO, we paid attention to earlier larvae hatching, in average by 2 hrs 20 min. More detailed investigation of this effect demonstrated, that the overstripping in the development of these embryos were fixed even starting from the stage of the first cleavage division (Figure), that was before the start of phenotypical manifestation of genome function, beginning from the stage of late blastula. In the interval between blastula and finely cellular morula a maximum embryogenesis rate was observed. A high rate of overstripping in the development regarding to the control was noted during embryonic development up to the stage of eyes pigmentation, after which it considerably reduced.

Measurements of duration of one mitotic cycle of the first cleavage stage  $\tau_0$  [2] at the temperature of 21.5 °C showed, that this value in embryos, obtained using the sperm incubated in 10% DMSO solution in average by 2.5 min less then in the control and



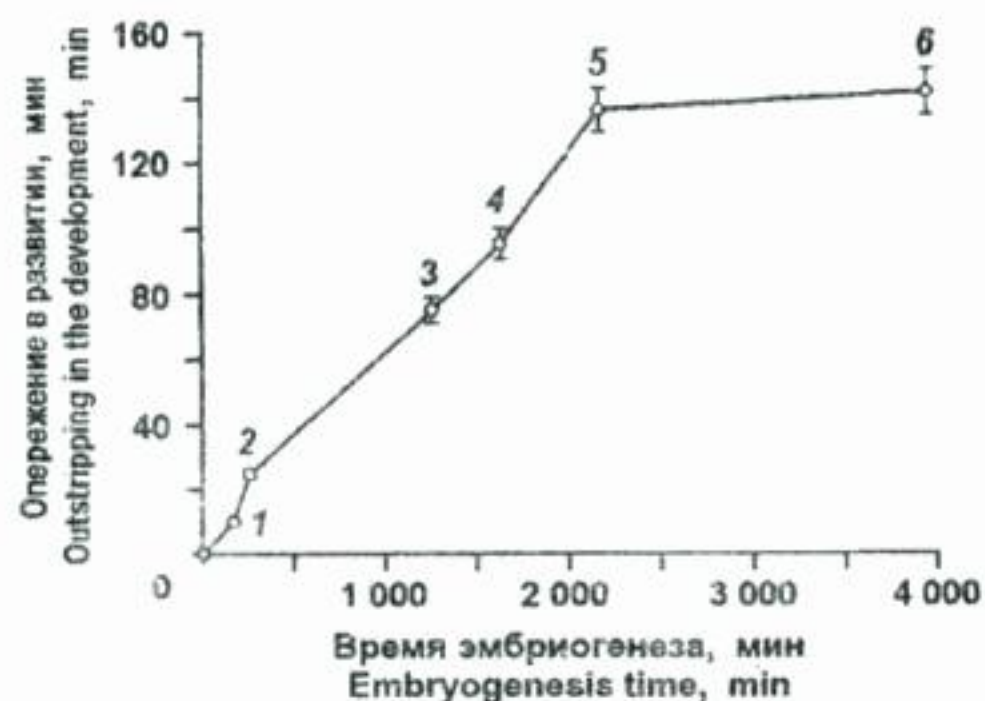
Влияние эквипирации спермы карпа в криозащитной среде, содержащей 10%-й ДМСО, на увеличение скорости развития: 1 — бластула (8 бластомеров); 2 — мелкоклеточная морула; 3 — образование трех пар туловищных сомитов и плотных зачатков глаз; 4 — начало сегментации хвостовой мезодермы; 5 — пигментация глаз; 6 — начало массового вылупления предличинок.

Carp sperm equilibration effect in cryoprotective medium, containing 10% DMSO, on the increase in the development rate: 1 — blastula (8 blastomers); 2 — fine cellular morula; 3 — formation of 3 pairs of body somites and dense eyes' rudiments; 4 — beginning of tail mesoderm segmentation; 5 — eyes' pigmentation; 6 — beginning of massive prelarvae hatching.

ние эмбрионального развития до стадии пигментации глаз, после которой она значительно снижалась.

Измерения продолжительности одного митотического цикла первых стадий дробления  $\tau_0$  [2] при температуре 21,5 °C показали, что эта величина у эмбрионов, полученных с использованием спермы, инкубированной в 10%-м растворе ДМСО, в среднем на 2,5 мин меньше, чем в контроле, и приближалась к таковой для температуры 23 °C (21,5 мин). У контрольных эмбрионов и у эмбрионов, подвергнутых другим экспериментальным воздействиям, скорость развития не отличалась от описанной для карпа при данной температуре ( $\tau_0 = 24$  мин) [3]. При уменьшении абсолютного значения  $\tau_0$  и общего времени эмбриогенеза увеличилось количество  $\tau_0$ , прошедших от оплодотворения до выклева (161 $\tau_0$  в контроле и 177 $\tau_0$  в опыте с 10%-м ДМСО). По-видимому, при использовании таких спермиев линейность изменения  $\tau_0$  в диапазоне нерестовых температур нарушается, а скорость дробления определяется или регулируется сперматозоидами или какими-то их компонентами. Так как увеличение скорости эмбрионального развития начинает проявляться уже на первых стадиях дробления, невозможно предположить, что этот эффект вызывается генетическим аппаратом самого спермия (он включается на стадии поздней бластулы, приблизительно через 6 ч после оплодотворения). Следовательно, увеличение скорости развития вызвано либо непосредственным влиянием ДМСО вследствие прямого контакта разбавленной КЗС спермы с яйцеклеткой, хотя при полусухом способе осеменения этот контакт почти отсутствует (разбавление спермы водой в 100 раз), либо каким-то компонентом сперматозоида, изменившимся под воздействием ДМСО и остающимся в ооплазме ооцита после образования мужского пронуклеуса. Известно, что в системе *in vitro* цитоплазматическая фракция оказывает влияние на транскрипцию в изолированных ядрах гепатоцитов крыс [10, 11].

Обработку спермы карпов мутагенами, ультрафиолетовым и жестким гамма-излучением с селекционной целью используют давно. В работах [7–10] описывается, что максимальный мутагенный эффект от химических веществ достигается при



реached to that for the temperature of 23 °C (21.5 min). Both in control embryos and those subjected to other experimental effects the development rate did not differ from the mentioned for carp at given temperature ( $\tau_0 = 24$  min) [3]. When decreasing an absolute value  $\tau_0$  and total embryogenesis time the quantity  $\tau_0$  increased, that passed from fertilization to hatching (161 $\tau_0$  in the control and 177 $\tau_0$  in the experiment with 10% DMSO). Obviously when using these spermatozoa, the linearity of  $\tau_0$  changes in the range of spawning temperatures impaired, and the cleavage rate is determined or regulated by spermatozoa or some their components. Since an increase in the embryonic development rate begins to manifest even at the first cleavage stages, it is impossible to suppose, that this effect is caused by genetic apparatus of the spermatozoon itself (it triggers on the stage of late blastula, approximately in 6 hrs after fertilization). Therefore an increase in the development rate caused either direct DMSO effect due to a direct contact of diluted by CCM sperm with oocyte, although at semi-dry method of insemination this contact was almost absent (water diluted sperm in 100 times), or some component of spermatozoon, changed under DMSO effect and remaining in ooplasm of oocyte after male pronucleus formation. It is known, that in *in vitro* system cytoplasm fraction affects the transcription in isolated nuclei of rats hepatocytes [10, 11].

Carp sperm treatment by mutagens, ultraviolet and hard gamma-radiation with selectional aim has been used for a long time. The works [7–10] show, that maximum mutagenic effect from chemical substances is achieved at the effect only on mature spermatozoa. Dimethylsulphate is regarded by Tsoy R. M. as the most toxic mutagene, being the precursor of DMSO synthesis, which in trace quantities, probably is contained in used by us pharmacopeic dimexide.

Bibenko [1] reports on the effect of cryoprotective media, containing DMSO and EG in 10% concentrations on fish genome, an increased death rate of embryos in the period of initial phenotypical manifestation of genome function at early embryogenesis stages between late blastula and gastrula was revealed. However in these investigations genetical consequences of spermatozoa treatment by chemical substances are described, but no attention is paid to the changes of time



воздействии только на зрелые спермии. К наиболее токсичным мутагенам Цой Р. М. относит диметилсульфат, являющийся предшественником синтеза ДМСО, который в следовых количествах, возможно, содержится в использованном нами фармакопейном димексиде.

О влиянии криозащитных сред, содержащих ДМСО и ЭГ в 10%-х концентрациях на геном рыб, сообщает Бибенко О. В. [1], которая обнаружила повышенную смертность эмбрионов в период начального фенотипического проявления функции генома на ранних стадиях эмбриогенеза между поздней бластурой и гаструрой. Однако в этих исследованиях описываются генетические последствия обработки спермиев химическими веществами, но не обращается внимание на изменения временных отношений между морфологическими процессами у рыб. В работах [2, 3, 5] изучались временные отношения скорости развития, но при воздействии температуры. Обнаружить же данные, описывающие временные зависимости морфологических явлений в эмбриогенезе рыб при воздействии на спермии какими-либо веществами и в том числе криопротекторами, нам не удалось.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бибенко О. В. Влияние факторов криоконсервирования на генетический аппарат спермиев рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1993.— 24 с.
2. Детлаф Т. А., Детлаф А. А. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // Докл. АН СССР.— 1960.— 134, № 1.— С. 199–202.
3. Игнатъева Г. М. Ранний эмбриогенез рыб и амфибий (сравнительный анализ временных закономерностей развития).— М.: Наука, 1979.— С. 176.
4. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа.— М.: Изд-во ВНИПРХ, 1986.— С. 9.
5. Костомарова А. А., Игнатъева Г. М. Соотношение процессов карио- и цитотомии в период синхронных делений дробления у выюна (*Misgurnus fossilis* L.) // Докл. АН СССР.— 1968.— 183, № 2.— С. 490–492.
6. Цой Р. М., Голодов Ю. Ф. Эффективность химических мутагенов при воздействии на неоплодотворенную икру // Биологические основы рыбного хозяйства водоемов Средней Азии и Казахстана.— Фрунзе, 1978.— С. 284–285.
7. Цой Р. М., Голодов Ю. Ф., Меньшова А. И. Влияние химических мутагенов на изменчивость морфологических и физиологических признаков у карпа // Биохимическая генетика рыб.— Л., 1973.— С. 97–103.
8. Цой Р. М., Меньшова А. И., Голодов Ю. Ф. Частота спонтанных и индуцированных мутаций генов чешуи у карпа // Генетика.— 1974.— 10, № 11.— С. 60–62.
9. Цой Р. М., Меньшова А. И., Голодов Ю. Ф. Специфичность химических мутагенов при воздействии на спермии карпа // Генетика.— 1974.— 10, № 2.— С. 18–22.
10. Черепанов В. В. Действие гомо- и гетерологичных цитозолей на синтез РНК в изолированных ядрах гепатоцитов крыс // Физиология и биохимия онтогенеза.— Киев: Наук. думка, 1983.— С. 160.
11. Черепанов В. В., Калиман П. А. Возрастные особенности активности и цитоплазматической регуляции ядерных РНК-полимераз в печени крыс // Системы биосинтеза белка и механизмы регуляции функций в онтогенезе.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 178.
1. Bibenko O. V. The effect of cryopreservation factors on a fish spermatozoa genetic apparatus: Author's thesis abstract of Phd (biology).— Kharkov, 1993.— 24 p.
2. Detlaf T. A., Detlaf A. A. About nondimensional characteristics of the development duration in embryology // Rep. of the Academy of Sciences of the UUSR.— 1960.— 134, № 1.— P. 199–202.
3. Ignatyeva G. M. Fish and amphibian early embryogenesis (a comparative analysis of the development time regularities).— M.: Nauka, 1979.— P. 176.
4. Kopeika E. F. Instruction on low temperature preservation of carp spermatozoa.— M.: VNIPRH Publ., 1986.— C. 9
5. Kostomarova A. A., Ignatyeva G. M. The ratio of cario- and cytotomy processes in the period of synchronous cleavage divisions in loach (*Misgurnus fossilis* L.) // Rep. of the Academy of Sciences of the USSR.— 1968.— 183, № 2.— P. 490–492.
6. Tsoy R. M., Golodov Yu. F. The efficiency of chemical mutagenes during the effect on the fertilized larvae // Biological bases of fishery farm in pools of Asia and Kazakhstan.— Frunze, 1978.— P. 284–285.
7. Tsoy R. M., Golodov Yu. F., Men'shov A. I. The effect of chemical mutagenes on the changeability of morphological and physiological signs in carp // Fish biochemical genetics.— L., 1973.— P. 97–103.
8. Tsoy R. M., Men'shova A. I., Golodov Yu. F. The frequency of spontaneous and induced scales gene mutations in carp // Genetika.— 1974.— 10, № 11.— P. 60–62.
9. Tsoy R. M., Men'shova A. I., Golodov Yu. F. Specificity of chemical mutagenes during the effect on carp spermatozoa // Genetika.— 1974.— 10, № 2.— P. 18–22.
10. Cherepanov V. V. The effect of homo- and heterologous cytosoles on RNA synthesis in rats' hepatocytes isolated nuclei of rat's hepatocytes // Ontogenesis physiology and biochemistry.— Kiev: Nauk. dumka, 1983.— P. 160.
11. Cherepanov V. V., Kaliman P. A. Age peculiarities of nuclear RNA-polymerase activity and cytoplasmatic regulation in rat liver // Systems of protein biosynthesis and function regulation mechanisms in ontogenesis.— Kiev.: Nauk. dumka, 1985.— P. 178.

Accepted in 01.03.99

Поступила 01.03.99



# Влияние физико-химических факторов, реализуемых на этапах криоконсервирования, на морфофункциональные свойства культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25А

А. А. ЦУЦАЕВА, А. Е. АНАНЬИНА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Physical and Chemical Factors, Realized at the Cryopreservation Stages, to Morphofunctional Properties of *Streptomyces fradiae* VNIIG-25A 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 устойчивости культуры *Str. fradiae* ВНИИГ-25А — продуцента антибиотика тилозина — к воздействию физико-химических факторов, реализуемых на этапах криоконсервирования. Показано снижение криоустойчивости клеток после воздействия холодового шока, зависимость их сохранности от времени экспонирования, изменения значений *pH* суспензионной среды и концентрации хлорида натрия. Установлено, что указанные физико-химические факторы оказывали повреждающее действие на спорую и в большей степени на вегетативную формы культуры *Str. fradiae* ВНИИГ-25А.

Проведено дослідження щодо вивчення стійкості культури *Str. fradiae* ВНДІГ-25А — продуцента антибіотика тилозину — до впливу фізико-хімічних факторів, які реалізуються на етапах криоконсервування. Показано зниження криостійкості клітин після впливу холодового шоку, залежність їх цілості від часу експонування, зміни значень *pH* суспензійного середовища і концентрації хлориду натрію. Установлено, що вказані фізико-хімічні фактори діють пошкоджуюче на спорову і в більший мірі на вегетативну форми культури *Str. fradiae* ВНДІГ-25А.

The investigations on studying the *Str. fradiae* VNIIG-25A culture — tylozine antibiotic producent — resistance to the effect of physical and chemical factors, realized at the cryopreservation stages were carried out. A decrease in cell cryoresistance after a cold shock effect, their integrity dependence on an exposure time, on the change in *pH* values of a suspension medium and sodium chloride concentration have been shown. It has been established that the mentioned physical and chemical factors caused a damaging effect on a spore form and in a greater extent on vegetative one of the *Str. fradiae* VNIIG-25A culture.

Большинство исследователей отмечает, что в процессе охлаждения-отогрева повреждающим действием на биологические объекты обладают холодовой шок, гиперконцентрированные растворы NaCl, изменение *pH* растворов [1, 4].

Цель исследования — изучение влияния холодового шока, изменения *pH* среды консервирования и гиперконцентрации солей натрия на спорую и вегетативную формы культуры *Str. fradiae*, которые выращивали на твердых и жидких питательных регламентных средах с использованием кукурузного экстракта, соевой муки, мелассы и картофельного крахмала, приготовленных на водопроводной воде [3].

Спорую форму культуры *Str. fradiae* выращивали на твердой питательной среде при 28 °C в течение 10 сут, вегетативную — на жидкой питательной среде на качалках со скоростью вращения 260 об/мин в термостатированной комнате при 28 °C в течение 48 ч.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли по числу сформировавшихся макроко-

The majority of investigators note, that a cold shock, NaCl hyperconcentrated solutions, a change in *pH* solutions possess a damaging effect on biological objects in the freeze-thawing process [1, 4].

The investigation aim was to study the effect of a cold shock, change in *pH* of culturing medium and sodium salts hyperconcentration on a spore and vegetative forms of the *fradiae* culture, that were cultivated in nutrient known media using a maize extraction, soya meal, melassa and potato starch, prepared using a tap water [3].

A spore form of the *Str. fradiae* culture was cultivated in a solid nutrient medium at 28 °C within 10 days, a vegetative one — in a liquid nutrient medium in shakers with 260 rot/min rotation rate in a thermostated room at 28 °C within 48 hours.

The quantity of colony-forming units (CFU) was determined by a number of formed macrocolonies in a solid nutrient regulated medium within 10 days at the temperature of 28 °C [3].

*Str. fradiae* culture antibiotic activity before and after cryopreservation was detected by means of a



лоний на твердой питательной регламентной среде в течение 10 сут при температуре 28 °C [3].

Антибиотическую активность культуры *Str. fradiae* до и после криоконсервирования определяли диффузионным методом с применением лунок в толще агаровой питательной среды. В качестве тест-культуры использовали *Bac. subtilis*, штамм 720 [3].

Криоконсервирование культуры *Str. fradiae* проводили в металлических контейнерах емкостью 1 мл. Для криоконсервирования использовали споровую форму, смывтую с агаризованной среды с концентрацией спор  $1 \cdot 10^8$  в 1 мл, и двухсуточную вегетативную форму культуры в ростовой питательной регламентной среде с титром вегетативных клеток  $1 \cdot 10^8$  в 1 мл. Образцы охлаждали на программном замораживателе УОП-6 производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины со скоростями охлаждения 1, 10, 400 °C/мин до -70 °C, после чего образцы погружали в жидкий азот (-196 °C).

Для изучения чувствительности культуры *Str. fradiae* к холодовому шоку 0,1 мл суспензии спор и вегетативных клеток, нагретых до 28 °C, быстро вносили в 9,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0 °C, к гипертоническому шоку — такое же количество клеточной суспензии вносили в растворы NaCl объемом 9,9 мл с концентрацией 0,5; 1; 2; 3 моль/л, в обоих случаях растворы перемешивали и сразу отбирали пробы для последующего посева на твердую питательную среду.

При изучении влияния гиперконцентрированных растворов NaCl на споровую и вегетативную формы культуры *Str. fradiae* клеточные суспензии в объеме 0,1 мл вносили в гипертонические растворы хлорида натрия и выдерживали в течение 30 мин при нормотермии с последующим отбором проб и посевом на твердую питательную среду.

Для изучения влияния изменения pH среды консервирования на сохранность свойств споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* использовали растворы дистиллированной воды со значениями pH от 2,0 до 12,0. В 9,9 мл раствора вносили по 0,1 мл взвеси спор или вегетативных клеток. Отбор проб производили через 3 и 30 мин экспозиции.

Морфологию клеток изучали в световом микроскопе на окрашенных метиленовым синим препаратах (увеличение объектива  $\times 90$ , окуляра  $\times 10$ ). Культуральные свойства определяли по характеру роста культуры на твердых и жидких регламентных питательных средах. Статистическую обработку полученных данных производили по критериям Стьюдента–Фишера [4] при уровне значимости 0,95.

На основании проведенных исследований установлено, что оптимальными скоростями охлаждения для споровой формы культуры *Str. fradiae* оказались 1 и 400 °C/мин. При замораживании вегетативной формы максимальное количество КОЕ было в суспензиях, замороженных со скоростью охлаждения 10 °C/мин (табл. 1).

diffusive method using the holes in the agar nutrient medium width. *Bac. subtilis*, 720 strain was used as a test-culture [3].

*Str. fradiae* culture cryopreservation was performed in 1 ml volume metal containers. A spore form, washed-out from an agarized medium with  $1 \cdot 10^8$  spore concentration in 1 ml and a two-days vegetative form of the culture in a growth nutrient regulated medium with the vegetative cell titer of  $1 \cdot 10^8$  in 1 ml were used for the cryopreservation. The samples were cooled using the UOP-6 programmable freezer, produced by Special Designing Technical Bureau with the Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine with the cooling rates of 1; 10; 400 °C/min down to -70 °C, after that the samples were immersed into a liquid nitrogen (-196 °C).

