

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

ISSN 0233-7673

1 '91



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Грищенко (главный редактор), А. М. Белоус (зам. гл. редактора), С. И. Аксенов, Г. А. Бабийчук, М. Е. Бекер, Ю. П. Благой, Л. Вонг (Канада), А. Н. Гольцев, К. Дж. Грин (Великобритания), Г. Ф. Жегунов, В. И. Луговой, В. Я. Малеев, Г. Маттес (ФРГ), П. Мнержичка (ЧСФР), Е. Я. Панков, Ф. А. Приходько (отв. секретарь), Н. С. Пушкарь, Б. П. Сандомирский, А. С. Снурников, А. А. Цуцаева, С. А. Шалимов, Т. Н. Юрченко, Э. З. Эмирбеков

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Д. Бугров, В. Я. Волков, В. М. Горлиенко, 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

EDITORIAL BOARD

V. I. Grishchenko (Editor-in-Chief), A. M. Belous (Associated Editor), S. I. Aksenov, G. A. Babiychuk, M. E. Beker, Yu. P. Blagoj, L. Wang (Canada), A. N. Goltsev, C. J. Green (Great Britain), G. F. Zhegunov, V. I. Lugovoj, V. Ya. Maleyev, G. Matthes (FRG), P. Mérička (ČSFR), E. Ya. Pankov, F. A. Prikhodko, N. S. Pushkar, B. P. Sandomirsky, A. S. Snurnikov, A. A. Tsutsayeva, S. A. Shalimov, T. N. Yurchenko, E. Z. Emirbekov

EDITORIAL COUNCIL

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

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1991

ВСЕСОЮЗНЫЙ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1991

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Загоруйко Г. Е. Закономерности структурной перестройки стромы миокарда сусликов при адаптации к зимней спячке 3
- Юрченко Т. Н., Жуликова Е. П., Говоруха Т. П. Структурно-функциональные показатели клеток печени на этапах подготовки к криоконсервации 8
- Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Максумова У. П., Исмаилов С. И., Туракулов Я. Х. Экспрессия гена тиреоглобулина в клетках криоконсервированной щитовидной железы человека 13
- Тошакон В. Ю., Артамонов С. Д., Данилов М. А., Шестакова Н. К., Онищенко Н. А. Состояние изолированных гепатоцитов, выделенных из печени, подвергнутой гипотермической консервации в течение 18—24 часов 16
- Семенова Е. Г. Действие трипсина, версена и криопротекторов на внеплановый синтез ДНК в культуре в период подготовки к криоконсервации и после деконсервации 20

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Суббота Н. П., Грищенко В. И. Клетки и ткани плодов человека как источник криоконсервированного трансплантационного материала 25
- Джутте Н. Х. П. М., Хейсс П., Цейльмакер П. Х. Криоконсервация островков Лангерганса мыши, обезьяны и человека для трансплантации 30
- Сидякина Т. М., Лозицкая Н. Д. Жизнеспособность бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 при лиофилизации и криоконсервации в различных защитных средах 33
- Лопатина Н. В., Терентьев А. Н., Наталич Л. А. Экспериментальный подход к использованию теста «ускоренного хранения» для прогноза сроков годности живой сухой чумной вакцины 39
- Тихонова В. Л., Викторова В. П., Макеева И. Ю., Яшина С. Г. Влияние низких и сверхнизких температур хранения на лабораторную всхожесть семян дикорастущих травянистых растений. II. Семена видов *Campanula L.* (колокольчик) 43

КРИОГЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Дахно Ф. В., Грошевой М. И., Снурников А. С., Тельнюк В. Н. Современная аппаратура для криоконсервации эмбрионов млекопитающих 50

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Чуйко В. А., Карпенко Л. Г., Бондарева И. М., Пивненко И. В., Линевич В. В. Биохимические изменения в щитовидной железе и коре надпочечников после глубокого охлаждения до -196°C 54

ХРОНИКА

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

© Издательство «Наукова думка», «Проблемы криобиологии» 1991 г.

CONTENTS

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Zagoruyko G. E.</i> Peculiarities of structural changes in myocardial stroma of ground squirrels during adaptation to hibernation	3
<i>Yurchenko T. N., Zhulikova E. P., Govorukha T. P.</i> Structure-functional parameters of hepatocytes during preparation for cryopreservation	8
<i>Atakhanova B. A., Kadyrova D. A., Maksumova U. P., Ismailov S. I., Turakulov Ya. Kh.</i> Expression of the thyroglobulin gene in cryopreserved cells of human thyroid gland	13
<i>Toshchakov V. Yu., Artamonov S. D., Danilov M. A., Shestakova N. K., Onishchenko N. A.</i> The state of hepatocytes isolated from the liver subject to hypothermal preservation for 18 to 24 hours	16
<i>Semenova E. G.</i> The effects of Trypsinum, Versene, and cryoprotectants on the unscheduled DNA synthesis in cell culture during preparation for cryopreservation and after thawing	20

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Subbota N. P., Grishchenko V. I.</i> Human fetal cells and tissues as a source of cryopreserved material for transplantation	25
<i>Jutte N. H. P. M., Heijse P., Bruining G. J., Zeilmaker G. H.</i> Cryopreservation of mouse, monkey and human islets of Langerhans for transplantation purpose	30
<i>Sidyakina T. M., Lozitskaya N. D.</i> The viability of bacteria <i>Pseudomonas denitrificans</i> BKM-892 subject to lyophilization and cryopreservation in different protective media	33
<i>Lopatina N. V., Terentyev A. N., Natalich L. A.</i> Experimental approach to use the accelerated storage test for estimation of the shelf-life of alive lyophilized plaque vaccine	39
<i>Tikhonova V. L., Victorov V. P., Makeyeva I. Yu., Yashina S. G.</i> The effect of low and superlow storage temperatures on the laboratory germination ability of wild grass seeds. II. Seeds of <i>Campanula L.</i> (bluebell)	43

CRYOGENIC EQUIPMENT

<i>Dakhno F. V., Groshevoy M. I., Snurnikov A. S., Telnuk V. N.</i> Modern equipment for cryopreservation of mammalian embryos	50
--	----

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Chuyko V. A., Karpenko L. G., Bondareva I. M., Pivnenko I. V., Linevich V. V.</i> Biochemical changes in thyroid gland and adrenal cortex caused by deep freezing to -196°C	54
--	----

CHRONICLE

DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:

310015, Харьков, 15,
ул. Переяславская, 23,
тел. 72-10-39

Научный редактор А. М. Белоус

Редактор З. В. Линевиц

Технический редактор В. Н. Волкова

Сдано в набор 16.10.90. Подп. в печать 21.12.90 г. Формат $70 \times 108^{1/16}$. Бум. тип. № 1. Выс. печ. Усл. печ. л. 4,9. Усл. кр. отт. 5,6. Уч. изд. л. 5,52. Тираж 1000 экз. Зак. 411. Цена 1 р.20 к. Отпечатано с матриц Харьковской книжной фабрики им. М. В. Фрунзе в Харьковской типографии № 16. 310003. Харьков-3, ул. Университетская, 10. Зак. 10,9

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

УДК 591.415 : 611.12 : 611.3/16

Г. Е. Загоруйко

ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТРУКТУРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ СТРОМЫ МИОКАРДА СУСЛИКОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К ЗИМНЕЙ СПЯЧКЕ

Методами стереологического и морфометрического анализа установлено, что адаптация к холоду, к сниженной функциональной нагрузке на миокард сусликов в условиях зимней спячки осуществляется путем: 1) снижения содержания жидкости во внеклеточном веществе и одновременно увеличения в нем количества хлопьевидного и филаментозного материала, что способствует повышению вязкости и холодовой устойчивости соединительной ткани миокарда; 2) уменьшения капиллярного кровотока вследствие сужения просветов микрососудов и элиминации определенного количества эндотелиоцитов капилляров. Активация фибробластов и интенсификация процессов фибриллогенеза коллагена соединительной ткани способствует повышению жесткости и механической прочности миокарда при резком увеличении функциональной и гемодинамической нагрузки на сердечно-сосудистую систему в периоды спонтанного пробуждения сусликов.