In order to investigate the *Str. fradiae* culture sensitivity to a cold shock 0.1 ml of spore and vegetative cell suspension, warmed up to 28 °C were quickly introduced into 9 ml of a distilled water, cooled down to 0 °C, to a hypertonic shock the same suspensions were introduced into NaCl solutions of 9.9 ml volume with 0.5; 1; 2; 3 mol/l concentration, in the both cases the solutions were mixed and the samples for the following inoculation into a solid nutrient medium were selected.

When investigating NaCl hyperconcentrated solutions effect on spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture, suspensions of spores and vegetative cells with 0.1 ml volume were introduced into sodium chloride hypertonic solutions and maintained within 30 min at normospermia with following selection of samples and the inoculation into a solid nutrient medium.

To study the effect of cryopreservation medium pH change on properties integrity of spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture distilled water solutions with pH values from 2.0 to 12.0 were used. Spore or vegetative cell suspension by 0.1 ml were introduced into 9.9 ml of solution. The samples selection was accomplished in 3 and 30 min of exposure.

Cell morphology was studied by a light microscope in stained with methylene blue preparations (a  $\times 90$  lens magnification, a  $\times 10$  ocular magnification).

Cultural properties were determined according to the culture growth character in solid and liquid regulated nutrient medium. Statistical proceeding of the data obtained was performed according to the Student–Fisher [4] criteria at 0.95 significance level.

Basing on the investigations carried-out it has been established, that 1 and 400 °C/min were optimal cooling rates for a spore form of the *Str. fradiae* culture. When freezing its vegetative form, the CFU maximum number was in the suspensions, frozen using 10 °C/min cooling rate (Table 1).

Under a cold shock effect the CFU quantity of a spore form of the *Str. fradiae* culture decreased down to 89.7% in comparison with the control.



Количество КОЕ споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* после охлаждения с разными скоростями  
 CFU number of spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture after cooling with different rates

| Форма культуры<br>Culture form | Исходное количество КОЕ<br>в 1 мл ( $\cdot 10^8$ ) (контроль)<br>CFU initial number in 1 ml<br>( $\times 10^8$ ) (the control) | Количество КОЕ в 1 мл ( $\cdot 10^8$ ) после охлаждения со скоростями ( $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ )<br>CFU number in 1 ml ( $\times 10^8$ ) after cooling with rates ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) |       |                         |       |                         |       |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
|                                |                                                                                                                                | 1                                                                                                                                                                                                          |       | 10                      |       | 400                     |       |
|                                |                                                                                                                                | $\bar{x} \pm S \bar{x}$                                                                                                                                                                                    | %     | $\bar{x} \pm S \bar{x}$ | %     | $\bar{x} \pm S \bar{x}$ | %     |
| Споровая<br>Spore              | $4,7 \pm 0,12$                                                                                                                 | $5,62 \pm 0,2$                                                                                                                                                                                             | 119,6 | $4,27 \pm 0,13$         | 90,8  | $5,86 \pm 0,09$         | 124,6 |
|                                |                                                                                                                                | $p < 0,05$                                                                                                                                                                                                 |       | $p > 0,05$              |       | $p < 0,05$              |       |
| Вегетативная<br>Vegetative     | $3,75 \pm 0,13$                                                                                                                | $2,38 \pm 0,09$                                                                                                                                                                                            | 63,5  | $3,96 \pm 0,32$         | 105,6 | $3,38 \pm 0,09$         | 90,2  |
|                                |                                                                                                                                | $p < 0,05$                                                                                                                                                                                                 |       | $p > 0,05$              |       | $p = 0,05$              |       |

Примечания:  $\bar{x}$  — среднее значение;  $\pm S \bar{x}$  — среднее квадратичное отклонение;  $p$  — уровень доверительной вероятности между средними значениями в контроле и после криоконсервирования.

Notes:  $\bar{x}$  — mean;  $\pm S \bar{x}$  — mean square deviation;  $p$  — confidential probability level between the means in the control and after cryopreservation.

Под влиянием холодового шока количество КОЕ споровой формы культуры *Str. fradiae* снижалось до 89,7% по сравнению с контролем.

После воздействия холодового шока на споровые клетки отмечалось достоверное снижение количества жизнеспособных клеток в суспензии после криоконсервирования (рис. 1).

Наиболее выраженное снижение количества КОЕ в споровых суспензиях, подвергавшихся холодовому шоку до криоконсервирования, отмечалось после замораживания со скоростями охлаждения 1 и 10  $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Холодовой шок также оказывал губительное действие на клетки вегетативной формы культуры *Str. fradiae*: снижалось количество ее КОЕ и составляло 84,9% от контроля. После замораживания вегетативных клеток, предварительно подвергавшихся воздействию холодового шока, отмечалось снижение количества КОЕ по сравнению с количеством жизнеспособных клеток нативной формы культуры *Str. fradiae*, особенно после охлаждения со скоростями 1 и 400  $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . После воздействия холодового шока достоверно

After a cold shock effect on spore cells a statistically significant decrease in viable cell number in suspension after cryopreservation was observed (Fig. 1).

The most manifested reduction of the CFU number in spore suspensions, subjected to a cold shock before cryopreservation was observed after freezing with 1 and 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  cooling rates. Cold shock caused a ruinous effect to the cells of a vegetative form of the *Str. fradiae* culture too: its CFU number decreased and made 84.9% of the control. After the freezing of vegetative cells, preliminarily subjected to a cold shock effect the reduction of the CFU quantity in comparison with the number of viable cells of *Str. fradiae* culture native form was noted, especially after cooling with the rates of 1 and 400  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . After a cold shock effect the cell specific activity of both spore and vegetative form of the *Str. fradiae* culture statically and significantly decreased (Table 2).

Table 2

Specific activity of native and cryopreserved spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture before and after a cold shock effect

| Experiment conditions |                                             | Specific activity, unit/ml |                           |
|-----------------------|---------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Culture form          | Cooling rate, $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ | After freezing             | Freezing after cold shock |
| Spore                 | Control                                     | $9\,300 \pm 84$            |                           |
|                       | Cold shock                                  |                            | $8\,138 \pm 100^*$        |
|                       | 1                                           | $8\,723 \pm 80^*$          | $5\,404 \pm 85^*$         |
|                       | 10                                          | $7\,589 \pm 70^*$          | $5\,721 \pm 70^*$         |
|                       | 400                                         | $8\,761 \pm 100^*$         | $6\,917 \pm 100^*$        |
| Vegetative            | Control                                     | $7\,865 \pm 72$            |                           |
|                       | Cold shock                                  |                            | $6\,308 \pm 50^*$         |
|                       | 1                                           | $4\,735 \pm 45^*$          | $2\,725 \pm 90^*$         |
|                       | 10                                          | $7\,543 \pm 80^*$          | $5\,015 \pm 100^*$        |
|                       | 400                                         | $6\,056 \pm 20^*$          | $4\,050 \pm 75^*$         |

Notes: \* — significance of differences in comparison with the control,  $p < 0.05$ .

Specific activity of cryopreserved native spore suspension maximally decreased after freezing with the rate of 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . After preliminary cold shock effect on spore suspension a maximum specific activity during freezing with the rate of 400  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  was observed. High antibiotic activity was found in native samples

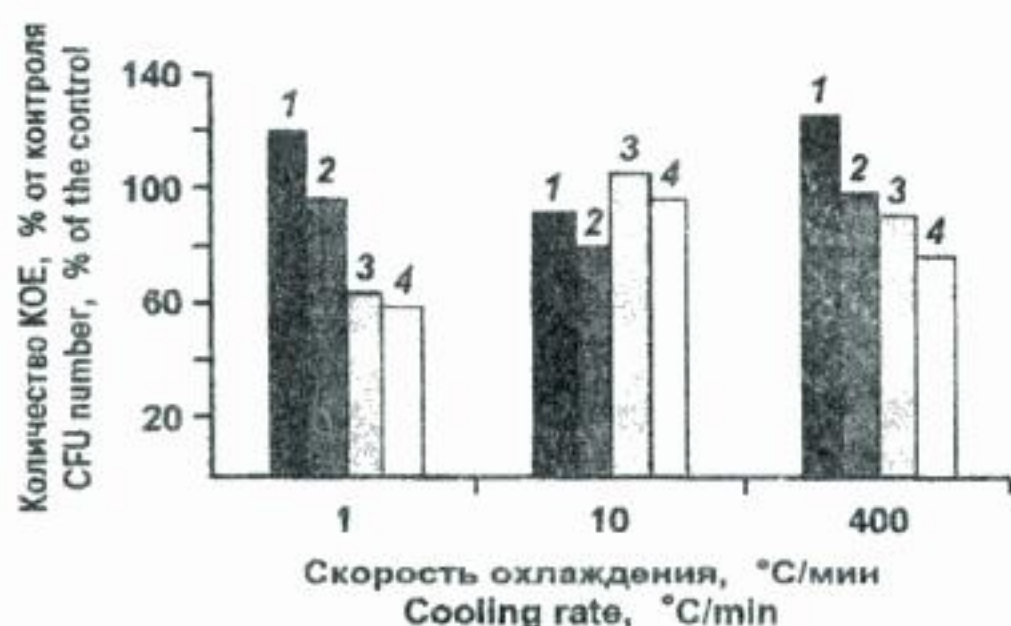


Рис. 1. Количество КОЕ споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae*, криоконсервированной с различными скоростями охлаждения: 1 — нативной споровой культуры; 2 — споровой культуры после холодового шока; 3 — нативной вегетативной культуры; 4 — вегетативной культуры после холодового шока.

Fig. 1. CFU number of spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture cryopreserved with different cooling rates: 1 — native spore culture; 2 — spore culture after a cold shock; 3 — native vegetative culture; 4 — vegetative culture after a cold shock.



снижалась специфическая активность клеток как споровой, так и вегетативной формы культуры *Str. fradiae* (табл. 2).

Таблица 2

Специфическая активность нативной и криоконсервированной споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* до и после воздействия холодного шока

| Условия эксперимента |                             | Специфическая активность, ед./мл |                                    |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Форма культуры       | Скорость охлаждения, °C/мин | После замораживания              | Замораживание после холодного шока |
| Споровая             | Контроль                    | 9 300 ± 84                       | 8 138 ± 100*                       |
|                      | Холодовой шок               |                                  |                                    |
|                      | 1                           | 8 723 ± 80*                      | 5 404 ± 85*                        |
|                      | 10                          | 7 589 ± 70*                      | 5 721 ± 70*                        |
| Вегетативная         | 400                         | 8 761 ± 100*                     | 6 917 ± 100*                       |
|                      | Контроль                    | 7 865 ± 72                       | 6 308 ± 50*                        |
|                      | Холодовой шок               |                                  |                                    |
|                      | 1                           | 4 735 ± 45*                      | 2 725 ± 90*                        |
|                      | 10                          | 7 543 ± 80*                      | 5 015 ± 100*                       |
|                      | 400                         | 6 056 ± 20*                      | 4 050 ± 75*                        |

Примечание. \* — достоверность различий по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Специфическая активность криоконсервированной нативной споровой суспензии максимально снижалась после замораживания со скоростью 10 °C/мин. После предварительного воздействия холодного шока на споровую суспензию отмечалась максимальная специфическая активность при замораживании со скоростью 400 °C/мин. Высокая антибиотическая активность наблюдалась в нативных образцах вегетативной формы культуры *Str. fradiae*, замороженных со скоростью 10 °C/мин, и достоверно снижалась при охлаждении со скоростями 1 и 400 °C/мин.

При замораживании суспензий вегетативных клеток, предварительно подвергавшихся холодному шоку, максимальная специфическая активность отмечалась в случае охлаждения образцов со скоростью 10 °C/мин. Криоконсервирование вегетативной формы культуры *Str. fradiae* со скоростями охлаждения 1 и 400 °C/мин после предварительного воздействия холодного шока приводило к снижению антибиотической активности. Показано, что как на вегетативную, так и на споровую форму культуры *Str. fradiae* гипертонические растворы хлорида натрия оказывали повреждающее действие. Взаимодействие споровой суспензии с солевыми растворами вызывало снижение количества КОЕ. Увеличение концентрации NaCl приводило к дальнейшему снижению количества жизнеспособных спор (рис. 2). Если концентрация NaCl достигала максимума и клетки споровой формы экспонировались в гипертонических растворах хлорида натрия в течение 30 мин, количество КОЕ было достоверно выше, чем в суспензии клосток, подвергавшихся шоковому воздействию в аналогичных условиях. При низких концентрациях NaCl возрастало количество КОЕ вегетативной формы при

of vegetative form of the *Str. fradiae* culture, frozen with the rate of 10 °C/min and statistically significant decreased during cooling with the rates of 1 and 400 °C/min.

When freezing vegetative cell suspensions, preliminarily subjected to a cold shock, a maximum specific activity was observed in the case of the samples cooling with the rate of 10 °C/min. *Str. fradiae* culture vegetative form cryopreservation with 1 and 400 °C/min cooling rates after cold shock preliminary effect resulted in antibiotic activity reduction. It has been shown, that sodium chloride hypertonic solutions caused a damaging effect on both vegetative and spore forms of *Str. fradiae* culture. Spore suspension interaction with saline solutions caused a decrease in the CFU number. Increase in NaCl concentration resulted in the following reduction of viable spore quantity (Fig. 2).

If NaCl concentration reached the maximum and the spore form cells were exposed in sodium chloride hypertonic solutions within 30 min, the CFU number was statistically and significantly higher, than in the cell suspension, subjected to a shock effect under the same conditions. Under NaCl low concentrations the CFU number of culture vegetative form increased during cell exposure in solutions within 30 min. Under hypertonic shock effect a number of viable vegetative cells reduced (Fig. 3). This effect in a considerable extent gained in strength with an increase in NaCl concentration. CFU number of the culture vegetative form, subjected to hypertonic shock at sodium chloride maximum concentration, was statistically and significantly lower, than in vegetative cell suspension, being exposed during 30 min.

Under conditions when *Str. fradiae* culture cells were subjected to the effect of hypertonic saline solutions, the CFU number of the culture spore form was statistically and significantly higher, than in the suspensions of vegetative form, especially under high NaCl concentrations.

It has been established, that in 6.0–8.0 pH values range, independently on the exposure duration, a

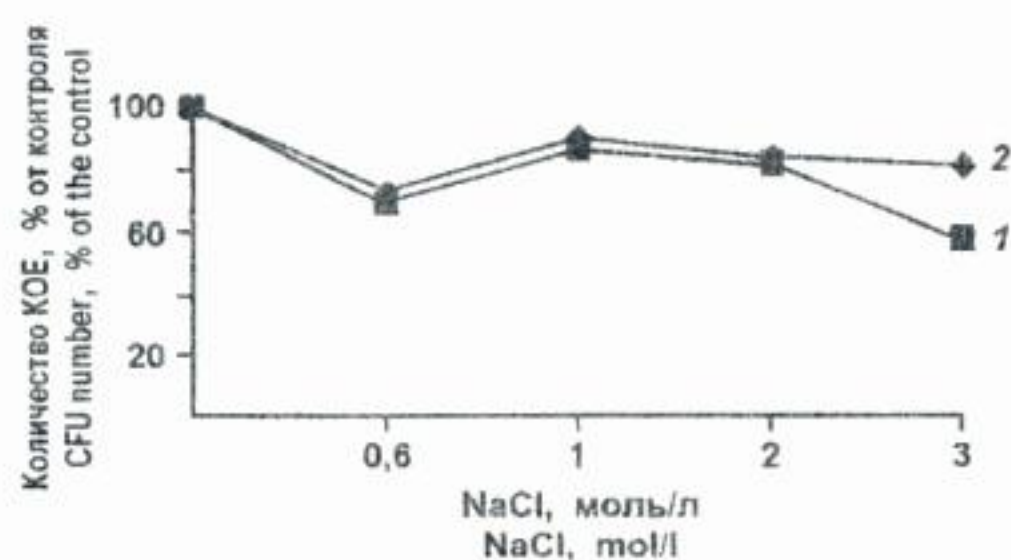


Рис. 2. Количество КОЕ спорной формы культуры *Str. fradiae* в растворах NaCl: 1 — экспозиция 30 мин; 2 — гипертонический шок.

Fig. 2. CFU number of *Str. fradiae* culture spore form in NaCl solutions: 1 — 30 min exposure; 2 — hypertonic shock.



экспонировании клеток в растворах в течение 30 мин. Под влиянием гипертонического шока количество жизнеспособных вегетативных клеток снижалось (рис. 3). Этот эффект в значительной степени усиливался с увеличением концентрации NaCl. Количество КОЕ вегетативной формы культуры, подвергавшейся гипертоническому шоку при максимальной концентрации хлорида натрия, было достоверно ниже, чем в суспензии вегетативных клеток, экспонированных в течение 30 мин.

В условиях, когда клетки культуры *Str. fradiae* подвергались воздействию гипертонических солевых растворов, количество КОЕ споровой формы культуры было достоверно выше, чем в суспензиях вегетативной формы, особенно при высоких концентрациях NaCl.

Установлено, что в интервале значений  $pH$  6,0–8,0, независимо от продолжительности экспозиции, количество жизнеспособных клеток как споровой, так и вегетативной формы культуры *Str. fradiae* не изменялось.

При изменении значений  $pH$  растворов в щелочную и кислую сторону наблюдалось достоверное снижение количества КОЕ споровой формы культуры. С увеличением времени экспозиции отрицательное влияние кислых и щелочных значений  $pH$  на жизнеспособность спор усиливалось (рис. 4).

Экспонирование вегетативных клеток в растворах с различными значениями  $pH$  приводило к достоверному снижению количества жизнеспособных клеток при увеличении щелочности и кислотности растворов (рис. 5).

Значительное снижение количества КОЕ вегетативной формы культуры отмечалось при увеличении времени экспонирования клеток в растворах. Споровая форма была более устойчива к действию кислотных и щелочных значений  $pH$  по сравнению с вегетативной.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальным режимом криоконсервирования споровой формы культуры *Str. fradiae* является

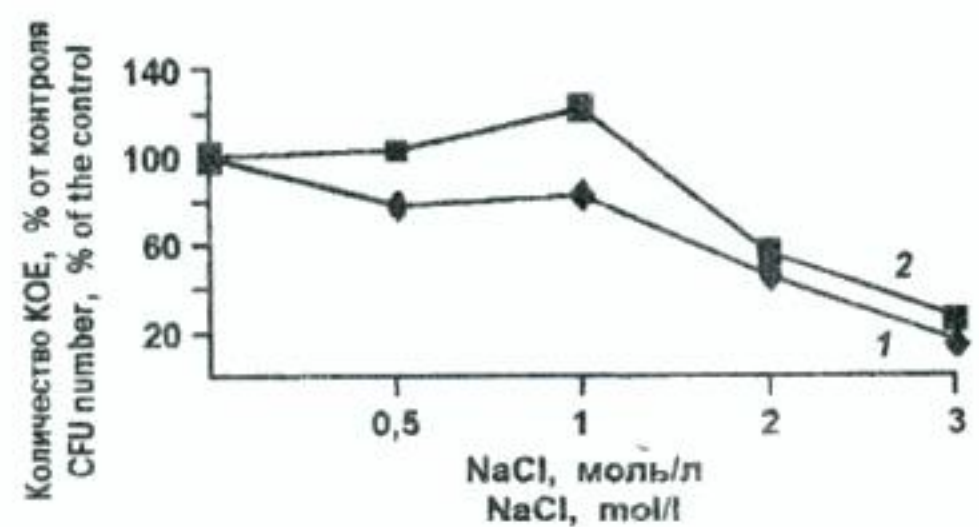


Рис. 3. Количество КОЕ вегетативной формы культуры *Str. fradiae* в растворах NaCl: 1 — гипертонический шок; 2 — экспозиция 30 мин.

Fig. 3. CFU number of *Str. fradiae* culture vegetative form after exposure in NaCl solutions: 1 — hypertonic shock; 2 — 30 min exposure.

number of viable cells both spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture did not change.

At the change of the solutions  $pH$  values into alkaline and acid side a statistically significant decrease in CFU number of the culture spore form was observed. When augmenting the exposure time, a negative effect of acid and alkaline  $pH$  values on spores viability gained in strength (Fig. 4).

Vegetative cell exposure in the solutions with different  $pH$  values resulted in a statistically significant decrease in a number of viable cells during the increase in alkalinity and acidity of the solutions (Fig. 5).

A significant reduction of CFU number of the culture vegetative form was noted during augmentation of the exposure time in the solutions. The culture spore form was more resistant to the effect of acid alkaline  $pH$  values in comparison with a vegetative one.

The results obtained testify to the fact, that 400 °C/min cooling rate is an optimal cryopreservation regimen for *Str. fradiae* culture spore form, and 10 °C/min — for a vegetative one.

The values shown of optimal cooling rates testify to the fact, that one of the leading damaging factors for spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture is a cold shock. During a slowly cooling a decrease in its effect on cells is reached by an increase in time, during which the temperature reduces and a gradual,

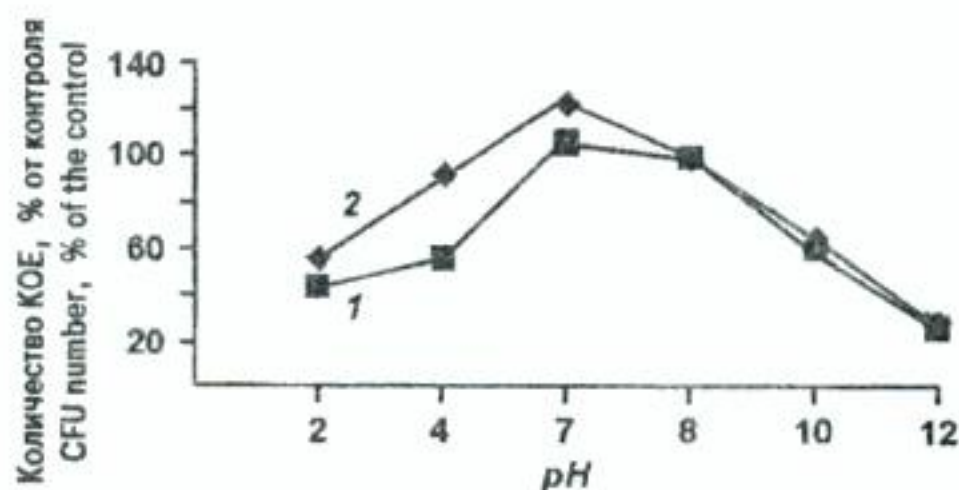


Рис. 4. Количество КОЕ споровой формы культуры *Str. fradiae* в растворах с различными значениями  $pH$ : 1 — экспозиция 30 мин; 2 — экспозиция 3 мин.

Fig. 4. CFU number of *Str. fradiae* culture spore form in the solutions with different  $pH$  values: 1 — 30 min exposure; 2 — 3 min exposure.

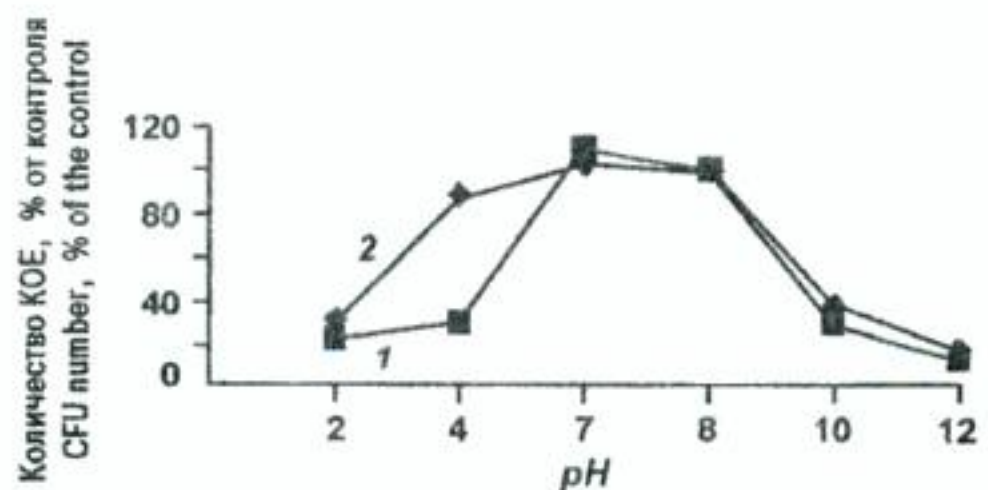


Рис. 5. Количество КОЕ вегетативной формы культуры *Str. fradiae* в растворах с различными значениями  $pH$ : 1 — экспозиция 30 мин; 2 — экспозиция 3 мин.

Fig. 5. CFU number of *Str. fradiae* culture vegetative form in the solutions with different  $pH$  values: 1 — 30 min exposure; 2 — 3 min exposure.



скорость охлаждения 400 °C/мин, а вегетативной — 10 °C/мин.

Приведенные значения оптимальных скоростей охлаждения свидетельствуют о том, что одним из ведущих повреждающих факторов для споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* является холодовый шок. При медленном охлаждении снижение его воздействия на клетки достигается увеличением времени, в течение которого снижается температура и происходит постепенное, менее травматическое для клеток, изменение физико-химических свойств мембран и метаболизма.

При скорости охлаждения 400 °C/мин снижение отрицательного воздействия холодового шока достигается сокращением времени воздействия низких температур до точки кристаллизации [5, 7, 8].

Высказанное положение подтверждают результаты, полученные при изучении характера воздействия холодового шока на споровую и вегетативную формы культуры *Str. fradiae*. При этом, помимо гибели части споровых и вегетативных клеток под воздействием холодового шока, снижалась их устойчивость к замораживанию, что является доказательством отрицательного влияния этого фактора на клетки в процессе криоконсервирования и объективной необходимостью снижения его воздействия.

Вторым ведущим повреждающим фактором для споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* является изменение концентрации NaCl. Интенсивность отрицательного влияния гиперконцентрированных растворов NaCl зависела от продолжительности воздействия и концентрации его в растворах [2, 5, 6]. Отрицательный эффект воздействия концентрационных градиентов был менее выражен при медленном увеличении концентрации солей. Поскольку нарастание концентрации NaCl происходит на этапах кристаллизации, снизить интенсивность влияния концентрационных градиентов можно уменьшением скорости охлаждения, что сопровождается медленным формированием кристаллов льда. В результате этого медленно нарастает концентрация солей, что позволяет оптимизировать процессы обезвоживания клеток и предохранять их от повреждения. С помощью быстрых скоростей охлаждения удастся, несмотря на реальное влияние концентрационных градиентов, снизить их отрицательное воздействие благодаря быстрому снижению температуры окружающей среды, когда уменьшается скорость замерзания воды, возрастает ее вязкость и изменяются физико-химические свойства, клетки становятся более устойчивыми к воздействию гиперконцентрированных растворов солей. Низкие концентрации солей образуются только на этапе отогрева и воздействуют на клетки очень быстро, так как в процессе таяния льда раствор моментально перемещается [5, 7, 8].

less traumatic for cell, change in physical and chemical properties of membranes and metabolism occurs.

At 400 °C/min cooling rate a decrease in a negative effect of a cold shock is reached by the time reduction of low temperature effect till the crystallization point [5, 7, 8].

The results obtained when studying the character of cold shock effect on spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture confirm the postulate mentioned. Thereat, along with the decay of a part of spore and vegetative cells under a cold shock effect, there was a decrease in their resistance to freezing, that proved this factor negative effect on the cells during cryopreservation process and an objective necessity of its effect decrease.

The change in NaCl concentration is the second leading damaging factor for spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture. The intensity of a negative effect of NaCl hyperconcentrated solutions depended on the effect duration and its concentration in solutions [2, 5, 7]. A negative effect of concentrated gradient influence was a less manifested at a slow increase in a salt concentration. Since the growth of NaCl concentration occurs at the stages of crystallization, it is possible to reduce the intensity of concentrated gradient effect by a decrease in a cooling rate, that is accompanied by an ice crystal slow formation. As the results of this fact the salt concentration slowly increases, that permits to optimize the processes of cell dehydration and to preserve them from a damage. Using the cooling rapid rates one manages, inspite of a real influence of concentrated gradients, to reduce their negative effect due to the environmental temperature rapid decrease, when the rate of water freezing reduces, its viscosity increases and physical and chemical properties change, the cells become more resistant to the effect of salt hyperconcentrated solutions. Low salt concentrations are formed only at the thawing stage and affect cells very quickly due to a solution immediate mixing during the process of ice melting [5, 7, 8].

The investigations results testify to the fact, that the change in hydrogen ion concentration is not the leading damaging factor for spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* VNIIG-25A culture.

The results obtained are an experimental substantiation of cooling optimal regimens for spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture, using which a negative effect of leading damaging factors on the cells decreases. Different sensitivity to cooling rates of spore and vegetative forms of the *Str. fradiae* culture is stipulated by a low water content in streptomycetes spores, by differences in their structural state, by the metabolism inhibition and peculiarities of spore membrane structure [9].

Thus, the determination of cell sensitivity to leading factors of cryodamages under normothermia conditions gives the possibility to select groundly the cooling regimens, permitting to maximally reduce



Результаты исследований свидетельствуют о том, что изменение концентрации водородных ионов не является ведущим повреждающим фактором для споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* ВНИИГ-25А.

Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием оптимальных режимов охлаждения для споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae*, с помощью которых снижается отрицательное влияние на клетки ведущих повреждающих факторов. Различная чувствительность к скоростям охлаждения споровой и вегетативной форм культуры *Str. fradiae* обусловлена низким содержанием воды в спорах стрептомицетов, различиями в их структурном состоянии, ингибировании метаболизма и особенностями строения споровых оболочек [9].

Таким образом, установление в условиях нормотермии чувствительности клеток к ведущим факторам криоповреждений дает возможность обоснованно выбрать режимы охлаждения, позволяющие максимально снизить их отрицательное влияние на биологические системы в процессе криоконсервирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н. С. Пушкар, А. М. Белоуса. — Киев: Наук. думка, 1991. — 608 с.
4. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высш. шк., 1986. — 476 с.
2. Пушкар Н. С. Физико-химические основы метода низкотемпературной консервации биологических объектов // Механизмы криоповреждений и криопротекции биологических структур. — Киев: Наук. думка, 1976. — С. 5–8.
5. Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Цуцаевой. — Киев: Наук. думка, 1991. — 176 с.
6. Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing // Cryobiology. — New York: Acad. Press, 1966. — P. 214–315.
7. Gilbert P., Dikenson N. A., Brown M. P. W. Interrelation of DNA replication, specific growth rate and growth temperature in the sensitivity of *Escherichia coli* to cold shock // Gen. Microbiol. — 1979. — 115, № 1. — P. 89–94.
8. Green I. A. The effect of nutrient limitation and growth rate in the chemostat on the sensitivity of *Vibrio cholerae* to cold shock // TEMS — Microbiol. Lett. — 1982. — 4, № 4. — P. 217–219.
9. Heckly R. I. Preservation of microorganism // Adv. Appl. Microbiol. — 24. — New York: Acad. Press., 1978. — P. 1–53.

Поступила 23.03.99

their negative effect on biological systems during cryopreservation process.

## REFERENCES

1. Current problems of cryobiology / Ed. by N. S. Pushkar, A. M. Belous. — Kiev: Nauk. dumka, 1991. — 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. Egorov N.S. Grounds of the notion on antibiotics. — M.: Vysshaya shkola, 1986. — 476 p.
4. Pushkar N.S. Physical and chemical grounds of biological object low temperature preservation // Mechanisms of cryodamages and cryoprotection of biological structures. — Kiev: Nauk. dumka, 1976. — P. 5–8.
5. Cold stress and biological systems / Ed. by A. A. Tsutsayeva. — Kiev: Nauk. dumka, 1991. — 176 p.
6. Mazur P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing // Cryobiology. — New York: Acad. Press, 1966. — P. 214–315.
7. Gilbert P., Dikenson N. A., Brown M. P. W. Interrelation of DNA replication, specific growth rate and growth temperature in the sensitivity of *Escherichia coli* to cold shock // Gen. Microbiol. — 1979. — 115, № 1. — P. 89–94.
8. Green I.A. The effect of nutrient limitation and growth rate in the chemostat on the sensitivity of *Vibrio cholerae* to cold shock // TEMS — Microbiol. Lett. — 1982. — 4, № 4. — P. 217–219.
9. Heckly R.I. Preservation of microorganism // Adv. Appl. Microbiol. — 24. — New York: Acad. Press., 1978. — P. 1–53.

Accepted in 23.03.99



## **Криоэкстракт хориона — восстановитель биохимических процессов при экспериментальном воспалительном процессе у крыс**

В. А. ПИТЬКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

## **Chorion Cryoextraction is the Recovering Agent of Biochemical Processes During an Experimental Inflammatory Process in Rats**

V. A. PITKO

*Kharkov State Medical University*

Изучались биохимические показатели в плазме крови животных с экспериментальным воспалением. Введение криоэкстракта хориона позволяет снизить тяжесть протекания процесса и в более ранние сроки добиться нормализации функционирования метаболических систем в организме животных с экспериментальным воспалительным процессом.

Вивчалися біохімічні показники в плазмі крові тварин з експериментальним запаленням. Уведення кріоекстракту хоріона дозволяє зменшити тяжкість протікання процесу і в більш ранній строк досягти нормалізації функціонування метаболічних систем в організмі тварин з експериментальним запальним процесом.

Biochemical indices in plasma of animal blood with an experimental inflammatory process are studied. The chorion cryoextraction introduction allows to decrease the difficulty of process course and achieve the functioning normalization of metabolic systems in animals organism with an experimental inflammatory processes.

Поиск новых эффективных лекарственных соединений, обладающих биостимулирующим эффектом, — одна из задач современной фармакологии. Анализ научной литературы позволяет предположить, что фетальные тканевые препараты, полученные в результате аборт и родов (хорион, плацента), могут быть эффективными биогенными стимуляторами, восстанавливающими метаболизм тканей и клеток при ряде патологических процессов в организме [5, 6]. Существенное значение имеет изучение тканевых фетальных криоэкстрактов как основа разработки надежных методов сохранения биологических свойств тканей и использования низких температур в качестве фактора, который экстрагирует из них биологически активные соединения [7, 8].

Цель данной работы — исследование влияния криоэкстракта хориона (КХ), разработанного учеными ИПКиК НАН Украины, на биохимические процессы при лечении воспалительного процесса.

Опыты проведены на 66 крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г. Эксперименты осуществляли в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных". Всего было сформировано 3 экспериментальные группы животных: интактные, с экспериментальным воспалением, с вызванным экспериментальным воспалением и введением криоэкстракта хориона.

Моделью воспаления служил острый асептический перитонит, вызываемый внутрибрюшинным введе-

The search of new efficient medical compounds, possessing a biostimulating effect is one of the tasks of a modern pharmacology. The analysis of scientific literature allows to suppose, that fetal tissue preparations, obtained in the result of abortions and labors (chorion, placenta) may be efficient biogenic stimulators, recovering tissue and cell metabolism during the series of pathological processes in an organism [5, 6].

The study of tissue fetal cryoextractions as the base for elaboration of new reliable methods for preservation of tissue biological properties and the usage of low temperatures as the factor, extracting biologically active compounds [7,8] from them, has a great importance.

The aim of the work was to study the effect of chorion cryoextraction (CC) on biochemical processes during the treatment of experimental inflammatory process, elaborated by scientists of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine in 1997.

Experiments were conducted in 66 Wistar male rats with the mass of 200–220 g. Experiments were carried-out according to the "Rules for conducting the works with the usage of experimental animals". Three experimental groups of animals have been formed: intact; with an experimental inflammation; with caused experimental inflammation and injection of chorion cryoextraction.

An acute aseptic peritonitis, caused by means of intraperitoneal injection of 5 mg of  $\lambda$ -karaginen



нием 5 мг λ-карагинена ("Sigma", США), используемого в большинстве экспериментальных разработок данного направления как флогоген [9], в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия [1].

Для лечения воспалительного процесса криоэкстракт хориона [7] вводили внутримышечно в дозе 1 мл. Первое введение препаратов осуществляли сразу после моделирования воспаления, затем на 3-и и 7-е сутки. Животных забивали декапитацией на 6-й час, 1-е, 3-и, 7-е, 10-е сутки.

О состоянии процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по накоплению продуктов: промежуточных — дисновы конъюгаты (ДК) и конечных — малоновый диальдегид (МДА) [3, 4]. Исследовали общую лактатдегидрогеназную (ЛДГ) активность по унифицированному клиническому методу набора реактивов фирмы Labsystems (Финляндия), а также массу средних молекул [2].

Из таблицы видно, что при воспалительном процессе спустя 6 ч уровень МДА резко повышался (в 5,59 раз), через сутки он достигал своего пика, увеличиваясь в 8,4 раза по сравнению с исходными величинами. Через 72 ч уровень МДА несколько снижался, однако он был в 7,77 раза выше, чем в крови здоровых животных. На 7-й день наблюдений содержание МДА было все еще в 1,89 раза выше контрольного. Через 10 сут после моделирования воспалительного процесса уровень МДА нормализовался и практически не отличался от контрольных величин.

Введение криоэкстракта хориона на фоне воспалительного процесса позволяло снизить показатели МДА через 6 ч наблюдений в 2,83 раза. Это составляло 50,48% от величин, полученных при воспалительном процессе без применения КХ. Спустя 3-е суток уровень МДА был увеличен по сравнению с контрольными показателями в 4,8 раза, на 7-е сутки он составлял 68,2%, а спустя 10 сут — 77,8% от показателей, полученных при воспалительном процессе без применения КХ.

**Биохимические показатели в плазме крови крыс при экспериментальном воспалении (В) и лечении криоэкстрактом хориона (В + КХ), n = 6**

**Biochemical indices in rats' blood plasma during an experimental inflammation (I) and when treating by means of chorion cryoextraction product (I + CCP), n = 6**

| Время, ч<br>Time, hrs | МДА, ммоль/л<br>MDA, mMol/l |                   | ДК, ммоль/л<br>DC, mMol/l |                   | МММ, услед<br>AMM, cond.un |                   | ЛДГ, мккатал/л<br>LDG, μcatal/l |                   |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
|                       |                             |                   |                           |                   |                            |                   |                                 |                   |
|                       | В<br>I                      | В + КХ<br>I + CCP | В<br>I                    | В + КХ<br>I + CCP | В<br>I                     | В + КХ<br>I + CCP | В<br>I                          | В + КХ<br>I + CCP |
| 6                     | 11,53±0,61*                 | 5,82±0,29**       | 100,39±2,41*              | 85,21±1,72**      | 0,40±0,017*                | 0,26±0,019**      | 21,38±1,07*                     | 18,90±0,90*       |
| 24                    | 17,31±0,68*                 | 15,38±0,54*       | 130,42±3,14*              | 119,86±1,99**     | 0,38±0,021*                | 0,29±0,023**      | 26,31±1,14*                     | 20,87±0,96**      |
| 72                    | 16,01±0,43*                 | 9,89±0,33**       | 121,41±2,04*              | 99,27±1,68**      | 0,29±0,014*                | 0,19±0,012**      | 27,02±1,16*                     | 20,10±0,91**      |
| 168                   | 3,90±0,17*                  | 2,66±0,22**       | 37,20±0,91*               | 22,7±0,21**       | 0,17±0,011*                | 0,09±0,006**      | 13,98±0,49*                     | 9,50±0,32**       |
| 240                   | 2,48±0,11                   | 1,93±0,17**       | 22,31±0,31                | 21,91±0,19        | 0,11±0,009*                | 0,075±0,004**     | 11,66±0,38                      | 10,27±0,44**      |
| Контроль<br>Control   | 2,24±0,20                   |                   | 22,17±2,0                 |                   | 0,08±0,004                 |                   | 10,39±0,8                       |                   |

**Примечания:** \* — статистически достоверные различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* — статистически достоверные различия по сравнению с воспалением ( $p < 0,05$ ).

**Notes:** \* — statistically significant differences in comparison with the control ( $p < 0,05$ ); \*\* — statistically significant differences in comparison with an inflammation ( $p < 0,05$ ).

("Sigma", USA) in 1 ml of sodium chloride isotonic solution [1], used in the majority of experimental elaborations of the given direction as phlogogene [9], served as an inflammatory model.

When treating an inflammatory process, chorion cryoextraction [7] was intramuscularly injected in the dose of 1 ml. The first preparation injection was carried-out already after the inflammation modelling, and then — to the 3rd and 7th day. Animals were decapitated to the 6th hr, 1st, 3rd, 7th and 10th day.

About the state of lipid peroxidation processes (LPO) we concluded by the products accumulation: intermediate ones (diene conjugates (DC)) and final ones (malone aldehyde (MDA)) [3, 4]. The general lactate dehydrogenase activity (LDG), as well as an average molecule mass (AMM) we estimated by means of the uniform clinical method of reagents' set, produced by the Labsystems firm (Finland).