Раскрытие сущности адаптации животных к холоду и возможность искусственно вызывать состояние гипобיוза при глубокой общей гипотермии имеют большое практическое значение для криобиологии и медицины. Полученные знания позволяют предложить методы пролонгированной холодовой консервации органов и тканей с целью их последующей трансплантации, разработать стратегию онтогенетической акклиматизации человека к холоду [1, 9, 11]. Однако на пути широкого внедрения различных форм глубокой гипотермии в клиническую практику имеются существенные трудности и, в первую очередь, гипотермическое нарушение сердечной деятельности вплоть до фибрилляции желудочков сердца и асистолии [8]. В связи с этим уникальная способность сердца гетеротермных животных продолжительно функционировать при температуре тела 0—4 °С в период зимней спячки привлекает внимание к этому феномену исследователей различных специальностей, в том числе биохимиков, физиологов, морфологов [6, 12]. В настоящее время методами стереологии и морфометрии показано, что в период зимней спячки наблюдается атрофия миокарда краснощеких сусликов и регрессия массы сердца [7]. Однако компенсаторно-приспособительные реакции, развивающиеся в стромах миокарда сусликов при адаптации животных к зимней спячке, изучены мало. Этому аспекту проблемы адаптации к холоду посвящено данное морфологическое исследование.

В экспериментах были использованы половозрелые длиннохвостые суслики (*Citellus undulatus*). Электронно-микроскопически исследовали миокард левого желудочка активных животных (май-июль) — 5 самцов и сусликов, находившихся в состоянии оцепенения в период зимней спячки (декабрь-январь), — 5 самцов. Наркотизированных (активных) сусликов декапитировали. Участки миокарда среднего слоя средней зоны свободной стенки левого желудочка фиксировали погружением в 2,5 %-ный раствор глутаральдегида, постфиксировали в 2 %-ном растворе OsO_4 , обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заключали в эпон и аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали [10] и просматривали в электронном микроскопе ЭМВ-100АК. Морфометрические измерения проводили с помощью механического устройства [4] на негативах, полученных при постоянном увеличении 2000. Использовали тестовые системы точек ($N_1 = 384$, $N_2 = 600$). Определяли объемные доли паренхимы V_v^n , строма миокарда $V_v^{\text{стр}}$.

This One



клеток соединительной ткани (фибробласты, перициты) V_v^{kst} , внеклеточного вещества соединительной ткани (аморфный, фибриллярный компоненты) V_v^{vb} , капилляров V_v^{kap} , просвета капилляров V_v^{pk} . На 1,0 мм² площади срезов миокарда определяли среднее число сечений ядер клеток соединительной ткани $N_{я}^{kst}$, эндотелиоцитов капилляров $N_{я}^{kap}$. Кроме того, определяли среднюю площадь срезов ядер и цитоплазмы клеток соединительной ткани $S_{я}^{kst}$, $S_{ц}^{kst}$, ядер и цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров $S_{я}^{kap}$, $S_{ц}^{kap}$. В полученных выборках морфометрических измерений определяли стабилизированные значения эмпирических средних и ошибку средней [5].

В стромальном компоненте миокарда активных сусликов (май-июль) выявляются многочисленные открытые функционирующие капилляры, образованные одной или несколькими эндотелиальными клетками. Ядра эндотелиоцитов (Эн) вытянуты вдоль просвета микрососудов, содержат одно, реже — два ядрышка и многочисленные глыбки гетерохроматина, расположенного преимущественно маргинально вдоль ядерной оболочки. Мелкодисперсный эухроматин определяется в центральной зоне ядер. В открытых капиллярах маргинальные участки цитоплазмы Эн истончены. Люминальная поверхность клеток преимущественно гладкая, иногда умеренно волнистая, образует отдельные короткие извитые микроворсинки, выступающие в просвет капилляра. Вдоль аблюминальной поверхности Эн выявляется тонкая базальная мембрана, вблизи которой со стороны интерстиция расположены различной формы и длины отростки фибробластов, иногда глубоко проникающие в межклеточное пространство соприкасающихся кардиомиоцитов, пучки коллагеновых фибрилл. К базальной мембране некоторых капилляров примыкают перициты, содержащие крупное ядро, в котором гетерохроматин также расположен преимущественно вдоль боковой поверхности ядерной оболочки. «Закрытые» капилляры уплощены, имеют суженный просвет. Цитоплазма спавшихся Эн капилляров «гофрирована» и образует инвагинации, выступающие в просвет микрососудов.

Межклеточное пространство в паренхиме миокарда существенно увеличено в местах расположения артериол, венул, крупных транзиторных капилляров за счет прослоек соединительной ткани. Обменные мелкие капилляры часто открыты и расположены в непосредственной близости от кардиомиоцитов. Внеклеточное вещество соединительной ткани осмиефобно. В нем определяются коллагеновые фибриллы, их пучки, а также мелкодисперсные образования, вероятно, гликозоаминогликаны. Сложноорганизованный внеклеточный матрикс — фибриллярный компонент соединительной ткани — играет важную роль в поддержании формы, модуляции контрактных сил, расслаблении сердечной мышцы. Некоторые пучки коллагеновых фибрилл, их концевые участки, погружены в базальные мембраны кардиомиоцитов и сосудов гемо-, лимфомикроциркуляторного русла. Из клеточных элементов соединительной ткани в стромах миокарда чаще всего определяются фибробласты с умеренно развитой цитоплазмой и многочисленными отростками.

В стромальном компоненте миокарда сусликов, находящихся в состоянии оцепенения в период зимней спячки (декабрь-январь), выявляются преимущественно закрытые уплощенные капилляры (рис. 1), в просвете которых редко встречаются эритроциты. Люминальная поверхность Эн «малоактивных» капилляров образует многочисленные различной величины и формы складки, гребни. В цитоплазме краевых участков клеток определяется большое количество мелких светлых везикул, образующих часто регулярные структуры — ряды непрерывных цепочек из пузырьков, ориентированных вдоль капиллярного русла. В цитоплазме Эн выявляются многочисленные гранулы гликогена, светлые липидные капли, отдельные округлые миелиноподобные тельца. Аблюминальная поверхность Эн на значительном протяжении плотно примыкает к кардиомиоцитам. Базальная мембрана капилляров местами истончена и разрыхлена. Опреде-

ляется гетерогенность ультраструктуры ядер Эн. В одних ядрах содержание гетеро- и эухроматина примерно одинаково, в других — доминирует гетерохроматин. В период зимней спячки сусликов в капиллярном русле миокарда левого желудочка значительно увеличивается количество Эн, в ядрах которых доминирует гетерохроматин (рис. 2). Вероятно, ядра этих Эн находятся в S фазе клеточного цикла. В миокарде гибернирующих животных заметно

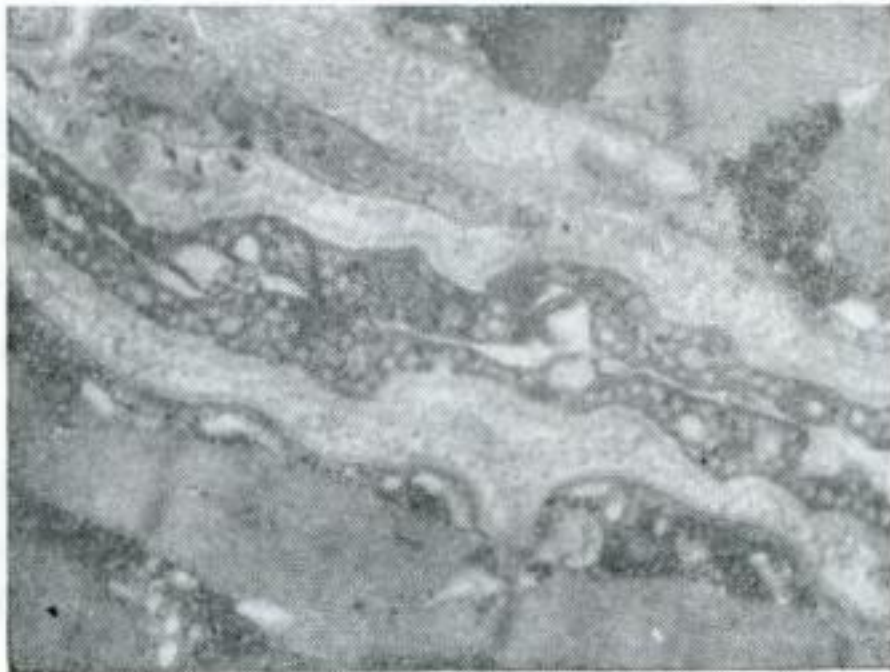


Рис. 1. Ультраструктура уплощенного закрытого капилляра в миокарде суслика, находящегося в состоянии зимней спячки. X 10 000