The presented table shows, that during an inflammatory process in 6 hrs the MDA level sharply increased (in 5.59 times), in a day it reached its peak, increasing in 8.4 times in comparison with the initial values. In 72 hrs the MDA level slightly decreased, but it was in 7.77 times higher, then in the blood of healthy animals. To the 7th day of observations the MDA content was still in 1.89 times higher then the control one. In 10 days after the inflammatory process modelling the MDA level was normalized and practically did not change from the control values.

The injection of chorion cryoextraction at the background of inflammatory process allowed to decrease the MDA indices in 2.83 times after the 6 hrs of observations. It made 50.48% of the values, obtained during an inflammatory process without the CC application. In 3 days the MDA level was increased in comparison with the control indices in 4.8 times.

By the 7th day it made 68.2%, and in 10 days it was 77.8% of the indices, obtained during an inflammatory process without the CC application.



Анализ приведенных данных позволяет сделать выводы, что лечение воспалительного процесса с использованием КХ эффективно. Об этом свидетельствуют более низкие показатели уровня МДА в динамике и более ранние сроки его нормализации.

Исследование функционирования начального звена ПОЛ свидетельствует, что содержание ДК при воспалительном процессе спустя 6 ч было увеличено в 4,7 раза по сравнению с показателями здоровых животных. Через сутки количество ДК увеличивалось в 1,3 раза по сравнению с наблюдением спустя 6 ч после развития воспаления. Через 3-е суток уровень ДК несколько снижался, однако абсолютные показатели были в 5,78 раза выше контрольных. Пик показаний приходился на 1-е сутки развития воспалительного процесса. На 7-е сутки показатели величин ДК значительно снижались, но все еще были увеличены по сравнению с контрольными (в 1,77 раза). Нормализация уровня ДК была зарегистрирована на 10-е сутки наблюдений.

Сравнивая показатели уровня МДА и ДК в динамике воспалительного процесса, следует отметить более выраженные изменения для показателей конечного продукта процессов ПОЛ.

Динамика изменения накопления первичных продуктов ПОЛ и содержания МДА свидетельствует о том, что при воспалительном процессе происходили активация свободнорадикального окисления липидов и развитие окислительного стресса.

Приведенная в таблице динамика показателей молекул средних масс (МСМ) в плазме крови животных с экспериментальным воспалительным процессом показывает, что спустя 6 ч после моделирования воспалительного процесса происходило значительное увеличение показателей МСМ. Пик показателей приходился на 6- и 24-й час наблюдений. В эти контролируемые промежутки времени показатели были увеличены соответственно в 5 и 4,8 раза по сравнению с показателями группы здоровых крыс.

Через 3-е суток наблюдений содержание МСМ в плазме крови животных с воспалительным процессом было на 24% ниже, чем в контролируемой временной точке (6 ч), но и в 2,13 раза выше, чем у здоровых животных. Спустя 10 сут наблюдений содержание МСМ составляло  $0,11 \pm 0,005$  усл. ед., что в 1,4 раза выше, чем у здоровых животных. Снижение показателей с момента начала контроля до последней контролируемой точки составляло 72%.

При лечении воспалительного процесса КХ отмечено, что через 6 ч уровень МСМ был увеличен в 3,25 раза. В конечной точке наблюдений (10 сут) показатели МСМ не отличались от контрольных величин (группа здоровых животных).

Динамика активности цитоплазматического фермента ЛДГ (таблица) показывает, что уже спустя 6 ч наблюдений после моделирования воспалительного процесса активность фермента увеличивалась в 2,3 раза, через сутки она была еще выше

The analysis of the presented data allows to conclude, that an inflammatory process treatment with the CC usage is efficient. Lower indices of the MDA level in dynamics and earlier terms of its normalization testify to this fact.

The investigation of functioning of the initial link of the POL process testifies, that DC content during an inflammatory process in 6 hrs was increased in 4.7 times in comparison with the indices of healthy animals. In a day DC increased in 1.3 times in comparison with the observation in 6 hrs after the inflammation development. In 3 days the DC level slightly decreased, but absolute indices were in 5.78 times higher than the control ones. Indices peak was to the 1st day of the inflammatory process development. To the 7th day the indices of the DC values considerable reduced, but were still increased in comparison with the control ones (by 1.77). The DC level normalization was registered to the 10th day of observations.

When comparing the MDA and DC level in the dynamics of inflammatory process, it should be noted, that more manifested changes were observed for the final product indices of LPO processes.

The dynamics of the changes in the accumulation of LPO initial products and MDA content testifies, that during an inflammatory process the activation of lipid free radical oxidation and development of an oxidative stress occurred.

The dynamics of the indices of average mass molecules (AMM) in animals' blood plasma with an experimental inflammatory process, given in the table, shows, that in 6 hrs after the inflammatory process modelling a considerable increase of the AMM indices occurred. The indices peak was to the 6th and 24th observation hrs. In these controlled time intervals the indices were increased in 5 and 4.8 times correspondingly in comparison with the indices of healthy rat's group.

In 3 observation days the AMM level in animals blood plasma with an inflammatory process was by 24% lower, then in the controlled time point – 6 hrs, but in 2.13 times higher, than in healthy animals. After 10 observation days the AMM content made  $0.11 \pm 0.005$  relative units, that in 1.4 times higher, then in healthy animals. Indices decrease from the moment of control beginning up to the last controlled point made 72%.

When treating an inflammatory process by means of CC it was revealed, that in 6 hrs the AMM level was increased in 3.25 times. In the final observation point (10 days) the AMM indices not differed from the control values (healthy animals' group).

The dynamics of the LDG cytoplasmatic enzyme (Table) activity shows, that already in 6 observation hrs after the inflammatory process modelling, enzyme activity increased in 2.3 times, in a day it was higher (in 2.76 times in comparison with the control). Indices peak was recorded to the 3rd observation day (28.4% of the control indices). In a week the LDG



(в 2,76 раза по сравнению с контролем). Пик показателей зарегистрирован на 3-и сутки наблюдений (28,4% от контрольных показателей). Спустя неделю активность ЛДГ значительно снижалась, хотя все еще была увеличена в 1,5 раза по сравнению с активностью группы здоровых животных, на 10-е сутки наблюдений она была увеличена в 1,2 раза.

Следует подчеркнуть, что в случаях контролирования при воспалительном процессе начального и конечного звеньев процесса ПОЛ, а также МСМ пик изменений отмечался в первые сутки наблюдений, а максимальная активность ЛДГ — на 3-и сутки.

При использовании в группе крыс с воспалительным процессом КХ отмечено, что через 6 сут активность ЛДГ была увеличена в 2 раза по сравнению с активностью здоровых животных. Через сутки показатели активности ЛДГ составляли 74,4% от показателей в группе с вызванным воспалением. Снижение активности фермента ЛДГ в динамике при лечении КХ составляло в среднем 5% в каждой контролируемой до 3-х суток точке. Исследование активности фермента на 3-и сутки показало, что лечение воспалительного процесса КХ позволяло снизить ее более, чем в 2 раза по сравнению с показателями в группе животных без применения КХ. Активность фермента оставалась на этом же уровне и через 7 сут наблюдений.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что КХ хориона оказывает эффективное влияние на динамику восстановления активности цитоплазматического фермента ЛДГ.

Полученные экспериментальные данные о стабилизирующем эффекте КХ при лечении воспалительных процессов у крыс дают основание предполагать его выраженную эффективность при лечении воспалительных заболеваний в клинической практике.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Александров П. Н., Сперанская Т. В. Динамика карагенового воспаления в условиях оксибутирата лития // Бюл. эксперим. биол. и мед.— 1988.— Т. 106.— С. 233–235.
2. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А. Определение средних молекул скрининг-методом // Клин. медицина.— 1981.— № 10.— С. 38–42.
3. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 66–68.
4. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии.— М.: Медицина, 1977.— С. 62–64.
5. Суббота Н. П. Перспектива создания нового класса лекарственных соединений на основе фетального сырья // Провизор.— 1999.— № 2.— С. 35–36.
6. Суббота Н. П. Проблемы современной биологической медицины // Пробл. криобиологии.— 1997.— № 4.— С. 3–14.
7. Суббота Н. П., Грищенко В. И., Питко В. А. и др. Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.— Харьков, 1997.— 8 с.
8. Суббота Н. П., Грищенко В. И., Питко В. А. Получение разнотканевых препаратов хориона для экспериментальных и клинических целей // Врач. практика.— 1998.— № 6.— С. 68–70.
9. Чернух А. М. Воспаление: Очерки патологии и экспериментальной терапии.— М.: Медицина, 1979.— 448 с.

Поступила 04.02.99

activity considerably reduced, though it was increased in 1.5 times in comparison with the activity of healthy animals' group, to the 10th day it was increased in 1.2 times.

It should be pointed, that in the cases of controlling of initial and final links of the LPO process during an inflammatory process, as well as the AMM one, the peak of changes was observed in the first observation day, and the maximum LDG activity was to the 3rd day.

When using CC in rat's group with an inflammatory process it has been revealed, that in 6 days the LDG activity was increased in 2 times in comparison with healthy animals' activity. In a day the LDG indices were 74.4% of the indices in the group with caused inflammation. A reduction of LDG enzyme activity in dynamics when treating by the CC in average made 5% in each controlled points down to 3 days. Investigation of the enzyme activity to the 3rd day showed, that the treatment of inflammatory process by CC allowed to reduce it more than twice in comparison with the indices in animals' group without applying the CCP. Enzyme activity remained at the same level even in 7 days of observations.

Due to mentioned above we can conclude, that the CC affected efficiently the dynamics of activity recovery of LDG cytoplasmatic enzyme.

Experimental data obtained on the CC stabilizing effect when treating inflammatory processes in rats, permit to suppose its manifested efficiency when treating inflammatory diseases in clinical practice.

## REFERENCES

1. Alexandrov P. N., Speranskaya T. V. The dynamics of the karaginen inflammation under the conditions of lithium oxybutyrate // Bul. of exp. biol. and med.— 1988.— 106.— P. 233–235.
2. Gabrielyan N. I., Dmitriev A. A. The determination of average molecules by means of scrining method // Clin. medicine.— 1981.— № 10.— P. 38–42.
3. Stal'naya I. D., Garishvili T. G. The method for malone dialdehyde determination by means of thiobarbyturate acid // Modern methods in biochemistry.— M.: Meditsina, 1977.— P. 66–68.
4. Stal'naya I. D. The method for determination of diene conjugation of non-saturated fat acids // Modern methods in biochemistry.— M.: Meditsina, 1977.— P. 62–64.
5. Subbota N. P. Perspective of the creation of a new series of medical compounds on the base of fetal raw materials // Provisor.— 1999.— № 2.— P. 35–36.
6. Subbota N. P. Problems of modern biological medicine // Problemy kriobiologii.— 1997.— № 4.— С. 3–14.
7. Subbota N. P., Grischenko V. I., Pit'ko V. A. et al. Obtaining, storage and application of fragments, suspensions and chorion cryoextraction. Method. recom.— Kharkov, 1997.— 8 p.
8. Subbota N. P., Grischenko V. I., Pitko V. A. Obtaining of chorion different tissue preparations for the experimental and clinical aims // Vrach. praktika.— 1998.— № 6.— С. 68–70.
9. Chernukh A. M. Inflammation: Essays of pathology and experimental therapy.— M.: Meditsina, 1979.— 448 p.

Accepted in 04.02.99



# Диференційний підхід до вивчення показників гуморального антитиреоїдного імунітету у хворих на АІТ після кріогенного лікування

Ю. І. КАРАЧЕНЦЕВ, В. В. ХАЗІЄВ

Український НДІ фармакоterapiї ендокринних захворювань, м. Харків

## Differential Approach to the Study of Humoral Antithyroid Indices After Cryogenic Treatment of the Patients with Autoimmune Thyroiditis

YU. I. KARACHENTSEV, V. V. KHAZIEV

Ukrainian Scientific Research Institute for Pharmacotherapy of Endocrine Diseases (USRIPhED), Kharkov

Вивчали показники гуморального антитиреоїдного імунітету у хворих на АІТ на протязі 24 місяців після традиційних методів хірургічного лікування та у комбінації з інтраопераційним мультифокальним дозованим кріовпливом (ІМДК). Критерієм розподілу на підгрупи було співвідношення Т-хелпери/Т-супресори  $\geq 3$  та  $< 3$ . Доведено, що операція викликає довготривалі позитивні зміни у системі гуморального антитиреоїдного імунітету; комбінація операції і ІМДК приводить до більш позитивного імунотропічного впливу, особливо перший рік спостереження; вказані зміни мають різні тенденції у підгрупах хворих з різним коефіцієнтом Т-хелпери/Т-супресори, що підтверджує доцільність такого диференційного розподілу.

Изучали показатели гуморального антитиреоидного иммунитета у больных с АИТ в течение 24 месяцев после традиционных методов хирургического лечения и в комбинации с интраоперационным мультифокальным дозированным криовоздействием (ИМДК). Критерием разделения на подгруппы было соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры  $\geq 3$  и  $< 3$ . Показано, что операция вызывает долговременные положительные изменения в системе гуморального антитиреоидного иммунитета; комбинация оперативного лечения и ИМДК приводит к более выраженному иммунокорректирующему влиянию, особенно первый год наблюдения; указанные изменения имеют различные тенденции в подгруппах с различным коэффициентом Т-хелперы/Т-супрессоры, что подтверждает целесообразность такого дифференцированного разделения.

Humoral antithyroid immune indexes after ordinary surgical treatment and in combination with intraoperating multifocal dosage cryoaction (IMDC) for the patients with autoimmune thyroiditis during 24 month are studied. Criterion of patients' subdivision was interrelation T-helpers/T-suppressors  $\geq 3$  and  $< 3$ . It is shows that surgical operation causes long-term positive changes in the humoral antithyroid immune system; combination of surgical treatment and IMDC causes more effective immune modulate action especially during the first year of observation; such changes have definite tendencies in the subgroups with different interrelation T-helpers/T-suppressors. Thus, such differential subdivision becomes expedient.

Аутоімунний тиреоїдит (АІТ) залишається найбільш поширеним захворюванням щитовидної залози (ЩЗ): одна з 10–30 дорослих жінок хворіє на АІТ [11]. Особливості патогенезу АІТ, відсутність ефективної специфічної терапії і складний характер перебігу хвороби вимагають пошуку нових, патогенетично обґрунтованих засобів її лікування. Наприклад, локальний кріовплив як самостійний метод або складова частина комбінованого лікування набув широкого використання в медицині. Важливим ефектом локального застосування наднизьких температур вважається їх імунотропічна дія на організм людини [7, 10]. Метод інтраопераційного мультифокального дозованого кріовпливу при лікуванні АІТ з хірургічним втручанням, який розроблено та клінічно апробовано в хірургічному відділенні УкрНДІФЕЗ, довів свою значну імунотропічну дію [8]. Різні клінічні варіанти АІТ (без порушення тиреоїдної функції, його гіпертрофічна та атрофічна форми і т.п. [1]), вимагають диференційного підходу до оцінки динаміки імунотропічних показників у хворих на АІТ після операції

Autoimmune thyroiditis (AIT) has remained the most spreaded thyroid gland (TG) disease: one of 10–30 adult women suffers from AIT [11]. The peculiarities of AIT pathogenesis, absence of efficient specific therapy and complicated character of the disease course demand the search for new, pathogenetically substantiated methods of their treatment. For example, a local cryoaction as an independent method or a part of a combined treatment is widely applied in a medicine. Their immune modulating effect on a human organism [7, 10] is an important effect of a local application of ultra-low temperatures. The method of intraoperating multifocal dosage cryoaction during the AIT treatment with a surgical invasion, developed and clinically proved in surgical department of the USRIPhED proved its significant immune correcting effect [8]. Different clinical variants of the AIT (without disorder of thyroid function, its hypertrophic and atrophic forms etc. [1]) require a differential approach to the estimation of the dynamics of immunological indices in patients with AIT after operation using IMDC. An important criterion of division of total



із застосуванням ІМДК. Важливим критерієм розподілу загальної кількості хворих на підгрупи є, наприклад, співвідношення Т-хелперів/Т-супресорів (Тх/Тс) [2]. Оскільки, на думку багатьох клініцистів, цей імунорегуляторний індекс вважається патогенетично ключовим, необхідно враховувати його при оцінці ефективності імюнокоригуючого впливу в процесі лікування хворих на АІТ. Метод ІМДК було використано при лікуванні 56 хворих на АІТ; контрольна група — 50 хворих, оперованих за звичайною методикою. Показаннями до операції були: значні розміри зобу, його виражена щільність та прогресуючий ріст, явища стиснення органів шиї та середостіння, онкологічна настороженість. Операції виконувалися за органозберігаючим принципом: у 70% хворих проведена економна резекція ЩЗ з обов'язковою резекцією перешийка, у решти — класична субтотальна резекція ЩЗ за методикою О. В. Ніколаєва [4]. При формуванні паратрахеальних часток ЩЗ з метою вибору функціонально неушкоджених ділянок її паренхіми використовувався спосіб субопераційного визначення вогнищ лімфоплазмоцитарної інфільтрації [8].

Кріоаплікації (1–5) проводилися автономним кріоінструментом або за допомогою стаціонарного апарату “Кріоелектроніка-2” за розробленою у клініці методикою [9].

Стан клітинного імунітету визначався за методом О. О. Ярилїна [4]. Для визначення Т-лімфоцитів використовувався метод “спонтанного” розеткоутворення з еритроцитами барана, В-лімфоцитів — з еритроцитами миші за методом Iondal M. у модифікації Р. В. Петрова [5]. При кількісному визначенні В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів та їх популяцій використовувався бінокулярний мікроскоп “ЛОМО” (Росія). Кількість Тх і Тс вивчали за допомогою навантажувального тесту [3]. Кількісно антиореїдні антитіла визначалися приладом оптичної щільності “Діагност” (Україна) та аналізатором імюноферментним (АІФ-Ц-01С, Білорусь) [6].

Результати оброблені методом варіаційної статистики на основі критеріїв Стюдента–Фішера та програм Microsoft Excel'97 (програмний пакет), Microsoft FoxPro (version 2.5) і Statistica (version 5.0).

Вивчення динаміки імюнологічного статусу було проведено у двох групах хворих на АІТ: у першу (контрольну) увійшли пацієнти, які потребували звичайного хірургічного втручання, у другу (основну) — хворі, у яких операція була виконана з використанням кріотехніки. Спостереження проводилися до операції і через 3, 6, 12, 24 міс. У межах кожної групи були виділені дві підгрупи: у першій вихідні значення коефіцієнта Тх/Тс були нормальними, тобто  $< 3$ , у другій цей коефіцієнт був  $\geq 3$ . Вивчалися показники як клітинної, так і гуморальної ланки імюної системи. При цьому особлива увага приділялася показникам гуморального антиореїдного імунітету — антитілам до ти-

number of patients into subgroups is for example the T-helpers/T-suppressors (Th/Ts) ratio [2]. Therefore according to the view of many clinicians this immune regulating index is considered as pathogenetically key one, it is necessary to take it into consideration when estimating the efficiency of immune correcting effect in the treatment process of patients with AIT.

The IMDC method was applied when treating 56 patients with AIT, the control group was 50 patients, operated according to traditional methods. Indications for the operation were: large sizes of goiter, its manifested density and progressing growth, phenomena of neck organ and mediastinum pressing, oncological watchfulness. Operations were conducted according to organ preserving principle: in 70% patients an economic TG resection with obligatory isthmus resection, in the rest — classic subtotal resection of TG was done according to the methods of O. V. Nikolayev [4]. During the formation of paratracheal TG parts with the aim of selection of functionally non damaged sites of its parenchyma, the way of suboperational determination lymphoplasmocyte infiltration foci was applied [8].

Cryoapplications (1–5) were conducted by independent cryoinstrument or by means of stationary apparatus “Krioelatronika-2” according to developed in clinical conditions methods [9].

The state of cellular immunity was defined by mean so the method of O. O. Yarylin [4]. To determine T-lymphocytes the method of “spontaneous” rosette formation with ram erythrocytes, B-lymphocytes — with mouse erythrocytes by the method of Iondal M. in modification of R. V. Petrov was used [5].

During quantitative determination of B-lymphocytes, T-lymphocytes and their population a binocular microscope “LOMO” (Russia) was used. The number of Th and Ts were studied by means of a loading test [3]. Antithyroid antibodies were quantitatively determined by means of the device of optical density “Diagnost” (Ukraine) and immune-enzymic analyser I-C-01C (Byelorussia) [6].