Рис. 2. Ультраструктура ядра эндотелиоцита закрытого капилляра в миокарде суслика, находящегося в состоянии зимней спячки. Увеличение содержания в ядре гетерохроматина. X 8000

уменьшается доля стромального компонента, вероятно, вследствие умеренной дегидратации. Во внеклеточном веществе соединительной ткани возрастает содержание фибриллярных структур, определяются небольших размеров липидные капли. Увеличивается количество пучков коллагеновых волокон, соединяющих друг с другом мышечные клетки сердца (рис. 3). Фибробласты находятся преимущественно в функционально активном состоянии.



Рис. 3. Ультраструктура кардиомиоцитов и пучков коллагеновых волокон, соединяющих друг с другом мышечные клетки сердца. X 8000.

Рис. 4. Ультраструктура фибробласта с морфологическими признаками высокой метаболической активности в миокарде зимоспящего суслика. X 8000.

В этих клетках наблюдается увеличение объема цитоплазмы, в которой возрастает содержание элементов гранулярной эндоплазматической сети, митохондрий, мелких везикулярных структур (рис. 4). Вдоль боковой поверхности активно функционирующих фибробластов со стороны интерстиция увеличено содержание хлопьевидного и филаментозного материала. Определяются многочисленные тонкие, хаотично расположенные короткие филаменты, которые постепенно увеличиваются в размерах по мере отдаления от фибробластов. Эти данные свидетельствуют о том, что в период зимней спячки

в строме миокарда сусликов возрастает количество фибробластов с высокой метаболической активностью, развитым аппаратом биосинтеза белка и активизируются процессы фибриллогенеза коллагена.

Проведенный стереологический и морфометрический анализ позволил выявить некоторые закономерности структурной перестройки элементов стромы миокарда сусликов при адаптации животных к зимней спячке (таблица). В условиях гибернации уменьшается объемная доля стромы миокарда с 20,0 до 18,50 %. Эта убыль, вероятно, обусловлена умеренной дегидратацией внеклеточного вещества соединительной ткани, объемная доля которого уменьшается с 11,0 до 9,50 %, и увеличением относительного объема паренхимы миокарда с 80,00 до 81,50 %. В пределах погрешности измерений ($m = \pm 0,50$ %) остается постоянной суммарная величина объемных долей капилляров и клеточных элементов соединительной ткани: $9,0 \% = (V_{\text{кап}} + V_{\text{кст}})$. В количественном выражении для стромы миокарда летних животных: $9,20 \% = (7,0 + 2,20) \%$, для гибернирующих животных соответственно $8,90 \% = (4,20 + 4,70) \%$. Следовательно, сезонные биоритмы изменений этих структур характеризуются следующей закономерностью. Рост относительного объема капилляров сопровождается убылью объемной доли клеток соединительной ткани и наоборот, но так, что их суммарный относительный объем остается постоянным. Существенные изменения выявлены в структурной организации капиллярного русла миокарда гибернирующих сусликов. В состоянии холодового оцепенения объемная доля капилляров уменьшается с 7,0 до 4,20 %. Эти изменения обусловлены уменьшением объемной доли просвета микрососудов с 4,20 до 2,20 % и убылью общего числа Эн капилляров, вероятно, вследствие их десквамации.

Результаты стереологического и морфометрического исследования миокарда сусликов в разные сезоны года ($M \pm m$)

Показатели структурной организации миокарда	Животные активные, лето	Животные в состоянии зимней спячки
Стереологическая характеристика структурно-функциональных компонентов миокарда		
Объемная доля V_v , %:		
мышечного компонента	$80,0 \pm 0,50$	$81,50 \pm 0,50$
стромального компонента	$20,0 \pm 0,50$	$18,50 \pm 0,50$
соединительнотканых клеток	$2,20 \pm 0,30$	$4,70 \pm 0,30$
внеклеточного вещества соединительной ткани	$11,0 \pm 0,50$	$9,50 \pm 0,50$
капилляров	$7,0 \pm 0,50$	$4,20 \pm 0,50$
просвета капилляров	$4,80 \pm 0,50$	$2,20 \pm 0,50$
Морфометрическая характеристика структурно-функциональных компонентов миокарда		
Число сечений ядер клеток на $1,0 \text{ мм}^2$ суммарной площади срезов миокарда, N , мм^{-2} :		
соединительнотканых клеток	409 ± 50	361 ± 50
эндотелиоцитов капилляров	754 ± 50	469 ± 50
Средняя площадь срезов S , мкм^2 :		
ядер клеток соединительной ткани	$17,30 \pm 2,0$	$27,00 \pm 2,0$
цитоплазмы клеток соединительной ткани	$37,70 \pm 2,0$	$104,40 \pm 2,0$
ядер эндотелиоцитов капилляров	$12,14 \pm 2,0$	$18,80 \pm 2,0$
цитоплазмы эндотелиоцитов капилляров	$18,10 \pm 2,0$	$22,14 \pm 2,0$

На это указывают данные значительного уменьшения числа сечений ядер Эн капилляров в миокарде гибернирующих животных с 754 до 469 мм^{-2} . Однако редукция капиллярного русла миокарда спящих сусликов (уменьшается количество Эн) сопровождается компенсаторной гипертрофией ядра и цитоплазмы оставшихся клеток сосудистого эндотелия. В условиях зимней спячки средняя площадь сечений ядер Эн капилляров возрастает с 12,14 до 18,80 мкм^2 , а средняя площадь срезов цитоплазмы — с 18,10 до 22,14 мкм^2 . Вероятно, увеличение объема ядер Эн капилляров обусловлено их полипло-

идизацией, сопровождающейся ростом количества глыбок гетерохроматина в ядрах этих клеток. В миокарде гибернирующих сусликов увеличивается содержание фибробластов с высокой метаболической активностью, возрастает относительный объем соединительнотканых клеток с 2,20 до 4,70 %. Этот прирост обусловлен в основном гипертрофией фибробластов, увеличением объема этих клеток. Если у активных животных средняя площадь срезов ядер соединительнотканых клеток составляет 17,30 мкм², цитоплазмы — 37,70 мкм², то у спящих сусликов цифровые значения этих показателей возрастают соответственно до 27,00 и 104,40 мкм². Наблюдается преимущественная гипертрофия цитоплазмы клеток соединительной ткани. Увеличение содержания в строме коллагеновых волокон вследствие интенсификации белковосинтетической деятельности фибробластов обусловлено необходимостью повышения жесткости и механической прочности миокарда гибернирующих сусликов. Это объясняется тем, что в периоды кратковременного спонтанного пробуждения и самосогревания животных увеличивается частота сердечных сокращений с 5—10 до 350—400 уд/мин [3] и резко возрастает гемодинамическая и функциональная нагрузка на сердце.