The results were processed by the method of variational statistics on the basis of the Student–Fisher criteria and Microsoft FoxPro (version 2.5) and Statistica (version 5.0) software.

Investigation of the dynamics of immunological status was conducted in two groups of patients with AIT: the first (control) group comprised the patients, who required a traditional surgical invasion, the second (main) one — the patients who were operated using cryotechnique. Observations were carried out before operation and in 3, 6, 12, 24 months. Within each group two subgroups were divided: in the first one initial values of the Th/Ts coefficient were normal, that was  $< 3$ , in the second one this coefficient was  $\geq 3$ . The parameters both of cellular and humoral links of immune system were examined. In this case a special attention was paid to the indices of humoral antithyroid immunity — antibodies to thyroglobulin



реоглобуліна (АТ до ТГ) і антитілам до мікросомального антигена (АТ до МС). Аналіз отриманих даних (табл. 1, 2) виявив, що імунологічні показники, які досліджувалися, на протязі усього періоду спостереження були досить нестабільними. Враховуючи значну довготривалість спостережень (2 роки), дана обставина не була несподіваною, оскільки показники імунітету підлягають закономірним коливанням (наприклад, добовим, сезонним тощо). Внаслідок цього зіставлення даних, які характеризують стан гуморального імунітету на етапах спостереження, повинно проводитися диференційно. Як і очікувалося, різниця у групах поміж пацієнтами з коефіцієнтами  $T_x/T_c < 3$  і  $\geq 3$  виявилася значною, що підтвердило доцільність такого підходу до аналізу цих масивів даних.

Для більш детальної об'єктивізації вказаних даних необхідно уважно вивчати вихідні показники у всіх підгрупах хворих, які досліджувалися. Так, до операції індекси антитіл у хворих, які відносяться до підгруп з  $T_x/T_c \geq 3$ , були майже у півтора рази менші, ніж у підгрупах з  $T_x/T_c < 3$ . Аналогічний стан визначався і у подальші строки обстеження: тобто зміни індексів були більш повільні у хворих підгруп з  $T_x/T_c \geq 3$ . В обох групах простежувалося значне зниження індексів АТ до ТГ та МС з міні-

(Ab to TG) and antibodies to microsomal antigen (Ab to MS). The analysis of obtained data (Table 1, 2) revealed, that immunological indices within the whole observation period were quite non-stable. Taking into account considerably long duration of observations (2 years) this circumstance was not unexpected, since the immunity indices did not subjected to regular deviations (e.g. daily, seasonal ones etc). Due to this fact the comparing of the data, characterizing the state of humoral immunity at the observation stages, should be differentially done. As it was expected, the difference in the groups between patients with the coefficients  $T_x/T_c < 3$  and  $\geq 3$  occurred to be significant, that confirmed the expediency of such an approach to the analysis of these data massifs.

For more detailed objectivity of the mentioned data it is necessary to carefully examine the initial indices in all subgroups of patients under study. Thus before operation the antibodies indices in patients referred to the subgroups with  $T_x/T_c \geq 3$  were almost in 1.5 times lower, than in those with  $T_x/T_c < 3$ . Similar state was found for more distant terms of observation: i.e. the changes in the indices were more slow in patients of the subgroups with  $T_x/T_c \geq 3$ . In both groups a considerable reduction in the indices of Ab to TG and MS with the minimization of their

Таблиця 1

Table 1

Динаміка змін показників гуморального антитиреоїдного імунітету у групах хворих на АІТ ( $T_x/T_c < 3$ ), оперованих із застосуванням ІМДК і за звичайною методикою

The dynamics of indices change of humoral antithyroid immune system in the patients' group with АІТ ( $T_x/T_c < 3$ ), operated using the IMDC and traditional method

| Група хворих, строк нагляду<br>Patients group, term of observation              | Кількість хворих<br>Patients' number | Статистичний показник<br>Statistical index       | Показник індексу антитіл<br>Antibody index |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
|                                                                                 |                                      |                                                  | до ТГ<br>to TG                             | до МС<br>to MS                           |
| 1. До операції<br>Before the operation                                          | 56                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$                           | $0,68 \pm 0,05$                            | $0,69 \pm 0,03$                          |
| 2. 3 міс після операції без ІМДК<br>3 months after the operation without IMDC   | 25                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-2}$              | $0,48 \pm 0,04$<br>$< 0,01$                | $0,47 \pm 0,04$<br>$< 0,001$             |
| 3. 6 міс після операції без ІМДК<br>6 months after the operation without IMDC   | 25                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-3}$              | $0,54 \pm 0,05$<br>$< 0,05$                | $0,48 \pm 0,05$<br>$< 0,001$             |
| 4. 12 міс після операції без ІМДК<br>12 months after the operation without IMDC | 23                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-4}$              | $0,44 \pm 0,04$<br>$< 0,001$               | $0,53 \pm 0,05$<br>$< 0,01$              |
| 5. 24 міс після операції без ІМДК<br>24 months after the operation without IMDC | 24                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-5}$              | $0,82 \pm 0,06$<br>$< 0,1$                 | $0,46 \pm 0,04$<br>$< 0,001$             |
| 6. 3 міс після операції з ІМДК<br>3 months after the operation using IMDC       | 31                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-6}$<br>$P_{2-6}$ | $0,44 \pm 0,03$<br>$< 0,001$<br>$> 0,1$    | $0,40 \pm 0,02$<br>$< 0,001$<br>$> 0,1$  |
| 7. 6 міс після операції з ІМДК<br>6 months after the operation using IMDC       | 30                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-7}$<br>$P_{3-7}$ | $0,31 \pm 0,04$<br>$< 0,001$<br>$< 0,001$  | $0,32 \pm 0,05$<br>$< 0,001$<br>$< 0,01$ |
| 8. 12 міс після операції з ІМДК<br>12 months after the operation using IMDC     | 28                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-8}$<br>$P_{4-8}$ | $0,32 \pm 0,03$<br>$< 0,001$<br>$< 0,02$   | $0,32 \pm 0,04$<br>$< 0,001$<br>$< 0,01$ |
| 9. 24 міс після операції з ІМДК<br>24 months after the operation using IMDC     | 28                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-9}$<br>$P_{5-9}$ | $0,55 \pm 0,09$<br>$> 0,1$<br>$< 0,02$     | $0,62 \pm 0,06$<br>$> 0,1$<br>$< 0,05$   |

Примітка. P — достовірність різниць груп, що порівнюються.

Note: P — statistical significance of the difference between groups, that were compared.



Динаміка змін показників гуморального антитиреоїдного імунітету у групах хворих на АІТ ( $T_h/T_s \geq 3$ ), оперованих із застосуванням ІМДК і за звичайною методикою

The dynamics of indices change of humoral antithyroid immune system in the patients' group with AIT ( $T_h/T_s \geq 3$ ), operated using the IMDC and traditional method

| Група хворих, строк нагляду<br>Patients group, term of observation              | Кількість хворих<br>Patients' number | Статистичний показник<br>Statistical index       | Показник індексу антитіл<br>Antibody index |                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
|                                                                                 |                                      |                                                  | до ТГ<br>to TG                             | до МС<br>to MS                      |
| 1. До операції<br>Before the operation                                          | 49                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$                           | $0,40 \pm 0,06$                            | $0,47 \pm 0,05$                     |
| 2. 3 міс після операції без ІМДК<br>3 months after the operation without IMDC   | 23                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-2}$              | $0,49 \pm 0,05$<br>> 0,1                   | $0,50 \pm 0,07$<br>> 0,1            |
| 3. 6 міс після операції без ІМДК<br>6 months after the operation without IMDC   | 25                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-3}$              | $0,36 \pm 0,03$<br>> 0,1                   | $0,27 \pm 0,02$<br>< 0,001          |
| 4. 12 міс після операції без ІМДК<br>12 months after the operation without IMDC | 21                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-4}$              | $0,36 \pm 0,02$<br>> 0,1                   | $0,41 \pm 0,01$<br>> 0,1            |
| 5. 24 міс після операції без ІМДК<br>24 months after the operation without IMDC | 20                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-5}$              | $0,65 \pm 0,08$<br>< 0,02                  | $0,57 \pm 0,04$<br>< 0,05           |
| 6. 3 міс після операції з ІМДК<br>3 months after the operation using IMDC       | 23                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-6}$<br>$P_{2-6}$ | $0,39 \pm 0,05$<br>> 0,1<br>> 0,1          | $0,48 \pm 0,06$<br>> 0,1<br>> 0,1   |
| 7. 6 міс після операції з ІМДК<br>6 months after the operation using IMDC       | 24                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-7}$<br>$P_{3-7}$ | $0,33 \pm 0,04$<br>> 0,1<br>> 0,1          | $0,31 \pm 0,07$<br>< 0,05<br>> 0,1  |
| 8. 12 міс після операції з ІМДК<br>12 months after the operation using IMDC     | 21                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-8}$<br>$P_{4-8}$ | $0,27 \pm 0,02$<br>< 0,05<br>< 0,01        | $0,30 \pm 0,01$<br>< 0,05<br>< 0,01 |
| 9. 24 міс після операції з ІМДК<br>24 months after the operation using IMDC     | 21                                   | $\bar{X} \pm S\bar{X}$<br>$P_{1-9}$<br>$P_{5-9}$ | $0,46 \pm 0,04$<br>> 0,1<br>< 0,05         | $0,42 \pm 0,03$<br>> 0,1<br>< 0,1   |

Примітка. P — достовірність різниць груп, що порівнюються.

Note: P — statistical significance of the difference between groups, that were compared.

мізацією їх значень при спостереженні 6 і 12 міс. Але через 2 роки після операції знову відмічено підвищення цих показників, особливо виразне у контрольній групі хворих.

Через 2 роки після хірургічного втручання у хворих з меншими порушеннями у системі імунного нагляду (підгрупи з  $T_h/T_s < 3$ ) кількісні значення індексів антитиреоїдних антитіл значно перевищували показники у хворих підгруп з  $T_h/T_s \geq 3$ . Можливо, таку різницю можна пояснити тим, що у хворих підгруп з  $T_h/T_s < 3$  аутоімунні процеси відбуваються переважно за рахунок гуморальної ланки імунітету, а у підгрупах з  $T_h/T_s \geq 3$  — переважно за рахунок розладів у Т-клітинній системі імунного нагляду.

Щодо різниць між контрольною і робочою групами, то на протязі усього строку обстеження визначалася більш сприятлива динаміка цих показників у хворих, оперованих з використанням ІМДК. Так, описане вище підвищення індексів антитіл через два роки має значну кількісну різницю у цих групах: якщо після використання ІМДК середні значення індексів антитіл до ТГ і МС лише набули вихідних значень або залишилися меншими, то у хворих, оперованих за звичайною методикою, вони перевищували вихідні значення у 1,6 (АТ до ТГ) і 1,2 рази (АТ до МС) у підгрупі з

values with the observation terms of 6 and 12 months was found. However in 2 years after operation it was again revealed an increase in these indices, especially manifested in the control group of patients. In 2 years after surgical invasion in the patients with less disorders in the system of immune monitoring (subgroups with  $T_h/T_s < 3$ ) the quantitative values of the indices of antithyroid antibodies significantly exceeded the indices in the patients of subgroups with  $T_h/T_s \geq 3$ . Probably this difference can be explained by the fact that in patients of the subgroups with  $T_h/T_s < 3$  autoimmune processes occur mainly due to humoral link of immunity, and in the subgroups with  $T_h/T_s \geq 3$  — generally due to the impairments in T-cellular system of immune monitoring.

As for the differences between the control and experimental groups, more favourable dynamics of these indices in patients operated using IMDC was noted. Thus described above increase in the indices of antibodies in 2 years has a significant quantitative difference in these groups: if after application of IMDC average values of the indices of antibodies to TG and MS only reached initial values or remained lower, than in the patients operated by means of a common method, they exceeded initial values in 1.6 (Ab to TG) and 1.2 times (Ab to MS) in the subgroup



$Th/Ts \geq 3$  та у 1,2 рази (АТ до МС) у підгрупі з  $Th/Ts < 3$ .

Таким чином, хірургічне втручання при лікуванні АІТ викликає довготривалі зміни гуморального антитиреоїдного імунітету. Інтраопераційне криогенне лікування при АІТ має значний імуноткоригуючий вплив на змінений внаслідок хвороби гуморальний антитиреоїдний імунітет, при цьому найбільш виразні позитивні зміни імунологічних показників спостерігаються у перший рік після хірургічного втручання. Вказані зміни мають різні тенденції у підгрупах хворих з коефіцієнтами співвідношення  $Th/Ts < 3$  і  $Th/Ts \geq 3$ , що підтверджує доцільність такого диференційного розподілу при вивченні динаміки стану гуморального антитиреоїдного імунітету.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Эндокринология. – М.: Медицина, 1998. – 582 с.
2. Клиническая иммунология: Руководство для врачей / Под ред. Е. И. Соколова. – М.: Медицина, 1998. – 286 с.
3. Коненков В. И. Модификация метода учета реакции бластной трансформации лимфоцитов // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 240–243.
4. Николаев О. В. Эндемический зоб. – М.: Медгиз, 1955. – 220 с.
5. Петров Р. В. Иммунологические и микробиологические аспекты радиационных медицинских последствий аварий на ЧАЭС. – М.: Медицина, 1987. – 323 с.
6. Фримель Д. А. Иммунологические методы исследования. – М.: Медицина, 1987. – С. 46–54.
7. Цуцаева А. А., Юрченко Г. Г., Попов Н. Н. и др. Иммунный статус больных раком шейки матки, леченных с применением криовоздействия // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 46–50.
8. Пат. 21089 А України, МКВ<sup>5</sup> А 61В17/00, G 01 № 33/48. Спосіб субопераційного визначення вогнищ лімфоплазмацитарної інфільтрації у щитовидній залозі / Ю. І. Караченцев; Український НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань (UA). – № 97052071; Заявлено 05.05.97; Опубл. 04.11.97.
9. Пат. 17493 А України, МКВ<sup>5</sup> А 61В17/36. Спосіб лікування аутоімунного тиреоїдиту / Ю. Караченцев, І. Гонкалова, В. Натаров, І. Лях; Український НДІ фармакотерапії ендокринних захворювань (UA). – № 95083944; Заявлено 28.08.95; Опубл. 06.05.97; Пріоритет 23.01.93, № 3769-XII.
10. Ablin J. R. An Appreciation and Realization of the Concept of Cryoimmunology // Percutaneous Prostate Cryoablation / Onik G. M. et al. (Eds.). – Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, 1995. – P. 136–154.
11. Amino N. Autoimmunity and hypothyroidism // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. – 1988. – 2, № 3. – P. 591–617.

Надійшла 01.07.99

with  $Th/Ts \geq 3$  and in 1.2 times (Ab to MS) in the subgroup with  $Th/Ts < 3$ .

Thus surgical invasion when treating AIT causes long-term changes of humoral antithyroid immunity. Intraoperative cryogenic treatment at AIT has significant immune correcting effect on the change due to the disease humoral antithyroid immunity, in this case the most manifested positive changes in immunological indices are observed in the first year after surgical invasion. The mentioned changes have different tendencies in subgroups of patients with ratio coefficients  $Th/Ts < 3$  and  $Th/Ts \geq 3$ , that confirms the expediency of such differential division when studying the dynamics of humoral antithyroid immunity state.

## REFERENCES

1. Balabolkin M. I. Endocrinology. – M: Meditsina, 1998. – 582 p.
2. Clinical immunology: Manual for physicians / Ed. by E. I. Sokolov. – M: Meditsina, 1998. – 286 p.
3. Konenkov V. I. Modification of the recording method of lymphocyte blast transformation // Lab. delo. – 1981. – № 4. – P. 240–243.
4. Nikolayev O. V. Edemic goiter. – M: Medgiz, 1955. – 220 p.
5. Petrov R. V. immunological and microbiological aspects of radiational medical consequences of the accidents at Chernobyl power station. – M: Meditsina, 1987. – 323 p.
6. Frimel D. A. Immunological methods of investigation. – M: Meditsina, 1987. – P. 46–54.
7. Tsutsayeva A. A., Yurchenko G. G., Popov N. N. et al. Immune status of patients with uterus cervical cancer, treated by cryoeffect application // Kriobiologiya. – 1986. – № 1. – P. 46–50.
8. Patent 21089 A of the Ukraine, MKI<sup>6</sup> A 61B17/00, G 01 № 33/48. The way of suboperational determination of lymphoplasmocyte infiltration foci in pancreas / Yu. I. Karachentsev; Ukrainian Scientific Research Institute for Pharmacotherapy of Endocrine diseases (UA). – № 97052071; Applied in 05.05.97; Published in 04.11.97.
9. Patent 17493 A of the Ukraine, MKB<sup>5</sup> A 61B17/36. The way of autoimmune thyreoiditis treatment / Yu. Karachentsev, I. Gopkalova, V. Natarov, I. Lyakh; Ukrainian Scientific and Research Institute for Pharmacotherapy of endocrine diseases treatment (UA). – № 95083944; Applied in 28.08.95; Published in 06.05.97; Priority 23.01.93, № 3769-XII.
10. Ablin J. R. An Appreciation and Realization of the Concept of Cryoimmunology // Percutaneous Prostate Cryoablation / Onik G. M. et al. (Eds.). – Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, 1995. – P. 136–154.
11. Amino N. Autoimmunity and hypothyroidism // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. – 1988. – 2, № 3. – P. 591–617.

Accepted in 01.07.99



# **Влияние трансплантации криоконсервированной фетотестикулярной ткани человека на функциональное состояние репродуктивной системы при некоторых формах мужского бесплодия**

В. И. ГРИЩЕНКО, В. А. КЕРОС

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

В. А. БОНДАРЕНКО

*Украинский НИИ фармакотерапии эндокринных заболеваний, г. Харьков*

## **Effect of Human Fetotesticular Tissue Transplantation on Functional State of Reproductive System at Some Male Infertility Forms**

V. I. GRISCHENKO, V. A. KEROS

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

V. A. BONDARENKO

*Ukrainian R&D Institute of Pharmacotherapy of Endocrinic Diseases, Kharkov*

Показана динамика основных показателей эндокринной системы и спермограмм у мужчин с некоторыми формами бесплодия после трансплантации криоконсервированной фетотестикулярной ткани человека (КФТТЧ) в амниотической оболочке.

Показана динаміка основних показників ендокринної системи і спермограм у чоловіків з деякими формами безплідності після трансплантації криоконсервованої фетотестикулярної тканини людини (КФТТЛ) в амніотичній оболонці.

Dynamics of main indices of endocrine system and spermograms in men with some infertility forms after transplantations of cryopreserved human fetotesticular tissue in amniotic membrane has been shown (CHFTT).

Одним из методов коррекции андрогендефицитных состояний у мужчин является трансплантация ткани, клеточных культур, лиофилизатов и тканевых экстрактов семенников животных и плодов человека. Показано [4], что аллотрансплантация фетального яичка на артериально-венозной ножке мальчикам с первичным гипогонадизмом стимулировала половое развитие. Использование культуры клеток Лейдига новорожденных поросят у лиц с гипогонадизмом приводило к увеличению уровня мужского полового гормона и улучшению сперматогенной функции [5, 6]. Однако эти исследования были проведены с применением нативных тканей. Данные об использовании в клинической практике трансплантации криоконсервированной ткани семенников плодов человека в доступной нам литературе отсутствуют. В связи с этим особый интерес представляло изучение влияния метода трансплантации КФТТЧ, разработанного в ИПКиК НАНУ [1], на функциональное состояние репродуктивной системы у лиц мужского пола.

Фрагменты ткани семенников плодов мужского пола, полученные в результате прерывания беременности (16–20 недель гестации) по социальным и медицинским показаниям в условиях гинекологического стационара, после замораживания-отта-

One of the methods for the correction of androgen-deficient states in men is the transplantation of tissue, cellular structures, lyophilization products and tissues extractions of animal's and human testes. It has been shown [4], that allotransplantation of fetal testis on arterial-venous stem to the boys with a primary hypogonadism stimulated a sexual development. The usage of Leydig's cell cultures of new born piglets in the persons with hypogonadism resulted into an increase of the level of male sexual hormone and improvement of spermatogenic function [5, 6]. However these studies were conducted using native tissues. There are no available data on the application in clinical practice of human fetal testes cryopreserved tissue transplantation. In this connection the study of the effect of the CHFTT transplantation method, developed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine (IPC&C), on a functional state of reproductive system in men, was of a special interest [1].

Tissue fragments of male fetus testes, obtained in the result of pregnancy interruption (16–20 weeks of gestation term) according to social and medical indications under conditions of gynaecological in-patient clinical hospital after the freeze-thawing on the pro-



ивания по программе, разработанной в ИПКиК НАНУ [3], были погружены в амниотическую оболочку и в условиях операционной трансплантированы в подкожно-жировую клетчатку 7 мужчинам в возрасте от 22 до 39 лет, которые состояли в бесплодном браке более 2-х лет. При изучении анамнестических данных, параметров андрологического статуса, квантификационной оценки степени полового развития [2], состояния предстательной железы и гормонального статуса было выявлено: у 1-го больного первичный препубертатный гипогонадизм с выраженной гипоплазией семенников, у 1-го — постпубертатную гипоплазию левого яичка как следствие перенесенного острого орхитидидимита с облитерацией придатка семенника справа, у 5 больных — идиопатическое бесплодие (отсутствие признаков гипогонадизма, каких-либо постабляционных поражений или воспалительных заболеваний половых органов). У всех больных до трансплантации КФТТЧ в амниотической оболочке и после нее через 1 неделю, 1 и 2 месяца изучалось содержание уровней тестостерона (Т), фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов в сыворотке крови иммуноферментным методом.

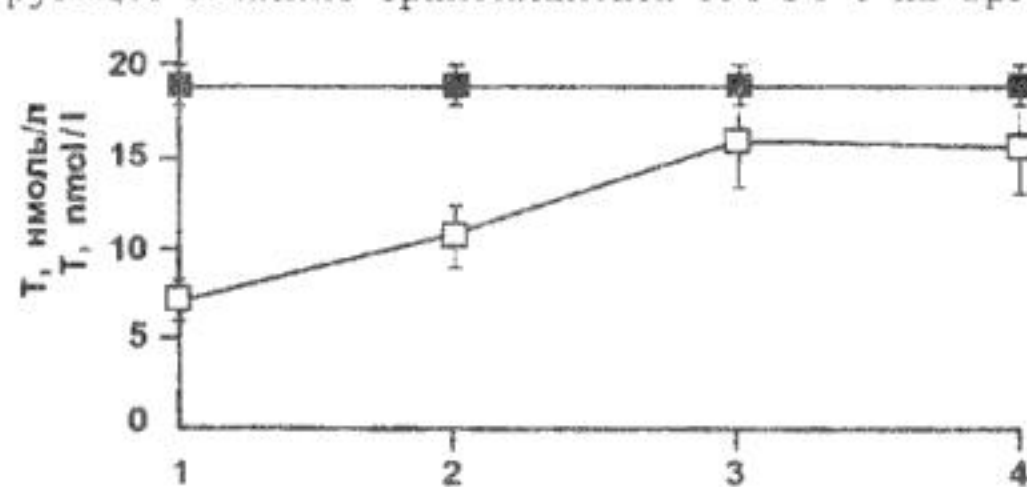
Динамическое исследование количественных и качественных показателей спермограмм производилось по общепринятой методике [7]. Заборы эякулята проводились после 5-дневной сексуальной абстиненции до имплантации и через 1 и 2 месяца после нее.

В качестве контроля служили 20 практически здоровых мужчин в возрасте 23–35 лет, имеющих в браке детей.

Основной целью применения трансплантации КФТТЧ является восполнение недостающего количества мужского полового гормона в организме больного. Поэтому одной из задач нашего исследования было решение вопроса, каким образом указанный метод терапии изменяет уровни тестостерона в сыворотке крови на протяжении выбранного периода наблюдения. Из рисунка, на котором представлены данные этой части работы, видно, что уже через 1 неделю после трансплантации КФТТЧ отмечается тенденция к повышению тестостерона в сыворотке крови, достигающая своего максимума через 1 месяц и сохраняющаяся приблизительно на этом уровне до 2-х месяцев. Средние значения тестостерона как через 1, так и через 2 месяца после трансплантации не отличались от показателей, характерных для практически здоровых лиц. Все это свидетельствует о том, что как минимум на протяжении 2-х месяцев отмечается андрогенкомпенсирующее влияние трансплантата КФТТЧ на орга-

низм, разработанной в ИПКиК [3] были помещены в амниотическую мембрану и в условиях операционной комнаты были трансплантированы в подкожную жировую клетчатку 7 мужчинам в возрасте от 22 до 39 лет, которые были бесплодными в течение 2 лет. При изучении анамнеза, параметров андрологического статуса с исследованием количественной оценки степени полового развития [2], состояния простаты и гормонального статуса было выявлено у одного пациента первичный препубертатный гипогонадизм с манифестированной гипоплазией яичек у одного пациента — постпубертатная гипоплазия левого яичка как следствие перенесенного острого орхоэпидидимита с облитерацией придатка яичка справа и у пяти пациентов — идиопатическое бесплодие (отсутствие признаков гипогонадизма, любых постабляционных повреждений или воспалительных заболеваний половых органов). Изучение содержания тестостерона, фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов в сыворотке крови с помощью иммунного ферментного метода было выполнено у всех пациентов до трансплантации КФТТЧ в амниотической мембране и в 1 неделю, 1 и 2 месяца после нее. Динамическое исследование качественных и количественных показателей спермограмм проводилось по общепринятым методам [3]. Эякулят собирали после 5-дневной половой воздержанности до имплантации и в 1 и 2 месяца после нее. 20 практически здоровых мужчин в возрасте 23–35 лет, имеющих детей в браке, служили контролем.

Основной задачей трансплантации КФТТЧ является восполнение недостаточного количества мужского полового гормона в организме пациента. Поэтому одной из задач нашего исследования было решение вопроса, каким образом этот метод терапии изменяет уровни тестостерона в сыворотке крови в течение выбранного периода наблюдения. Данные этой части работы представлены на рисунке, из которого видно, что уже через 1 неделю после трансплантации КФТТЧ наблюдается тенденция к повышению тестостерона в сыворотке крови, достигая максимума через 1 месяц и сохраняющаяся на этом уровне до 2 месяцев. Средние значения тестостерона как через 1, так и через 2 месяца после трансплантации не отличались от показателей, характерных для практически здоровых лиц. Все это свидетельствует о том, что как минимум в течение 2 месяцев наблюдается андрогенкомпенсирующее влияние трансплантата КФТТЧ на орга-



Характер изменения средних значений тестостерона в сыворотке крови 7 обследуемых мужчин под влиянием трансплантации КФТТЧ ( $M \pm m$ ): 1 — исходные данные; 2, 3, 4 — изменения через 1 неделю, 1 и 2 месяца соответственно; ■ — контроль; □ — уровень тестостерона у больных.

The character of changes in testosterone mean values in blood serum of 7 examined men under CHFTT transplantation ( $M \pm m$ ): 1 — initial data; 2, 3, 4 — in 1 week, in 1 month, in 2 months, correspondingly. ■ — control; □ — testosterone levels in patients.



низм мужчины. Учитывая это, интересно было проследить, каким образом подъем основного регуляторного гормона сперматогенеза тестостерона влияет на показатели спермограмм у обследуемых нами больных. Сперматологическое обследование до трансплантации выявило у 2-х больных азооспермию, у 3-х — олигозооспермию III степени и у 2-х — олигозооспермию II степени. Проведенная трансплантация КФТТЧ не изменила параметры спермограмм у лиц с азооспермией, на что было трудно надеяться, учитывая наличие выраженной гипоплазии семенников, а также обтурационного бесплодия. В связи с этим нами выяснялась динамика спермограмм у 5 лиц с идиопатической олигозооспермией. Мы анализировали характер изменений уровней Т, ФСГ и ЛГ у данного контингента лиц, а также показатели спермограмм (таблица). При этом отмечалась та же тенденция изменений уровня Т, что и в общей группе, с максимальным его повышением в сыворотке крови через 1 месяц после трансплантации и сохранением этого уровня до 2-х месяцев. Следует отметить, что, несмотря на увеличение Т, как средние значения ФСГ, так и ЛГ на протяжении всего периода наблюдений существенно не отличались от исходных данных, средние значения которых соответствовали контролю. Такая динамика гормональных показателей дает основание предположить, что трансплантация КФТТЧ лицам мужского пола способствует нормализации тестостеронемии, не влияя при этом существенно на гонадотропную функцию гипофиза, что характерно для классической андрогенотерапии [1].

Анализ показателей спермограмм у лиц с нормогонадотропной олигозооспермией через 1 и 2 месяца после трансплантации КФТТЧ выявил определенную их динамику. Через 1 месяц не от-

in the patients we studied. Spermatological examination before transplantation revealed azoospermia in 2 patients, the IIIrd grade oligospermia in 3 patients and the IIrd grade oligozoospermia in 2 patients. Conducted CHFTT transplantation did not change the parameters of spermograms in persons with azoospermia, that was difficult to be expected, taking into consideration the presence of manifested testes hypoplasia, as well as obturational infertility. In this connection we elucidated the dynamics of spermograms in persons with idiopathic oligozoospermia. We analysed the character of the level changes in testosterone, FSH, LH in given persons, as well as the indices of spermograms (Table). In this case the same tendency of the changes of testosterone levels, that in a general group with their maximum exceeding in a blood serum in 1 month after transplantation and keeping this level up to 2 months was found. It should be noted that in spite of testosterone increase both average values of FSH and LH during the whole observation period significantly did not differ from initial data, mean values of those corresponded to the control. This dynamics of hormonal indices allows to suppose, that CHFFT transplantation to men contributes to a normalization of testosterone, not affecting in this case considerably gonadotropic function of hypophysis, that is characteristic for a classical androgenotherapy [1].

The analysis of spermogram indices in persons with normogonadotropic oligozoospermia in 1 and 2 months after CHFFT transplantation revealed their certain dynamics. In 1 month no significant increase in the number of spermatozoa in 1 ml of ejaculate was noted,

**Динамика гормональных показателей и параметров спермограмм у 5 обследуемых мужчин с олигоспермией под влиянием трансплантации ФТТЧ ( $M \pm m$ )**

**Dynamics of hormonal indices and parameters of spermograms in 5 men being examined with oligospermia under HFFT transplantation effect ( $M \pm m$ )**

| Исследуемые показатели<br>Studied indices                                           | Время наблюдения<br>Observation time          |                                    |                                     |                                      | Данные контрольной группы<br>Control group data |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                                                                     | Исходные показатели<br>Initial indices<br>(1) | Через 1 неделю<br>in 1 week<br>(2) | Через 1 месяц<br>in 1 month<br>(3)  | Через 2 месяца<br>in 2 months<br>(4) |                                                 |
| Тестостерон, нмоль/л<br>Testosterone, nM/l                                          | $7,4 \pm 1,5$                                 | $10,6 \pm 1,9$<br>$p_{1-2} < 0,1$  | $15,1 \pm 2,5$<br>$p_{1-3} < 0,05$  | $15,0 \pm 2,3$<br>$p_{1-4} < 0,05$   | $19,1 \pm 1,1$                                  |
| ФСГ, МЕд/мл<br>FSH, Munit/ml                                                        | $4,9 \pm 1,4$                                 | $3,6 \pm 1,0$<br>$p_{1-2} < 0,05$  | $4,4 \pm 0,8$<br>$p_{1-3} < 0,05$   | $4,5 \pm 0,9$<br>$p_{1-4} < 0,05$    | $4,2 \pm 0,4$                                   |
| ЛГ, МЕд/мл<br>LH, Munit/ml                                                          | $3,6 \pm 1,1$                                 | $3,0 \pm 1,1$<br>$p_{1-2} < 0,05$  | $3,3 \pm 0,7$<br>$p_{1-3} < 0,05$   | $5,5 \pm 2,0$<br>$p_{1-4} < 0,05$    | $4,6 \pm 0,5$                                   |
| Количество эякулята, мл<br>Ejaculate quantity                                       | $2,9 \pm 0,7$                                 |                                    | $3,6 \pm 1,0$<br>$p_{1-3} < 0,05$   | $3,4 \pm 0,8$<br>$p_{1-4} < 0,05$    | $4,4 \pm 0,3$                                   |
| Количество сперматозоидов в 1 мл, млн<br>Spermatozoa number in 1 ml, mln            | $9,1 \pm 4,0$                                 |                                    | $14,8 \pm 6,2$<br>$p_{1-3} > 0,05$  | $25,6 \pm 6,2$<br>$p_{1-4} < 0,05$   | $75,3 \pm 5,2$                                  |
| Процент активно подвижных форм<br>Percentage of actively motile forms               | $6,0 \pm 5,4$                                 |                                    | $25,5 \pm 7,5$<br>$p_{1-3} < 0,05$  | $27,7 \pm 9,4$<br>$p_{1-4} < 0,05$   | $57,5 \pm 2,2$                                  |
| Процент подвижных форм<br>Percentage of motile forms                                | $21,2 \pm 9,7$                                |                                    | $47,7 \pm 9,4$<br>$p_{1-3} < 0,05$  | $58,9 \pm 7,7$<br>$p_{1-4} < 0,01$   | $72,0 \pm 1,4$                                  |
| Процент патологически измененных форм<br>Percentage of pathologically changed forms | $54,4 \pm 13,3$                               |                                    | $44,0 \pm 10,5$<br>$p_{1-3} < 0,05$ | $30,0 \pm 4,1$<br>$p_{1-4} < 0,1$    | $18,7 \pm 1,4$                                  |

**Примечание.**  $p$  — достоверность различий показателей.

**Note:**  $p$  — statistically significant differences in indices.



мечалось существенного увеличения количества спермиев в 1 мл эякулята, хотя при этом возрастал процент средних значений как общего числа подвижных, так и активно подвижных их форм. В то же время через 2 месяца после трансплантации статистически достоверно увеличивалось среднее значение количества спермиев в 1 мл эякулята ( $p < 0,05$ ) на фоне значительного возрастания всех их подвижных форм ( $p < 0,01$ ), которые не отличались от средних величин, характерных для практически здоровых лиц ( $p > 0,05$ ).

Следует также отметить, что через 2 месяца после трансплантации КФТТЧ отмечалась тенденция к уменьшению процента патологически измененных форм сперматозоидов ( $p > 0,1$ ).

Таким образом, трансплантация КФТТЧ лицам мужского пола с андрогендефицитными состояниями способствует постепенному подъему уровней мужского полового гормона сыворотки крови с максимальными его показателями на уровне физиологической нормы через 1 месяц и поддержании этих величин на протяжении как минимум 2-х месяцев (время исследования). Возрастание в сыворотке крови тестостерона при нормогонадотропном секреторном бесплодии после трансплантации КФТТЧ существенно не влияет на уровни ЛГ и ФСГ.

Трансплантация КФТТЧ обладает стимулирующим влиянием на сперматогенную функцию яичек у лиц с нормогонадотропной олигозоосpermией II–III степени.

Для более детального выяснения характера изменений функционального состояния репродуктивной системы у лиц мужского пола под влиянием трансплантации КФТТЧ, в том числе и в более отдаленные сроки, требуются дополнительные исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Грищенко В. І., Керос В. А., Бондаренко В. О. Кріоконсервування та клінічне застосування фрагментів фетотестикулярної тканини після кріоконсервування: Метод. рекомендації.— Харків, 1999.— 10 с.
2. Диспансеризация и реабилитация лиц с задержкой мужского пубертата: Метод. рекомендации / Сост. А. Н. Демченко, И. А. Черкасов.— Харьков, 1978.— 22 с.
3. Керос В. А. Кріоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии // Пробл. криобиологии.— 1999.— № 3.— С. 46–50.
4. Кирпатовский И. Д., Горбатюк Д. Л. Трансплантация неополовозрелого аллогенного яичка // Хирургия.— 1990.— № 6.— С. 103–106.
5. Кобяков С. К., Лучицкий Е. В., Турчин И. С. Клинико-лабораторная характеристика результатов трансплантации культуры ткани семенников больным эндокринной импотенцией и бесплодием: Материалы IV Всесоюзного съезда урологов.— М., 1990.— С. 327–328.
6. Кобяков С. А., Лучицкий Е. В., Турчин И. С. та ін. Досвід ксенотрансплантації органної культури сім'яників чоловікам із порушенням статевої функції // Сб. науч. тр. симп. с междунар. участием. 27–28 мая 1999 г.— Киев, 1999.— С. 102–106.
7. Руководство по андрологии / Под ред. О. А. Тиктинского.— Л.: Медицина, 1990.— 416 с.
8. Сексология и андрология / Под ред. А. Ф. Возианова, И. И. Горпинченко.— Киев: Абрис, 1997.— 880 с.

Поступила 02.11.99

although in this case the percentage of average values of both total number of motile and actively moving their forms enhanced. At the same time in 2 months after transplantation an average value of the number of spermatozoa in 1 ml of ejaculate ( $p < 0.05$ ) increased statistically true on the background of significant increase in all their motile forms ( $p < 0.01$ ), that did not differ from mean values, characteristic for practically healthy persons ( $p > 0.05$ ).

It should be also noted that in 2 months after the CHFFT transplantation, there was a tendency to a reduction of the percentage of pathologically changed spermatozoa forms ( $p > 0.1$ ).

Thus, transplantation of CHFFT to the men with androgendeficient states contributes to a gradual increase in the levels of male sexual hormone of blood serum with its maximum indices at level of physiological norm level in 1 month and keeping these values within at least 2 months (investigation time). An increase of testosterone in blood serum at normogonadotropic secretory infertility after the CHFFT transplantation significantly does not affect the levels of LH and FSH.

The CHFFT transplantation has a stimulating effect on spermatogenic function of testes in persons with normogonadotropic oligozoospermia of the II–III grade.

Additional studies are necessary for more detailed elucidation of the character of changes in functional state of reproductive system in men under the CHFFT transplantation effect including more distant terms.

## REFERENCES

1. Grischenko V. I., Keros V. A., Bondarenko V. O. Cryopreservation and clinical application of fetotesticular tissue fragments after cryopreservation: Method. recommendations.— Kharkov, 1999.— 10 p.
2. Prophylactic medical examination and rehabilitation of the persons with the delay of male pubertate: Methodical recommendations by A. N. Demchenko, I. A. Cherkasov.— Kharkov, 1978.— 22 p.
3. Keros V. A. Cryopreservation of human fetus testicular tissue and low temperature bank creation for further application in clinical transplantology // Problems of Cryobiology.— 1999.— № 3.— P. 46–50.
4. Kirpatovskiy I. D., Gorbatyuk D. L. Transplantation of immature allogeneic testis // Surgery.— 1990.— № 6.— P. 103–106.
5. Kobaykov S. A., Luchitsky E. V., Turchin I. S. Clinical and laboratory characteristics of the results of testes culture tissue transplantation to patients with endocrinic impotence and infertility // Proc. of the IV All-Union Congress of Urologists.— M., 1990.— P. 327–328.
6. Kobaykov S. A., Luchitsky E. V., Turchin I. S. et al. Experience of xenotransplantation of testes organ culture to men with the disorders in sexual function // Coll. of Scientific Papers of the Symp. with International Participation, 27–28 May 1999.— Kiev, 1999.— P. 102–106.
7. Manual on andrology / Ed. by O. A. Tiktinsky.— L: Meditsina, 1990.— 416 p.
8. Sexology and andrology / Ed. by A. F. Vozianov, I. I. Gorpinchenko.— K: Abris, 1997.— 880 p.

Accepted in 2.11.1999



## Осмотическое поведение эмбрионов мыши в растворах глицерина и его оксиэтилированного производного

О. Б. ХРОМЕНКОВА, Е. И. СМОЛЪЯНИНОВА, Л. А. ХАНИНА

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

## Osmotic Behavior of Mice Embryos in Glycerol and its Oxyethylated Derivative Solutions

O. B. KHROMENKOVA, E. I. SMOLYANINOVA, L. A. KHANINA

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

Одной из актуальных задач криобиологии является исследование влияния новых криозащитных веществ на морфологическую целостность и функциональные показатели консервируемых клеток. В связи с тем, что эквilibрация клеток в криозащитной среде сопряжена с процессами массообмена в системе "клетка-окружающая среда", исследование процессов массообмена является необходимым этапом оценки влияния криопротекторов на морфофункциональную сохранность клеток.

Цель данной работы — сравнение осмотического поведения бластомеров двухклеточных эмбрионов мыши в растворах типичного проникающего криопротектора — глицерина и оксиэтилированного производного глицерина (ОЭГ) со средней молекулярной массой 145.

Объектом исследования служили двухклеточные эмбрионы мыши, полученные от самок линии СВА возрастом 6–8 нед. по стандартной методике [1].