Результаты проведенных исследований позволили выявить следующие компенсаторно-приспособительные процессы, развивающиеся в стромальном компоненте миокарда сусликов, находящихся в состоянии оцепенения в период зимней спячки:

- уменьшение объемной доли стромы происходит, вероятно, за счет процесса дегидратации внеклеточного вещества соединительной ткани и увеличения относительного объема мышечного компонента миокарда;

- редукция гемомикроциркуляторного русла миокарда вследствие элиминации определенного количества Эн вызывает полиплоидизацию ядер и гипертрофию оставшихся Эн капилляров;

- активация фибробластов и интенсификация процессов фибриллогенеза коллагена соединительной ткани способствует повышению жесткости и механической прочности миокарда при резком увеличении функциональной и гемодинамической нагрузки на сердечно-сосудистую систему в периоды спонтанного пробуждения сусликов.

Адаптация к холоду, к сниженной функциональной нагрузке на миокард животных в условиях зимней спячки осуществляется:

- снижением содержания жидкости во внеклеточном веществе и, одновременно, увеличением в нем количества хлопьевидного и филаментозного материала, что способствует повышению вязкости и холодовой устойчивости соединительной ткани миокарда;

- уменьшением капиллярного кровотока вследствие сужения просветов спавшихся микрососудов и элиминации определенного количества Эн капилляров;

- уменьшением скорости кровотока в спавшихся капиллярах миокарда, что способствует более полной диффузии кислорода эритроцитов из микрососудов в мышечную ткань сердца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобков Г. А., Иоффе Л. А. Концептуальное представление онтогенеза системы терморегуляции // Теория и практика физ. культуры. — 1988. — № 11. — С. 38—40.
2. Жегунов Г. Ф. Электрофизиологические параметры функционирования сердца сусликов *Citellus undulatus* в процессе пробуждения от зимней спячки // Криобиология. — 1986. — № 1. — С. 31—34.
3. Жегунов Г. Ф. Электрофизиологическая характеристика деятельности сердца и скорость синтеза белков кардиомиоцитов во время пробуждения сусликов из зимней спячки // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. — 1988. — 24, № 1. — С. 31—37.
4. Загоруйко Г. Е., Офицеров В. Н. Механическое устройство для морфометрического и ориентационного анализа биологических структур // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1979. — № 11. — С. 625—626.
5. Загоруйко Г. Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии. — Харьков: Б. и., 1986. — С. 11—14.

6. Колесникова Л. В., Непомнящих Л. М. Сезонные изменения кардиомиоцитов гетеротермных животных // Арх. анат.— 1984.— № 4.— С. 52—58.
7. Непомнящих Л. М., Колесникова Л. В., Непомнящих Г. И. Морфология атрофии сердца.— Новосибирск: Наука, 1989.— 312 с.
8. Сумбатов Л. А. Искусственная гипотермия.— М.: Медицина, 1985.— 84 с.
9. Bando Ko, Tago Mamoru, Teraoka Hiromichi et al. Extended cardiopulmonary preservation for heart-lung transplantation: a comparative study of superoxide dismutase // J. Heart Transplant.— 1989.— 8, N 1.— P. 59—66.
10. Daddow L. Y. M. An abbreviated method of the double lead stain technique // J. Submicrosc. Cytol.— 1986.— 18, N 1.— P. 221—224.
11. Fuller B. J. Temperature and Animal cells // Proc. Meet., Durham, 10—12 Sept., 1986 — Cambridge, 1987.— P. 341—362.
12. Rlika E., Zajicova A. The ultrastructure of cardiac muscle coat of intrapulmonary veins in the hibernating but (Myotis myotis) // Anat. Anz.— 1987.— 162, N 2.— P. 715—717.

Харьковский НИИ терапии

Поступила 25.01.90

G. E. ZAGORUYKO

PECULIARITIES OF STRUCTURAL CHANGES IN MYOCARDIAL STROMA OF GROUND SQUIRRELS DURING ADAPTATION TO HIBERNATION

Research Institute for Therapy of Kharkov of the UkrSSR, Ministry of Health, Kharkov

Adaptation to cold and decreased functional load on myocardium of ground squirrels during hibernation is carried out by the way of 1) decreasing the content of liquid in the extracellular space and simultaneous increasing the content of flaky and filamentous material, thus favoring an increase in viscosity and cold resistance of myocardium connective tissue, and by 2) decreasing the capillary blood flow due to decreasing the lumen of microvessels and elimination of definite quantity of capillary endotheliocytes. The activation of fibroblasts and intensification of fibrillogenesis of connective tissue collagen favors an increase in rigidity and mechanical strength of myocardium upon sharp increase of the functional and hemodynamic load on the cardiovascular system during spontaneous arousals of ground squirrels.

УДК 612.351.1.014.43

Т. Н. Юрченко, Е. П. Жуликова, Т. П. Говоруха

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ НА ЭТАПАХ ПОДГОТОВКИ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Работа посвящена исследованию структурно-функционального состояния клеток печени при гипотермическом хранении (4 °С) ее фрагментов. Установлено, что гипотермическое хранение печени вызывало через 3 ч повышение значений активности гликолитических ферментов, что сопровождалось изменением ультраструктуры клеток в виде расширения канальцев эндоплазматической сети, просветлении митохондриального матрикса, иногда с участками деструкции их мембран. Отмечено также увеличение площади гетерохроматина, митохондрий и эндоплазматической сети.

Поиски оптимальных условий хранения тканей, в связи с реальными предпосылками для трансплантации печени как целостного органа, так и в виде диспергированных клеток для лечения ряда патологических состояний, неразрывно связаны с выяснением структурно-функциональных изменений, развивающихся при охлаждении в биологических объектах. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение структурно-функционального состояния клеток печени при гипотермическом (4 °С) хранении фрагментов печени.

Объектом исследования служила печень беспородных белых крыс самцов массой тела 180—200 г. После декапитации животных фрагменты печени (0,5 × 0,5 × 0,2 см) помещали во влажную камеру при температуре 4 °С на срок хранения — 3 часа. Контролем была печень интактных крыс.

Обзорное изучение структуры печени крыс было проведено на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Для изучения характера и степени выраженности развивающихся повреждений при действии гипотермии были изучены содержание и характер распределения в цитоплазме гепатоцитов гранул гликогена с помощью ШИК-реакции. Контролем служили препараты, предварительно инкубированные в растворе диастазы [7]. Гистоэнзимологическое исследование печени проводили на криостатных (температура камеры криостата — 20 °С) срезах толщиной 10 мкм. При определении активности изучаемых ферментов нами производились соответствующие контрольные исследования [2].

Поскольку основным повреждающим фактором при выделении и хранении биологического объекта является гипоксия, то в первую очередь изменения наступают в состоянии окислительно-восстановительного потенциала клетки [3]. В связи с этим изучение окислительно-восстановительных ферментов имеет непосредственное отношение к выяснению характера действия охлаждения на функциональное состояние ткани в целом, и гепатоцитов в частности, цитохимически определялась активность ЛДГ, СДГ, α -ГФДГ. Выбор перечисленных выше ферментов определялся их участием в различных звеньях внутриклеточных обменных процессов, а также локализацией в различных структурных компонентах клетки: цитоплазме, митохондриях.

В связи с различием в распределении ряда биологически активных веществ в центре и по периферии дольки [7] центролобулярным и периферическим гепатоцитам присущи особенности расположения метаболически активных веществ и реакций внутриклеточных структур. Нами было выделено две зоны для исследования — центральная и периферическая области дольки печени. Этапы препарирования объектов для электронно-микроскопического исследования осуществляли по общепринятой методике [6]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме УМТП-3 и контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата по Рейнольдсу. Срезы просматривали и фотографировали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100 БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Морфометрический анализ структурной организации гепатоцитов проведен на негативах с использованием микропроцессорного анализатора графической информации (МАГИ), с помощью которого определяли площадь следующих внутриклеточных структур: ядра, ядрышек, гетерохроматина, митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом. Статистическую обработку данных проводили на микроЭВМ-ДЗ-28.

Оценка интенсивности реакции на гликоген производилась по четырехбалльной системе. Средний гистохимический коэффициент выводился по формуле [8]: $СГК = \frac{2a+2b+1c+0d}{100}$, где $a—d$ означает количество клеток с определенной интенсивностью реакции, цифры (3—0) — степень интенсивности окрашивания, 100 — общее количество подсчитанных клеток. Достоверность полученных данных не ниже 95 % (по методу Стьюдента).

Учет интенсивности гистохимических реакций производили на микро-спектрофотометре МУФ-5 плаг-методом и выражали в условных оптических единицах.

Полученный цифровой материал подвергался статистической обработке и дисперсионному анализу на ЭВМ. Объем фотометрических измерений для каждой выборки чисел (500 измерений) определяли по методу, описанному в литературе [1].

Статистическую обработку результатов фотометрического анализа проводили на ЭВМ СМ-1 на языке Фортран. Определение статистических показателей: среднего значения — $\bar{x}$; среднеквадратического отклонения — σ ; ошибки репрезентативности среднего значения — $\sigma_{\bar{x}}$; критерия достоверности $\bar{x}$; уровня значимости $\bar{x}$; доверительного интервала $\bar{x}$ на уровне значимости 0,95.

Исходная ткань печени имела типичное гистологическое строение. При хранении кусочков печени при температуре 4 °С в течение 3 ч отмечено появление небольшого количества набухших и вакуолизированных гепатоцитов с просветленными ядрами.

В исходной ткани печени содержание гликогена составило $2,80 \pm 0,03$, он располагался в цитоплазме клеток без видимой закономерности, заполняя всю клетку или только часть ее. Включения гликогена имели форму зерен различной величины. При этом была четко выражена зональность реакции: в гепатоцитах вокруг центральных вен количество гликогена выше, чем по периферии дольки.

Через 3 ч хранения при температуре 4 °С достоверных различий в содержании гликогена не наблюдалось. Гранулы гликогена располагались

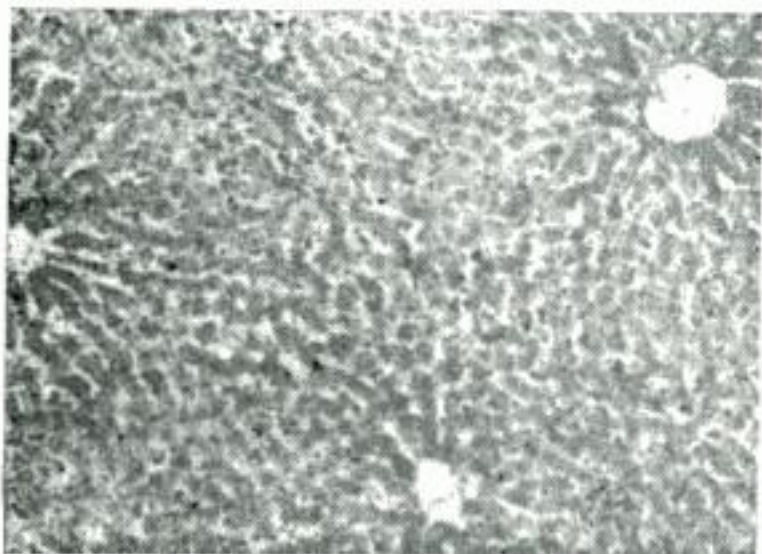


Рис. 1

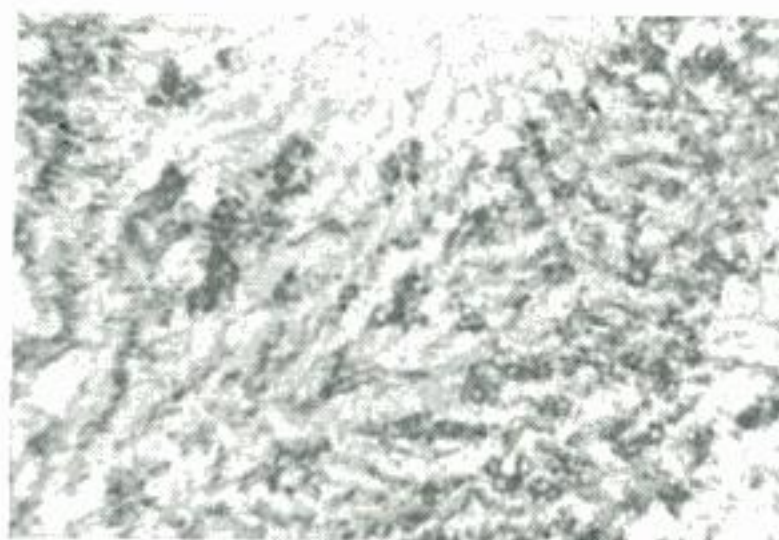


Рис. 2

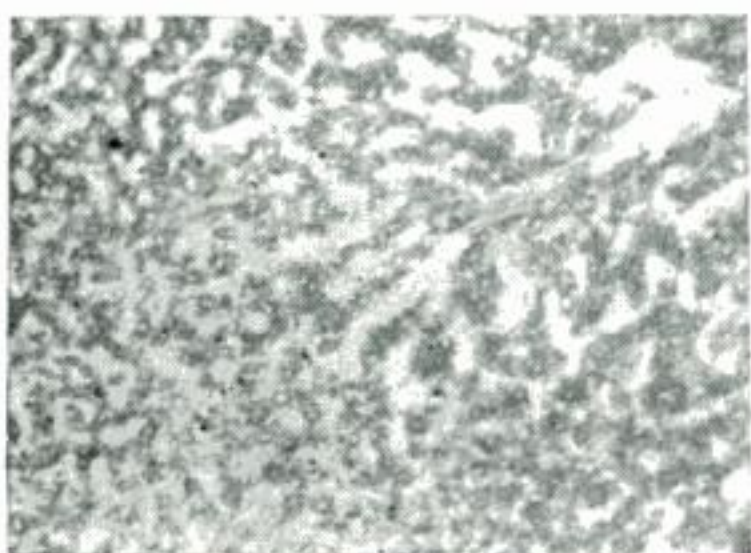


Рис. 3

Рис. 1. Содержание гликогена в гепатоцитах крысы через 3 ч хранения печени при 4 °С. ШИК-реакция. Увеличение: об. 10; ок. 7

Рис. 2. α-Глицерофосфатдегидрогеназа в гепатоцитах крысы через 3 ч хранения печени при температуре 4 °С. Увеличение: об. 10; ок. 7

Рис. 3. Сукцинатдегидрогеназа в гепатоцитах крысы через 3 ч хранения печени при температуре 4 °С. Увеличение: об. 10; ок. 7

диффузно по всей цитоплазме гепатоцитов, сохранялась зональность расположения ШИК-позитивных веществ. В отдельных клетках в цитоплазме выявлялись крупные гранулы гликогена (рис. 1).

При изучении активности окислительно-восстановительных ферментов в исходной ткани активность ЛДГ в цитоплазме клеток была умеренной и составляла $45,25 \pm 0,43$ (центр дольки печени), а на периферии дольки печени была равна $44,50 \pm 0,74$. Через 3 ч хранения было выявлено повышение накопления диформаза в цитоплазме клеток, которая составляла в центре дольки — $60,33 \pm 0,66$, по периферии ее — $50,88 \pm 1,01$.

В клетках интактной ткани печени активность α-ГФДГ составляла: в гепатоцитах центральных отделов дольки — $26,98 \pm 0,24$, по периферии дольки активность фермента была несколько выше и составляла $34,7 \pm 0,62$ (рис. 2). Через 3 ч отмечалось достоверное повышение значений до $38,07 \pm 0,63$ (центр дольки), а в гепатоцитах по периферии дольки активность α-ГФДГ оставалась без значимых изменений и составляла $34,78 \pm 0,31$.

В интактной печени активность СДГ в гепатоцитах центральных отделов была равна $26,87 \pm 0,55$, а на периферии дольки — достоверно выше и составляла $37,06 \pm 0,65$. Через 3 ч активность СДГ достоверно повышалась в гепатоцитах в центре дольки печени до $38,83 \pm 0,28$ и незначительно повышалась, $37,06 \pm 0,65$, в цитоплазме клеток, располагавшихся на периферии дольки (рис. 3).