В работе использовали водные растворы глицерина и ОЭГ, синтезированного с применением катализатора кислой природы (эфирата трехфтористого бора) в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины. Как известно [4], в отличие от щелочей, данный катализатор инициирует присоединение оксида этилена преимущественно по вторичной гидроксильной группе. Таким образом, можно предположить в смеси изомеров наличие структуры с оксиэтиленовой цепочкой в положении 2 молекулы глицерина:  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CHO})_n-\text{CH}_2\text{OH}$  ( $n=4$ ). Этоксилат был очищен дистилляцией в глубоком вакууме (остаточное давление  $2 \cdot 10^{-5}$  мм рт. ст.). В качестве криопротектора использована фракция со средней молекулярной массой 145 с температурой кипения 107–110 °С. Осмотическое давление растворов определяли с помощью осмометра ОМКА-Ц-01.

Кинетику процессов массообмена между клеткой и средой изучали методом волюмометрии с кинорегистрацией наблюдаемых явлений [3]. Время контакта эмбрионов с исследуемым раствором составляло не более 75 мин. После обработки фотопленки экспериментально определяли изменение площади сечения клетки во времени, аппроксимируя ее сферой. Динамика изменения объема клеток служила основой анализа процессов массообмена [2], ее определяли по формуле:

$$V_t/V_0 = (S_t/S_0)^{3/2},$$

где  $V_0$  — исходный объем клетки;  $V_t$  — объем клетки в момент времени  $t$ ;  $S_0$  — исходная площадь сечения;  $S_t$  — площадь сечения в момент времени  $t$ .

Как видно из рис. 1, обезвоживание бластомеров происходит в среднем в течение 5–8 мин, и минимальные значения  $V_t$  составляют в 10,8%-м (1177 мОсм/кг) и 13,5%-м (1880 мОсм/кг) растворах  $0,53 \pm 0,02$  и  $0,56 \pm 0,01$  исходного объема клетки соответственно. Если принять объемную долю осмотически неактивных веществ  $\alpha$  в клетке равной 0,2, значения минимальных объемов клеток для непроникающих веществ с подобной осмотической активностью должны составлять 0,4 и 0,32 исходного

Одной из актуальных задач криобиологии является исследование влияния новых криозащитных веществ на морфологическую целостность и функциональные показатели консервируемых клеток. В связи с тем, что эквilibрация клеток в криозащитной среде сопряжена с процессами массообмена в системе "клетка-окружающая среда", исследование процессов массообмена является необходимым этапом оценки влияния криопротекторов на морфофункциональную сохранность клеток.

Цель данной работы — сравнение осмотического поведения бластомеров двухклеточных эмбрионов мыши в растворах типичного проникающего криопротектора — глицерина и оксиэтилированного производного глицерина (ОЭГ) со средней молекулярной массой 145.

Двухклеточные эмбрионы мыши, полученные от самок линии СВА возрастом 6–8 недель служили объектом исследования [1].

Водные растворы глицерина и ОЭГ, синтезированные с применением катализатора кислой природы (эфирата трехфтористого бора) в отделе криопротекторов ИПКиК НАН Украины были использованы в работе. Как известно [4], в отличие от щелочей, данный катализатор инициирует присоединение оксида этилена преимущественно по вторичной гидроксильной группе. Таким образом, в смеси изомеров можно предположить наличие структуры с оксиэтиленовой цепочкой в положении 2 молекулы глицерина:  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CHO})_n-\text{CH}_2\text{OH}$  ( $n=4$ ). Этоксилат был очищен дистилляцией в глубоком вакууме (остаточное давление  $2 \cdot 10^{-5}$  мм рт. ст.). В качестве криопротектора использована фракция со средней молекулярной массой 145 с температурой кипения 107–110 °С. Осмотическое давление растворов определяли с помощью осмометра ОМКА-Ц-01.

Кинетику процессов массообмена между клеткой и средой изучали методом волюмометрии с кинорегистрацией наблюдаемых явлений [3]. Время контакта эмбрионов с исследуемым раствором составляло не более 75 мин. После обработки фотопленки экспериментально определяли изменение площади сечения клетки во времени, аппроксимируя ее сферой. Динамика изменения объема клеток служила основой анализа процессов массообмена [2], ее определяли по формуле:

$$V_t/V_0 = (S_t/S_0)^{3/2},$$

где  $V_0$  — начальный объем клетки;  $V_t$  — объем клетки в момент времени  $t$ ;  $S_0$  — начальная площадь сечения;  $S_t$  — площадь сечения в момент времени  $t$ . Рис. 1 показывает, что обезвоживание бластомеров происходит в среднем в течение 5–8 мин, и минимальные значения  $V_t$  составляют в 10,8%-м (1177 мОсм/кг) и 13,5%-м (1880 мОсм/кг) растворах  $0,53 \pm 0,02$  и  $0,56 \pm 0,01$  от начального объема клетки соответственно. Если принять объемную долю осмотически неактивных веществ  $\alpha$  в клетке равной 0,2, значения минимальных объемов клеток для непроникающих веществ с подобной осмотической активностью должны составлять 0,4 и 0,32 от начального

Изменение объема бластомеров в ОЭГ растворах представлено на рис. 2. Значение максимального объема в 10%-м растворе



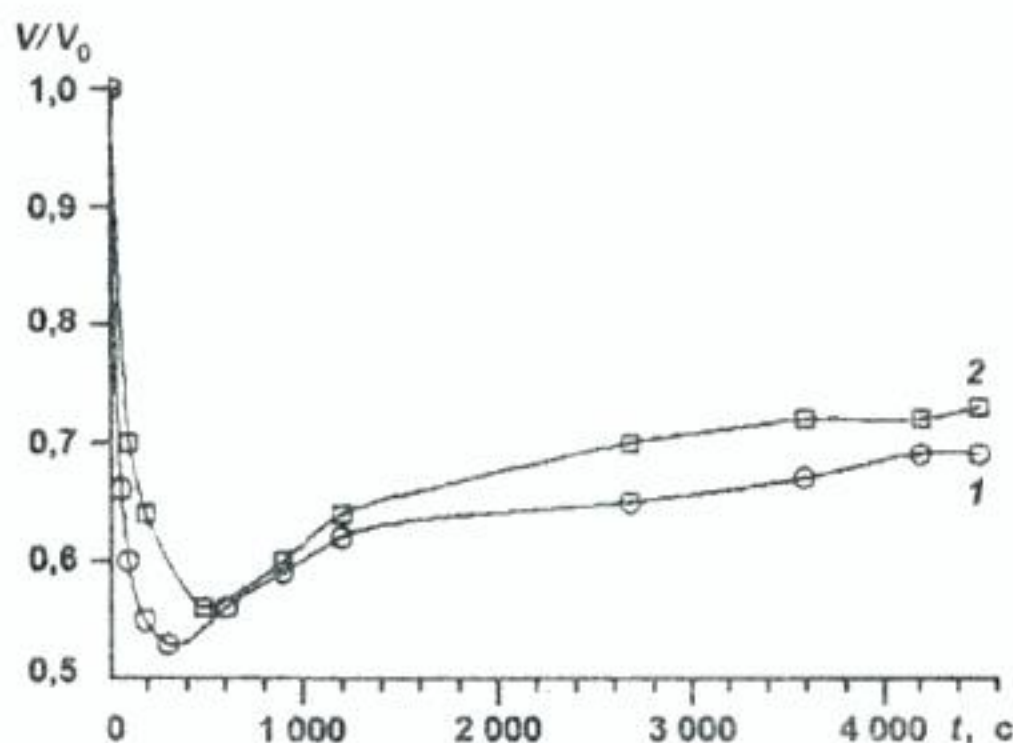


Рис. 1. Характерная зависимость объема бластомера двухклеточного эмбриона мыши от времени экспозиции в растворах глицерина: 1 – 10,8%, 2 – 13,5%.

Fig. 1. Characteristic dependency of mice two-cells' embryo blastomer volume on exposure time in glycerol solutions: 1 – 10.8%, 2 – 13.5%.

объема [2]. Меньшее обезвоживание, полученное в эксперименте, можно объяснить проникновением глицерина в клетку.

Изменение объема бластомеров в растворах ОЭГ представлено на рис. 2. Значение минимального объема в 10%-м растворе (2064 mOsm/kg) равно  $0,88 \pm 0,03$ , а в 20%-м (3470 mOsm/kg) –  $0,69 \pm 0,02$  исходного объема клетки, тогда как рассчитанные для идеального осмометра значения (при  $\alpha = 0,2$ ) составляют 0,31 и 0,27 соответственно. Как известно, в растворах, содержащих проникающий и непроникающий компоненты, объем клетки после полного осмотического уравнивания определяется концентрацией непроникающего компонента [3]. При увеличении общей концентрации раствора увеличивается концентрация как проникающих, так и непроникающих его компонентов, что объясняет меньшее значение клеточного объема в 20%-м растворе, чем в 10%-м. Меньшее, чем в глицерине, обезвоживание бластомеров двухклеточных эмбрионов мыши в растворах ОЭГ и отсутствие выраженной двухфазности кривых может быть объяснено тем, что в них присутствуют низкомолекулярные полимергомологи, скорость проникновения которых сравнима со скоростью проникновения воды. Из полученных данных можно оценить концентрации непроникающих компонентов в растворах ОЭГ (в предположении, что бластомеры ведут себя как идеальные осмометры). При  $\alpha = 0,2$  они составляют 340 и 480 mOsm в 10%-м и 20%-м растворах соответственно.

Таким образом, при использовании растворов, содержащих проникающие и непроникающие добавки, установлено, что увеличение общей концентрации растворов приводит к все более выраженной степени обезвоживания клеток в результате увеличения в этих растворах концентрации непроникающего компонента; низкомолекулярные компоненты, скорость проникновения которых сравнима со скоростью проникновения воды, могут приводить к отсутствию характерной для большинства известных проникающих криопротекторов двухфазной кинетики осмотического поведения клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Биология развития млекопитающих. Методы / Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
2. Гордиенко Е. А., Пушкар Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.
3. Кулешова Л. Г. Кинетика льдообразования в живых клетках и модельных системах: Автореф. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1983. – 24 с.
4. Шенфельд Н. Поверхностно-активные вещества на основе оксида этилена. – М.: Химия, 1982. – 750 с.

Поступило 18.05.99

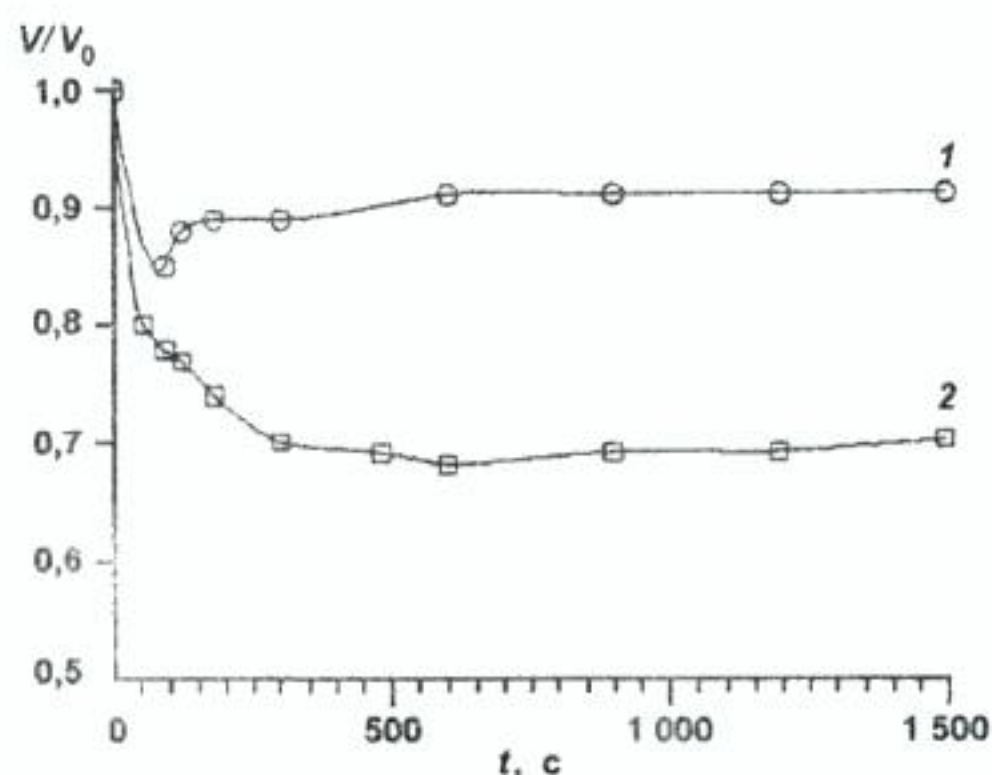


Рис. 2. Характерная зависимость объема бластомера двухклеточного эмбриона мыши от времени экспозиции в растворах ОЭГ с молекулярной массой 145: 1 – 10%, 2 – 20%.

Fig. 2. Characteristic dependency of mice two-cells' embryo blastomer volume on exposure time in OEG solutions with m.m. 145: 1 – 10%, 2 – 20%.

(2064 mOsm/kg) is equal to  $0,88 \pm 0,03$  and in 20% (3470 mOsm/kg) –  $0,69 \pm 0,02$  of initial cell volume, meanwhile calculated for an ideal osmometer value (at  $\alpha = 0,2$ ) make 0,31 and 0,27, correspondingly. As it is known, in the solutions, containing penetrating and non-penetrating components, the cell volume after a complete osmotic balancing is determined by the concentration of non-penetrating component [3]. When increasing a total concentration of the solution the concentration of both its penetrating and non-penetrating components rises, that explains a less value of cellular volume in 20% solution, than in 10% one. Less in comparison with glycerol dehydration of blastomeres of two-cells' mice embryos in the solutions of OEG and the absence of manifested two phase existence of curves can be explained by the fact, that there are low molecular polymerhomologues in them, the penetration rate of which is comparable with the rate of water penetration. The obtained data can be used for the estimation of the concentration of non-penetrating components in the OEG solutions (if blastomeres are assumed as ideal osmometers). They make 340 and 480 mOsm in 10% and 20% solutions correspondingly at  $\alpha = 0,2$ .

Thus when using the solutions containing penetrating and non-penetrating additives it has been established, that an increase of total concentration of the solutions leads to more manifested degree of cell dehydration in the result of rising of non-penetrating component concentration in these solutions: low molecular components, penetration rate of which is comparable with the one of water penetration may result to the absence of a characteristic two-phase kinetics of osmotical cell behaviour for the majority of known penetrating cryoprotectants.

## REFERENCES

1. Biology of mammalian development. Methods / Ed. by M. Mank. – M.: Mir, 1990. – 406 p.
2. Gordienko E. A., Pushkar N. S. Physical grounds of low temperature preservation of cellular suspensions. – Kiev: Naukova Dumka, 1994. – 144 p.
3. Kuleshova L. G. Kinetics of ice-formation in alive cells and model systems: Author abstracts of PhD thesis (biology). – Kharkov, 1983. – 24 p.
4. Shenfeld N. Surface active substances on the base of ethylene oxide. – M.: Chemistry, 1982. – 750 p.

Accepted in 18.05.99



# Динамика деградации макроэргических соединений в изолированных эритроцитах человека в присутствии глицерина

В. Д. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Dynamics of Macroergic Compound Degradation in Human Isolated Erythrocytes in the Presence of Glycerol

V. D. ZINCHENKO

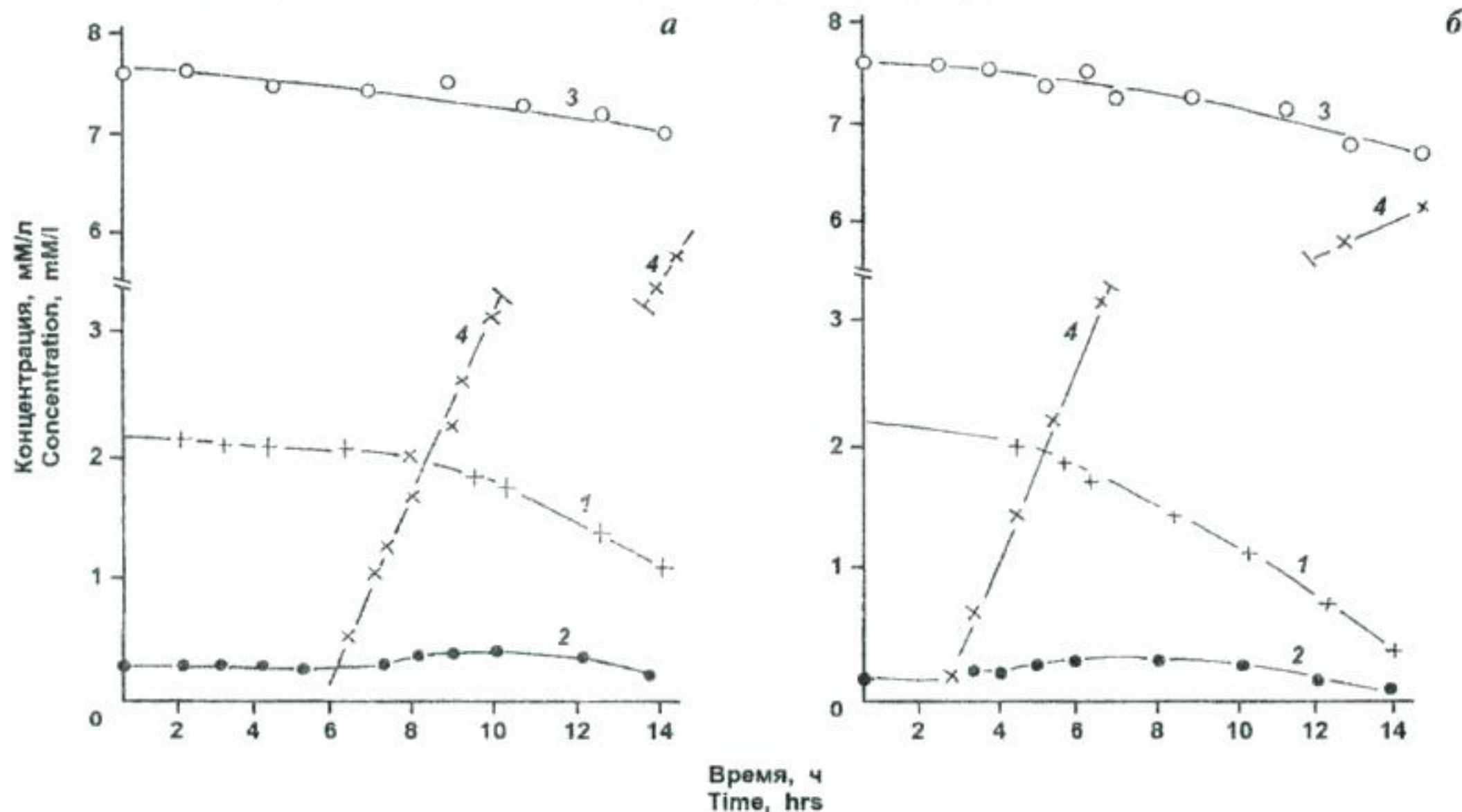
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

В изолированных эритроцитах человека распад 2,3-DPG ускоряется, если в среду суспендирования вводить криозащитные вещества — глицерин, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоль [1, 2]. Цель работы — исследование динамики распада макроэргических соединений (АТФ и АДФ), накопления неорганического фосфата ( $P_i$ ) и изменения общего пула нуклеотидов в эритроцитах человека при инкубации их в среде, содержащей 15% (объем) глицерина.

Использовался метод  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, подготовка образцов и регистрация спектров были такими же, как описано в [1, 2]. Концентрация мобильного АДФ, регистрируемого в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, измерялась по разности интенсивностей  $\gamma$ - и  $\beta$ -пиков АТФ ( $\gamma$ -пик АТФ содержит вклад  $\beta$ -фосфатных групп АДФ [3]), концентрация АТФ определялась по интенсивности  $\beta$ -пика. Полученные зависимости концентраций АТФ, АДФ,  $P_i$  и общего пула нуклеотидов от времени при 20 °С представлены на рисунке.

In human isolated erythrocytes the 2,3-DPG decay accelerates, when introducing cryoprotective substances — glycerol, 1,2-propane diol, polyethylene glycol into the medium under suspending [1, 2]. The aim of the work is to investigate the dynamics of macroergic compound (ATP and ADP) decay, accumulation of an inorganic phosphate ( $P_i$ ) and the change of a total pool of nucleotides in human erythrocytes when incubating them in the medium, containing 15% (vol.) of glycerol.