Сравнительное изучение содержания окислительно-восстановительных ферментов в центральных и периферических отделах долек печени показало, что достоверные различия в ткани интактной печени наблюдались в содержании α -ГФДГ и СДГ.

При этом на периферии долек печени значения активности α -ГФДГ и СДГ выше, чем в центральных отделах. Активность ЛДГ в интактной ткани не имела достоверных различий между центром и периферией дольки печени.

Через 3 ч гипотермического хранения определялось достоверное повышение уровня цитохимической реакции гликолитических ферментов (ЛДГ и α -ГФДГ) в гепатоцитах как центральных, так и периферических отделов дольки печени. При этом активность исследуемых ферментов в гепатоцитах центральных отделов дольки печени выше, чем на периферии.

Активность маркера митохондрий СДГ через 3 ч повышалась, при этом различия в количественном уровне активности фермента в клетках

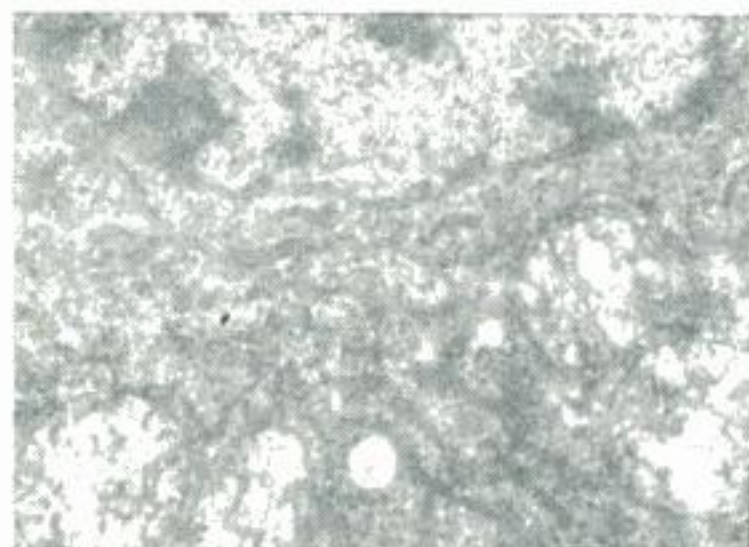


Рис. 4. Ультраструктура цитоплазмы гепатоцита в норме. Многочисленные митохондрии различной величины и формы: с матриксом средней электронной плотности. X 12 000

Рис. 5. Ультраструктура цитоплазмы гепатоцита после гипотермического (4 °C) хранения. Нарушение мембран эндоплазматической сети с формированием тяжевидных образований из свободных рибосом и полирибосом. Просветление матрикса митохондрий. X 14 000

центральных и периферических отделов дольки печени были достоверны. Таким образом, в большинстве случаев изменения активности ферментов в центральной и периферической зонах дольки паренхимы печени однонаправлены при сохранении различий в зависимости от локализации клеток. Это может быть подтверждением относительности деления гепатоцитов на «периферические» и «центральные».

По данным электронно-микроскопических исследований, гепатоциты в норме характеризуются полигональной формой, ограничены четкой плазмалеммой и тесно связаны между собой при помощи плотных контактов и десмосом. Поверхность гепатоцита, граничащая с вокругсинусоидным пространством, имеет многочисленные микроворсинки. Ядра округлой или овальной формы с ровным контуром. Диффузный хроматин рассеян по всей нуклеоплазме, глыбчатые скопления его наблюдаются по периферии ядрышка, на внутренней ядерной мембране и в виде небольших островков располагается по всему объему ядра. Ядрышко, имеющее глобулярно-фибрилярную структуру, располагается в центре или несколько эксцентрично.

В цитоплазме гепатоцитов зернистая эндоплазматическая сеть представлена узкими каналцами, окружающими митохондрии с параллельными цистернами, которые сосредоточены, главным образом, в околоядерной зоне. Незернистая эндоплазматическая сеть, в виде небольших пузырьков и сравнительно коротких трубочек, рассеяна по всей цитоплазме. Большинство митохондрий округлой или овальной формы. В мелкогранулярном матриксе, средней электронной плотности, расположены слабовыраженные

кristы (рис. 4). Лизосомы ограничены одноконтурной мембраной и заполнены мелкозернистым содержимым. В гиалоплазме также определяются глобулярные и везикулярные структуры.

После гипотермического хранения ультраструктура ядер гепатоцитов также характеризуется округлой или овальной формой и ровным контуром. Определяются четкие контуры наружной и внутренней ядерных мембран. Глыбчатые скопления хроматина располагаются по всему объему ядра.

В отличие от нормы, в цитоплазме канальцы зернистой эндоплазматической сети расширены и заполнены хлопьевидным материалом умеренной электронной плотности, нарушается структура мембран эндоплазматической сети, в результате обнаруживаются скопления свободных рибосом и полирибосом (рис. 5). Часто определяются митохондрии с просветленным матриксом (рис. 5), иногда с участками деструкции наружной и внутренней мембран.

Значения морфометрических показателей внутриклеточных структур гепатоцитов после гипотермического (4° С) хранения

Морфометрические показатели	Норма	После гипотермического хранения	P
Ядро	28,78 ± 0,71	30,20 ± 0,57	> 0,05
Ядрышко	1,21 ± 0,05	1,30 ± 0,06	> 0,05
Гетерохроматин	6,50 ± 0,27	7,32 ± 0,29	< 0,05
Митохондрии	0,43 ± 0,01	0,57 ± 0,02	< 0,05
Эндоплазматическая сеть	0,89 ± 0,05	1,08 ± 0,05	< 0,05
Лизосомы	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,02	> 0,05

На основании анализа морфометрических показателей ультраструктур гепатоцитов сделан вывод, что после 3-х часов гипотермического хранения печени площадь ядер, ядрышек и лизосом значительно не изменяются. В то же время отмечено увеличение площади гетерохроматина, митохондрий и эндоплазматической сети (таблица).

Таким образом, к 3-м часам гипотермического (4 °С) хранения фрагментов печени происходит незначительное увеличение числа клеток с начальными проявлениями деструктивных изменений.

ВЫВОД

Гипотермическое хранение (4 °С) фрагментов выделенной печени вызывало через 3 ч повышение значений активности гликолитических ферментов, что сопровождалось незначительным изменением ультраструктуры клеток в виде расширения эндоплазматической сети и набухания митохондрий. Этот факт может свидетельствовать о сохраняющихся внутриклеточных гомеостатических процессах на ранних этапах хранения в условиях гипотермии.

Изложенное позволяет считать, что в пределах исследуемого интервала времени при описанных условиях хранения клетки печени сохраняют достаточный уровень биологической полноценности, что не исключает возможность их дальнейшего использования в различных ситуациях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бродский В. Я. Трофика клиники. — М. : Наука, 1966. — 355 с.
2. Журавлева Т. Б., Прочуханов Р. А. Введение в количественную гистохимию ферментов. — М. : Медицина, 1978. — 244 с.
3. Коростовцева Н. В. Повышение устойчивости к гипоксии. — Л. : Медицина, 1976. — 165 с.
4. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. — М. : Изд-во иностр. лит., 1963. — 952 с.
5. Сороковой В. И., Владимиров Ю. А. Повреждение митохондрий при апоптозе // Биофизика. Молекулярная патология мембранных структур. — М., 1975., С. 12—55.
6. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. — М. : Мир, 1975. — 324 с.
7. Хэм А., Кормак Д. Патология. — М. : Мир, 1983, т. 4. — 245 с.
8. Astaldi G., Verga J. The glucogen content of the cells of lymphatic leucaemia. — Acta haematol. — 1957. — 17, № 3. — P. 129—135.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 16.02.89

T. N. YURCHENKO, E. P. ZHULIKOVA, T. P. GOVORUKHA

STRUCTURE-FUNCTIONAL PARAMETERS OF HEPATOCYTES DURING PREPARATION FOR CRYOPRESERVATION

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

The structure-functional state of liver cells subject to hypothermal storage (4 °C) was studied. It has been found that 3 hr hypothermal storage increases the activities of glycolytic enzymes with changing the cell ultrastructure reflected in broadening endoplasmic channels, lightening the mitochondrial matrix, sometimes with membrane destruction. An increase in area of heterochromatin, mitochondria and endoplasmic network was noted.