The  $^{31}\text{P}$ -NMR method was used, the samples preparation and the spectra recording were the same, as described in [1, 2]. The concentration of a mobile ADP, being recorded in  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra, was measured according to a difference of intensities of ATP  $\gamma$ - and  $\beta$ -peaks (ATP  $\gamma$ -peak contains a contribution of  $\beta$ -phosphate groups of ADP [3]), ATP concentration was determined on the  $\beta$ -peak intensity. The obtained dependencies of ATP, ADP,  $P_i$  concentrations and a total pool of nucleotides on the time at 20 °C are



Зависимости концентраций мобильных соединений, регистрируемых в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР изолированных эритроцитов, от времени при 20 °С: а — без глицерина; б — в присутствии 15% (объем.) глицерина: 1 — АТФ; 2 — АДФ; 3 — общего пула нуклеотидов; 4 — неорганического фосфата.

Dependencies of concentrations of mobile compounds, recorded in spectra of  $^{31}\text{P}$ -NMR, in isolated erythrocytes, on the time at 20 °C: а — without glycerol; б — in the presence of 15% (volume) of glycerol: 1 — ATP; 2 — ADP; 3 — a total pool of nucleotides; 4 — inorganic phosphate.



Начало отсчета времени соответствует моменту отмывки эритроцитов от плазмы.

При отсутствии глицерина (рисунок *a*) уровень АТФ и АДФ очень мало зависит от времени, примерно 5 ч (лаг-период), пока концентрация 2,3-DPG в эритроцитах не падает ниже 2 мМ/л. После этого наблюдаются падение уровня АТФ и рост уровня  $P_i$ . Общее количество нуклеотидов снижается примерно на 10%. Это указывает на иммобилизацию части пула фосфатов, главным образом в результате реакции с магнием или кальцием, что ведет к уширению линии ЯМР фосфора [3]. Концентрация АДФ составляет около 10% от концентрации АТФ. Небольшое возрастание уровня АДФ и затем дальнейшее его падение объясняются тем, что АДФ является промежуточным продуктом между АТФ и  $P_i$ .

В присутствии глицерина (рисунок *b*) наблюдаются уменьшение продолжительности лаг-периода до 2,5 ч и увеличение скорости истощения клеток по АТФ. Рост уровня  $P_i$  происходит несколько быстрее, чем падение уровня АТФ. Это можно понять, если принять во внимание, что  $P_i$  является конечным продуктом деградации макроэргических соединений и на возрастание его уровня влияет распад не только АТФ, но и 2,3-DPG.

Из представленных результатов видно, что для сохранения энергетического статуса изолированных эритроцитов клетки не следует хранить дольше, чем продолжительность лаг-периода, характеризующего распад макроэргических соединений. В присутствии глицерина это время сокращается.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зинченко В. Д., Кнубовец Т. Л., Сибельдина Л. А. и др. Исследование методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР метаболизма некоторых фосфатов эритроцитов человека при криоконсервировании с 1,2-пропандиолом // Криобиология. — 1987. — № 2. — С. 37–42.
2. Мусатов В. И., Зинченко В. Д., Бжезовский В. М. Влияние криопротекторов на состояние 2,3-DPG в эритроцитах по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР // Физико-химические процессы в криобиологических системах: Сб. науч. тр. — Харьков: ИПКиК АН Украины, 1991. — С. 96–101.
3. Gadian D. G. NMR and its application to living systems. — Oxford: Clarendon Press, 1982. — 197 p.

Поступило 12.01.99

presented in the figure. The beginning of the time counting corresponds to the moment of erythrocyte washing from a plasma.

At glycerol absence (Figure *a*) the level of ATP and ADP depends on a time very slightly, approximately 5 hrs (lag-period), until the concentration of 2,3-DPG in erythrocytes does not decrease lower than 2 mM/l. After that a decrease in ATP level and a growth of  $P_i$  level are observed. A total number of nucleotides decreases approximately by 10%. That points to an immobilization of phosphate pool part, mainly as a result of the reaction with magnesium or calcium, that leads to the phosphorus NMR line broadening [3]. ADP concentration makes about 10% of ATP concentration. A slight increase in ADP level and then following its reduction are explained by the fact, that ADP is an intermediary product between ATP and  $P_i$ .

In the presence of glycerol (Figure *b*) a reduction of the lag-period duration down to 2.5 hrs and an increase in a rate of cell exhaustion in ATP respect are observed. The growth of  $P_i$  level occurs a little bit more rapidly, than the fall in ATP level. One can understand, if  $P_i$  is assumed as a final product of macroergic compound degradation, and a decay not only of ATP, but of 2,3-DPG too affect its level increase.

The results presented show, for the preservation of an energetic status of isolated erythrocytes, the cells should not be stored longer than a lag-period duration, characterizing a decay of macroergic compounds. This time is reduced in glycerol presence.

## REFERENCES

1. Zinchenko V. D., Knubovets T. L., Sibeldina L. A. et al. Investigation of metabolism of some phosphates of human erythrocytes using  $^{31}\text{P}$ -NMR method during cryopreservation with 1,2-propane diol // Cryobiology. — 1987. — № 2. — P. 37–42.
2. Musatov V. I., Zinchenko V. D., Bzhezovsky V. M. Effect of cryoprotectants on a state of 2,3-DPG in erythrocytes according to the data of  $^{31}\text{P}$ -NMR // Physical and chemical processes in cryobiological systems: Collection of scientific works. — Kharkov: Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Nat. Acad. of Sci. of the Ukraine, 1991. — P. 96–101.
3. Gadian D. G. NMR and its application to living systems. — Oxford: Clarendon Press, 1982. — 197 p.

Accepted in 12.01.99



# Интенсивность биосинтеза белка в эмбрионах белых мышей под влиянием гипотермической консервации и действия фракции эпителия кишечника из зимнеспящего суслика *C. undulatus*

В. И. ЗАГНОЙКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Intensity of Protein Biosynthesis in White Mice Embryos under the Effect of Hypothermal Preservation and the Action of Intestine Epithelium Fraction from *C. undulatus* Hibernating Ground-squirrel

V. I. ZAGNOYKO

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

В предыдущих исследованиях [1] было показано, что под влиянием фракции эпителия (ФЭ), выделенной из кишечника (1–10 кД) зимнеспящего суслика *C. undulatus*, удается продлить сроки консервации эмбрионов белых мышей. Это обусловлено гипометаболическим действием ФЭ кишечника суслика на активность биосинтеза белка в эмбрионах белых мышей.

Цель данной работы – выяснить влияние ФЭ молекулярной массы 1–10 кД зимнеспящего суслика *C. undulatus* на угнетение биосинтеза белка при гипотермическом хранении эмбрионов белых мышей и возможность его последующего восстановления.

Первую группу (10 эмбрионов) после вымывания помещали в среду Дюльбекко с содержанием 10%-й эмбриональной сыворотки и проводили изотопный анализ. Эта группа была контрольной. Вторая группа, содержащая также 10 эмбрионов в среде Дюльбекко с эмбриональной сывороткой, была контрольной по отношению к эмбрионам, хранившимся 24, 48 и 72 ч в среде ФЭ.

Стеклянные ампулы заполняли 0,5 мл среды Дюльбекко с 10%-й эмбриональной сывороткой, после чего вносили эмбрионы. Ампулы с эмбрионами ступенчато охлаждали от комнатной температуры (20 °C) до 5 °C и выдерживали при данной температуре 5 мин. Охлаждение 0,5 мл ФЭ проводили аналогично. При 5 °C в ампулу с эмбрионами по каплям в соотношении 1:1 добавляли 0,25 мг/л ФЭ. После отогрева на водяной бане и удаления ФЭ осуществляли изотопный анализ сразу и после дополнительного культивирования в среде Виттена при 37 °C в атмосфере тройного газа (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>). Для анализа эмбрионы (10 шт.) помещали в 0,5 мл среды BSM, содержащей <sup>3</sup>H-лейцин (в дозе 10 мКи, радиоактивность 1 мКи), и инкубировали при 37 °C в течение 3 ч. Затем промывали холодной средой, содержащей лейцин. Разрушали эмбрионы путем 10-кратного их замораживания и оттаивания. Осаждение белков осуществляли при 4 °C добавлением 2 мл холодной трихлоруксусной кислоты и последующем помещением в 5 мл холодного 70%-го спирта. Для окончательного высушивания фильтры выдерживали 10 мин при 50 °C. Активность биосинтеза определяли с помощью счетчика, помещая фильтр в 14 мл жидкого сцинтиллятора.

Результаты опытов, представленные в таблице, свидетельствуют о почти полном ингибировании биосинтеза белка в эмбрионах мышей после гипотермической консервации вплоть до 3-х суток, а также о полном восстановлении биосинтеза белка эмбрионов в культуре после часового дополнительного культивирования эмбрионов, хранившихся в течение 24; 72 ч.

Our previous investigations [1] it have shown, that under the effect of epithelium fraction (EF), separated from the intestine (1–10 kD) of *C. undulatus* hibernating ground-squirrel, we succeeded to prolong white mice embryos preservation. This fact is stipulated by hypometabolic effect of the EF of ground squirrel's intestine on the activity of protein biosynthesis in white mice embryos.

The aim of the given work is to reveal the effect of the EF with the molecular mass of 1–10 kD of the EF of *C. undulatus* hibernating ground-squirrel on the protein biosynthesis suppression during hypothermal storage of white mice embryos and the possibility of its further recovery.

The first group (10 embryos) after washing-out were put into the Dulbecco medium with the content of 10% embryonic serum and isotope analysis was carried-out. This group was the control one. The second group, containing also 10 embryos in the Dulbecco medium with an embryonic serum was the control one in respect to the embryos, stored 24, 28 and 72 hrs in the EF medium.

Glass ampoules were filled with 0.5 ml of the Dulbecco medium with 10% of embryonic serum, after this the embryos were placed in. Ampoules with embryos were gradually cooled from the room temperature (20 °C) down to 5 °C and kept under the given temperature during 5 min. Cooling by means of 0.5 ml of EF was done analogously. 0.25 mg/l of the EF was added at 5 °C in ampoule with embryos by drops in the 1:1 ratio. After thawing on a water bath and the EF removal, an isotopic analysis was already carried out and after an additional culturing in the Vitten medium at 37 °C in the triple gas atmosphere (5% of CO<sub>2</sub>, 5% of O<sub>2</sub>, 90% of N<sub>2</sub>). Embryos (10 ones) were placed into 0.5 ml of the BSM medium, containing <sup>3</sup>H-leucine (in the dose of 10 μCi, radioactivity – 1 mCi) and incubated at 37 °C during 3 hrs. Then they were washed with a cold serum, containing leucine. Embryos were destroyed by 10-times their freezing and thawing. Protein precipitation was conducted at 4 °C by means of a cold trichloroacetic acid addition and further storage in 5 ml of cold 70% alcohol. With the aim of an additional drying, the filters were held during 10 min at 50 °C. Biosynthesis activity was measured by means of the counter, placing the filter in 14 ml of a liquid scintillator.

Presented in the table results of the experiments testify to a complete recovery of protein biosynthesis in mice embryos after hypothermal preservation up to 3 days, as well as to full recovery of embryo protein biosynthesis in a culture after an hour additional culturing of embryos, stored during 24, 72 hrs.



Активность биосинтеза белка в клетках эмбрионов мышей после гипотермического хранения в течение различного времени под влиянием фракции эпителия из тонкого кишечника (1–10 кД) зимнеявщего суслика *C. undulatus*

| Условия эксперимента                              |      | Активность биосинтеза, имп/мин, n = 39 |
|---------------------------------------------------|------|----------------------------------------|
| Нативные эмбрионы                                 |      | 1163 ± 35                              |
| Сразу после хранения:                             | 24 ч | нет включения                          |
|                                                   | 48 ч | нет включения                          |
|                                                   | 72 ч | нет включения                          |
| После 1-часового дополнительного культивирования: | 24 ч | 1150 ± 20                              |
|                                                   | 48 ч | 1125 ± 38                              |
|                                                   | 72 ч | 1110 ± 47                              |

Таким образом, предложенный метод консервирования эмбрионов млекопитающих позволяет хранить их в течение 72 ч в среде, не содержащей химических агентов, что исключает генетические изменения эмбрионов в процессе их развития.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 1821118 РФ. МКІ<sup>3</sup> А01 № 1/2. Способ консервирования эмбрионов млекопитающих / В. И. Грищенко, Н. А. Лучко, В. И. Загнойко, С. Г. Колаева, Л. П. Крамарова. — Заявлено 26.06.91. Опубликовано 15.06.93. Бюл. № 22.

Поступила 23.06.99

Protein biosynthesis activity in the cells of white mice embryos after the hypothermal storage during different time under the effect of small intestine epithelium fraction (1–10 kD) of *C. Undulatus* hibernating ground-squirrel

| Experimental conditions              |        | Biosynthesis activity, imp/min n = 39 |
|--------------------------------------|--------|---------------------------------------|
| Native embryos                       |        | 1163 ± 35                             |
| Already after the preservation:      | 24 hrs | No inclusion                          |
|                                      | 48 hrs | No inclusion                          |
|                                      | 72 hrs | No inclusion                          |
| After one-hour additional culturing: | 24 hrs | 1150 ± 20                             |
|                                      | 48 hrs | 1125 ± 38                             |
|                                      | 72 hrs | 1110 ± 47                             |

Thus, the method proposed of mammalian embryo preservation allows to store them during 72 hrs in the medium, does not containing chemical agents, that excludes embryo genetic changes during their development.

### REFERENCES

1. Pat. 1821118 RF. МКІ<sup>3</sup> А01 № 1/2. The way of mammalian embryos preservation / V. I. Grischenko, N. A. Luchko, V. I. Zagnoyko, S. G. Kolayeva, L. P. Kramarova. — Declared 26.06.91. Published 15.06.93. Bul. № 22.

Accepted in 23.08.99





## ПОЛОЖЕННЯ

про конкурс на здобуття премії  
ім. чл.-кор. НАН України  
**БЕЛОУСА Аполлона Максимовича**  
для молодих вчених за кращі наукові роботи  
в галузі кріобіології і кріомедицини

Премія присуджується молодим вченим директором Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України на честь видатного вченого-кріобіолога, одного із засновників ІПКіК НАН України, лауреата Державної премії України, премій НАН України ім. О. О. Богомольця та ім. О. В. Палладіна, чл.-кор. НАН України, професора, доктора медичних наук Белоуса Аполлона Максимовича

Премія присуджується щороку (в січні) окремому автору або колективу авторів за кращі наукові роботи, а також за серії наукових робіт єдиної тематики і за відкриття та винаходи в галузі кріобіології і кріомедицини. Колектив, висунутий на здобуття премії, повинен включати лише основних провідних авторів, внесок яких був найбільш вагомим, і мати в своєму складі не більше трьох осіб. Особам, удостоєним премії ім. чл.-кор. НАН України Белоуса Аполлона Максимовича, вручається диплом встановленого зразка на засіданні Вченої ради інституту.

Розмір премії встановлює директор ІПКіК НАН України в залежності від позабюджетного фінансування, але не менше 250 грн.

У конкурсі можуть брати участь наукові співробітники, стажери-дослідники, аспіранти ІПКіК (включно і аспіранти зарубіжних країн, які навчаються в аспірантурі ІПКіК НАН України), інших установ і наукових закладів України, а також співробітники і аспіранти кафедри кріобіології ЮНЕСКО віком не старше 35 років.

Право висувати кандидатів на здобуття премії надається відділам інституту, кафедрі кріобіології ЮНЕСКО, секціям Вченої ради інституту, іншим установам і науковим закладам України, академікам і чл.-кор. НАН України.

Структура, яка висунула роботу на здобуття премії, не пізніше 15 грудня представляє директору ІПКіК НАН України для передачі в комісію по роботі з науковою молоддю:

- а) обґрунтоване подання, яке включає наукову характеристику роботи та коротку анотацію;
- б) опубліковану наукову роботу (серію робіт), матеріали наукового дослідження або винаходу у 2-х примірниках;
- в) конкретну довідку про творчий внесок у працю кожного з авторів роботи;
- г) рецензії провідних учених у галузі кріобіології і кріомедицини;
- д) відомості про автора: прізвище, ім'я, по батькові, рік і місце народження, місце роботи, посада.

Усі матеріали, які подаються на конкурс, повинні бути з написом "На здобуття премії ім. чл.-кор. НАН України Белоуса Аполлона Максимовича для молодих вчених" і відповідним чином оформлені: роботи (неопубліковані) підписують автори, довідки і рекомендації — завідувачі відділами (координатори кафедри), відповідальні особи інших установ і наукових закладів України та скріплюються печаткою відділу кадрів.

Матеріали на конкурс надсилати за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23, ІПКіК НАН України.



## К сведению специалистов в области трансплантологии и клеточной терапии

В 1997 г. на базе Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины создан Межведомственный Центр криобиологии и криомедицины под эгидой Министерства охраны здоровья, Национальной Академии и Медицинской Академии наук Украины.

В задачи Украинского Банка биологических объектов, который является структурной частью Межведомственного Центра, входят заготовка, подготовка к консервации, хранение и выдача в лечебные учреждения криоконсервированных клеток и тканей фетоплацентарного происхождения.

В Украинском Банке разработана система, разделяющая донора и реципиента на основе полной конфиденциальности и обеспечивающая соблюдение необходимых требований по безопасности используемых препаратов.

Для исключения бактериального загрязнения, а также инфицированности донора вирусами гепатита В и С, ВИЧ 1/2, герпеса, краснухи, цитомегаловирусом, а также сифилисом, токсоплазмозом и микоплазмозом производится тестирование материала с помощью методов полимеразной цепной реакции. Параллельно кровь донора тестируется на отсутствие антител к вышеуказанным вирусам.

Механизм действия клеточных и тканевых препаратов заключается в специфическом и неспецифическом влиянии трансплантатов, которые наряду с выполнением заместительной функции обладают полифармакологическими, мультимодальными свойствами.

Наличие в биологическом материале большого количества гормонов, ферментов, цитокинов, интерлейкинов, нейропептидов, которые находятся в сбалансированном состоянии, обеспечивает клинический эффект при лечении различной патологии.

Совместно с ведущими лечебными учреждениями Украины нами разработаны показания для применения клеточных и тканевых трансплантатов. Выраженный клинический эффект зарегистриро-

ван при лечении анемий различного генеза, ишемической болезни сердца, гипертонической болезни и атеросклероза, неспецифических артритов, патологии урогенитальной сферы и климакса у мужчин и женщин, заболеваний легких с выраженным астматическим компонентом, лечении больных с вялотекущими воспалительными процессами, снижения потенции и либидо.

Особого внимания заслуживает использование ряда тканевых препаратов в комплексном лечении диабета как терапии, направленной на снижение инсулинозависимости, лечении и профилактике сосудистых осложнений, в том числе при диабетической ретинопатии и диабетической стопе.

В акушерско-гинекологической практике получены отличные результаты при лечении угрозы прерывания беременности и иммунологическом конфликте, анемии, гипоксии и гипотрофии плода.

В геронтологической практике препараты используют как средства лечения преждевременного старения, повышения концентрации внимания и процессов запоминания, воспроизведения информации. Они повышают способность к приобретению и сохранению навыков, активизируют процессы умственной деятельности, что позволяет рекомендовать их использование при патологии нервной системы, в том числе у детей с болезнью Дауна, болезни Альцгеймера, Паркинсона, при нарушениях нервно-мышечной и нейровисцеральной передачи.

В настоящее время мы можем поставить криоконсервированные клетки эмбриональной печени и нервной ткани человека; фрагменты плаценты, тимуса; амниотическую и хориальную оболочки и ряд других биологических объектов.

Все препараты находятся на хранении в низкотемпературном хранилище Украинского Банка при температуре жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Адрес и контактный телефон Украинского Банка биологических объектов указаны в выходных данных журнала.

Научные редакторы В. И. Луговой, Т. Н. Юрченко  
Редактор Е. Д. Пазыч  
Компьютерный набор и верстка:  
И. Г. Пятигорская

Scientific Editors V. I. Lougovoy, T. N. Yurchenko  
Editor E. D. Pazych  
DTP-work by I. G. Pyatigorskaya



**ПРОБЛЕМЫ  
КРИОБИОЛОГИИ**

**4**

**PROBLEMS  
OF CRYOBIOLOGY**

**Индекс 74390**

**1999**

**Index 74390**

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. — "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Периодичность — четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

Журнал рассчитан на научных работников в области биологии и медицины, преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля, практиков, использующих методы воздействия холода на биологические объекты.

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are utmost importance with regard to preservation of plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

**Subscription orders should be addressed to**

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko

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

23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine

Tel. (0572) 72-41-43

Fax (0572) 72-00-84

E-mail: [cryo@online.kharkov.ua](mailto:cryo@online.kharkov.ua)