УДК 57.043 : 577.218 : 577.171.4

Б. А. Атаханова, Д. А. Кадырова, У. П. Максумова, С. И. Исмаилов, Я. Х. Туракулов

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА В КЛЕТКАХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Исследованы активность белоксинтезирующей системы и экспрессия гена ТГ в клетках криоконсервированной щитовидной железы, хранящихся в банке биопродуктов в течение 3 лет. Показано, что при хранении в течение 3 лет клетки щитовидной железы сохраняют 60 % своей белоксинтезирующей активности. Методом гибридизации ТГ к ДНК с поли-(А)-содержащей РНК клеток криоконсервированной щитовидной железы установлено уменьшение содержания ТГ мРНК в 2,3 раза. Таким образом, криоконсервированные щитовидные железы, сохраняемые в течение 3 лет, могут быть использованы для целей трансплантации.

Ранее нами было определено, что в процессе криоконсервации и деконсервации щитовидной железы ее белоксинтезирующая активность существенно не меняется [4]. Вместе с тем для подбора подходящих по иммунно- и тканеспецифичности доноров банк имеющихся в наличии криоконсервированных щитовидных желез часто недостаточен.

В связи с этим актуальным является вопрос о возможности использования желез, хранящихся в банке биопродуктов в течение 2—3 лет. Предварительно необходимо было удостовериться в том, что такие железы сохраняют функциональную активность. Учитывая, что более 60 % всех белков щитовидной железы приходится на долю тиреоглобулина (ТГ), представляло интерес выяснить, в какой мере длительное хранение криоконсервированных щитовидных желез отражается на имеющем первостепенное значение для тиреоидного гормоногенеза процессе биосинтеза ТГ.

С развитием технологии рекомбинатных ДНК для выяснения механизмов, осуществляющих регуляцию синтеза ТГ, существенным подспорьем явился метод гибридизации кДНК с РНК клеток.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании активности белоксинтезирующей системы и экспрессии гена ТГ в клетках криоконсервированной щитовидной железы (3 г. хранения).

Операционный материал получали в хирургическом отделении клиники Института краевой медицины Минздрава УзССР. Криоконсервированию подвергали щитовидные железы людей, удаленные при хирургическом вмешательстве по поводу диффузного токсического зоба. Криоконсервирование проводилось по методу, разработанному в Институте проблем криобиологии, и криомедицины АН УССР [5.] После удаления щитовидные железы разрезали на пластинки длиной 3—4 см, шириной 1 см, высотой 2—3 мм.

Кусочки железы погружали в раствор 10 %-ного димексида. Контролем служила незамороженная ткань диффузного токсического зоба людей.

Об интенсивности биосинтеза белков щитовидной железы судили по уровню включения меченых аминокислот в белки щитовидной железы. Компоненты белоксинтезирующего аппарата (рибосомы, белковые факторы трансляции, тРНК и аминоксил-тРНК-синтетазы) вносили в систему в виде фракции, получаемой центрифугированием гомогената клеток при 30000 *g* в течение 10 мин (фракция S_{30}). Для удаления аминокислот фракцию S_{30} непосредственно перед добавлением в систему пропускали через колонку с сефадексом Г-25. Концентрация фракции S_{30} в системе составляла 20 ед. D_{260} на 1 мл. Стандартная реакционная смесь содержала (в мкмоль/мл): АТФ — 0,5, ГТФ — 0,05, фосфоэнолпируват — 10, β -меркаптоэтанол — 0,5, $MgCl_2$ — 15, KCl — 70, *трис*-HCl (*pH* 7,8) — 50, пируваткиназу — 16 мкг. Смесь аминокислот (0,03 мкмоль/мл) состояла из 13 равномеченых ^{14}C -аминокислот и 7 немеченых аминокислот. Бесклеточную систему инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Реакцию останавливали быстрым охлаждением равного объема 10 % ТХУ, содержащей 0,1 % гидролизата лактальбумина. Контролем служили пробы, которые не подвергались инкубации. Через 18 ч пробы центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Осадки суспендировали в 5 % ТХУ, прогревали 15 мин при 90 °C для гидролиза аминоксил-т-РНК. После центрифугирования осадки суспендировали в 5 % ТХУ и переносили на нитроцеллюлозные ультрафильтры «Руфс» (Чехословакия) и отмывали 60 мл 5 % ТХУ. Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляторе (4 г *PPO*, 2 г *POPOP* на 1 л толуола) на счетчике «Марк-3». Статистическую обработку результатов проводили по Ойвину [3].

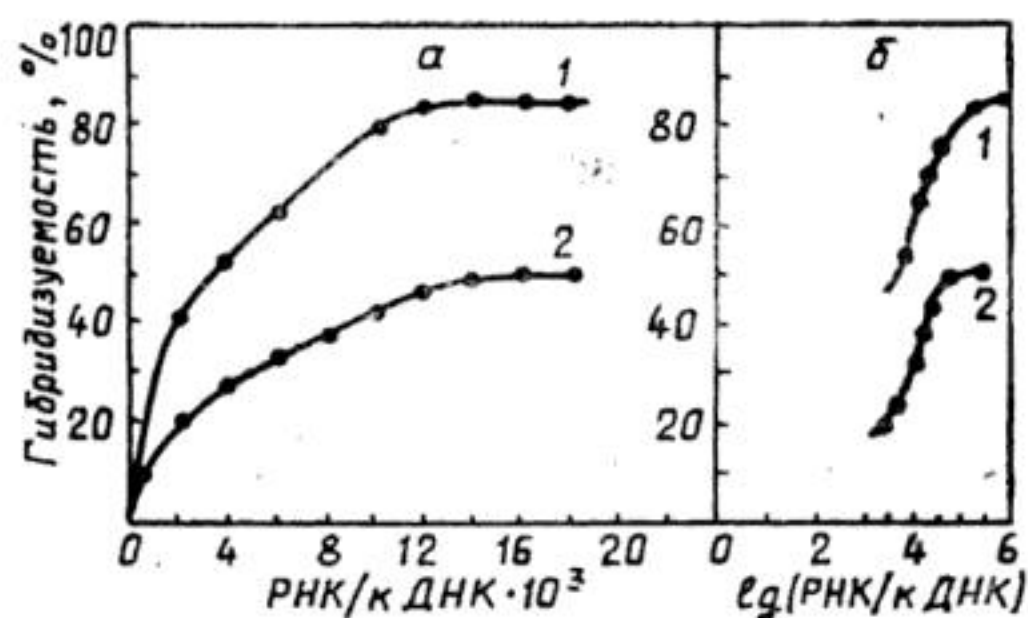
Суммарные полирибосомы клетки выделяли путем обработки гомогената 2 %-ным тритоном X-100 в присутствии ингибитора РНКазы 0,1 %-ного гепарина с последующим осаждением рибосомного материала при повышении концентрации ионов Mg^{2+} до 0,1 М [2]. Суммарную полисомальную РНК выделяли SDS-фенол-хлороформным методом. Поли-А-содержащую мРНК получали хроматографией суммарной полисомальной РНК на колонке с поли-У-сефарозой 4 В при 20 °C в буфере: 0,1 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М *трис*-HCl, *pH* 7,5, и 0,2 % SDS. Поли-А-содержащую мРНК элюировали при 45 °C 0,2 %-ным SDS. Электрофорез мРНК проводили в 1,5 %-ной агарозе в присутствии 7 М мочевины. Ультрацентрифугирование мРНК проводили в 5—20 %-ном линейном градиенте сахарозы при 49 тыс. об/мин в течении 3 ч (*Spinco* L2, ротор *S W65*). В качестве маркера использовали цитоплазматическую РНК из клеток печени мыши. Материал, седиментирующий в зоне 33S, собирали, рехроматографировали на колонке с поли-У-сефарозой, подвергали гельфильтрации на сефадексе Г-50 и использовали как матрицу в системе обратной транскрипции для синтеза одонитевой кДНК. Степень нативности поли-А-содержащей мРНК определяли электрофорезом в 1,5 %-ной агарозе в присутствии 7 М мочевины. Высокоочищенные препараты ТГ мРНК были использованы для синтеза комплементарной ДНК с помощью обратной транскриптазы из вируса миелобластома птиц. Для получения наиболее гомогенных и полноразмерных препаратов ТГ кДНК при проведении реакции синтеза кДНК добавляли ингибитор РНКазы из плаценты человека [6]. Инкубационная смесь для синтеза ТГ кДНК содержала: 0,05 М *трис*-HCl, *pH* 8,3, 0,05 М KCl, 0,005 М $MgCl_2$, 0,01 М β -меркаптоэтанол, 2 мкг/мл ТГ мРНК, 4 мкг/мл олиго-(*dT*)₁₀, 100 мкг/мл актиномина Д, 240 ед/мл РНК-зависимой ДНК полимеразы, по 0,5 мМ АТФ, *d*ГТФ, *d*ТТФ, 0,1 мМ 3H -*d*ЦТФ (17—19 мккюри/мл), 100 мкг ингибитора рибонуклеазной активности. От невключившихся дезоксинуклеозидтрифосфатов освобождались хроматографией на колонке с сефадексом Г-100. Удельная радиоактивность полученной высокоочищенной 3H -ТГ кДНК составила 10×10^6 имп/мин/мкг РНК. Размеры кДНК, определенные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии

98 %-ного формамида, свидетельствовали о синтезе полноразмерных препаратов ТГ кДНК [1]. Гибридизацию поли-(А)⁺ ТГ мРНК с ³H-ТГ кДНК проводили в течение 20 ч в 60 мкл буфера, содержащего 0,3 М NaCl, 0,03 М *трис*-HCl, pH 7,5, 0,025 % SDS, 5 мкг тРНК. Постоянное количество ТГ кДНК (10000 имп/мин) смешивали с ТГ мРНК, варьируя ее концентрацию от 0,05 мкг/мл до 0,75 мкг/мл. По окончании инкубации из проб отбирали аликвоты и наносили по 30 мкл на фильтры «Руфс» (Чехословакия). Фильтры высушивали, промывали холодной 50 % ТХУ и спиртом и просчитывали радиоактивность на счетчике «Марк-III». К оставшимся 30 мкл предварительно добавляли нуклеазу *SI* и инкубировали при 50 °С в течение 1 ч.

В таблице представлены данные включения ¹⁴C-аминокислот в S₃₀ бесклеточной системе из клеток щитовидной железы.

Ранее нами было определено, что после криоконсервации белоксинтезирующая активность щитовидной железы сохраняется на 84,5 % [4]. Из данных таблицы следует, что при хранении в течение 3 лет клетки криоконсервированной щитовидной железы сохраняют 60 % своей белоксинтезирующей активности.

На рисунке представлены кривые гибридизации ТГ кДНК с поли-А⁺ мРНК из клеток щитовидной железы. При диффузном токсическом зобе (кривая 1) гибридизуемость достигала 85 %. В криоконсервированной тиреотоксической ткани (3 г. хранения) гибридизуемость составила 51 % (кривая 2).



Кривые гибридизации ТГ кДНК с поли-А⁺ ТГ мРНК: 1 — диффузный токсический зоб; 2 — криоконсервированная тиреотоксическая ткань (3 года хранения); а — прямые кривые; б — логарифмические кривые

Следовательно, в клетках криоконсервированной тиреотоксической ткани, сохраняемой в течение 3 лет, наблюдается уменьшение содержания ТГ мРНК в 2,3 раза.

На основании проведенных исследований можно сделать заключение о том, что в процессе трехгодичного хранения белоксинтезирующая активность клеток криоконсервированных щитовидных желез и содержание в них функционально активной индивидуальной матричной РНК для синтеза ТГ сохраняется.

Включение ¹⁴C-аминокислот в S₃₀ бесклеточной системе из клеток щитовидной железы, имп/мин

Вариант опыта	Диффузный токсический зоб	Криоконсервированная тиреотоксически измененная ткань щитовидной железы (n=8) [1]	Криоконсервированная тиреотоксически измененная ткань щитовидной железы (3 г. хранения) (n=6)
S ₃₀ + ¹⁴ C-аминокислоты (0')	40 ± 16	39 ± 12	45 ± 23
S ₃₀ + ¹⁴ C-аминокислоты (60')	1337 ± 90	1198 ± 87, p ₁ < 0,001	838 ± 75, p ₂ < 0,001

Примечание. Приведены средние данные 4—6 определений для каждого случая. p₁ — достоверность различий между интактными и криоконсервированными при —196°С в течение 6—12 мес. щитовидными железами; p₂ — достоверность различий между интактными и криоконсервированными при —196°С в течение 3 лет щитовидными железами.

Величина полунасыщения (соотношение РНК/кДНК, при котором достигается половинный уровень максимальной гибридизации) составила для диффузного токсического зоба 6 × 10³. Для достижения того же уровня гибридизации в случае ТГ мРНК из клеток криоконсервированной щитовидной железы требуется в 2,3 раз большее соотношение РНК/кДНК (величина полунасыщения 1,4 × 10⁴).

Таким образом, криоконсервированные щитовидные железы, сохраняемые в течение 3 лет, могут быть использованы для целей трансплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Туракулов Я. Х. Выделение тиреоглобулиновой мРНК из клеток узлового эутиреоидного зоба человека и синтез комплементарной ей ДНК // Докл. АН СССР.—1987.— № 6.— С. 1486—1492.
2. Лейтин В. Л., Лерман М. И. // Биохимия.— 1969.— № 34.— С. 839—845.
3. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментального исследования // Патол. физиология и эксперим. терапия.— 1960.— № 6.— С. 76—78.
4. Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Исмаилов С. И. Биосинтез тиреоглобулина и содержание тиреоглобулиновых полирибосом в клетках криоконсервированной щитовидной железы // Криобиология.— 1985.— № 2.— С. 23—25.
5. Аос. 935050 СССР, МКИ³ А 01 N 1/02. Способ консервирования щитовидной железы // Н. С. Пушкар, А. М. Утевский, В. А. Чуйко и др.— Оpubл. 15.06.82.— Бюл. № 22.
6. Del Martiniff A., Vassart G. Biosynthesis of thyroglobulin // Biophys. Res. Commun.— 1980.— 83, N 3.— P. 645—653.

Ин-т биохимии АН УзССР,
г. Ташкент

Поступила 04.05.88

B. A. ATAKHANOVA, D. A. KADYROVA, U. P. MAKSUMOVA, S. I. ISMAILOV,
Ya. KH. TURAKULOV

EXPRESSION OF THE THYROGLOBULIN GENE IN CRYOPRESERVED CELLS OF HUMAN THYROID GLAND

Institute for Biochemistry of the Uzbek SSR Academy of Sciences, Tashkent

The activity of protein synthesizing system and the expression of TG gene in cryopreserved thyrocytes stored for 3 years were studied. Thyrocytes stored for 3 years have been demonstrated to maintain 60 % of protein synthesizing activity. A decrease in the content of TG mRNA by 2.3 — fold has been found by the method of hybridization of TG cDNA with poly—(A)—containing RNA of cryopreserved thyrocytes. Therefore, cryopreserved thyroid glands stored for 3 years may be used for transplantation.

УДК 57.043

В. Ю. Тощак, С. Д. Артамонов, М. А. Данилов, Н. К. Шестакова,
Н. А. Онищенко

СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕЧЕНИ, ПОДВЕРГНУТОЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ КОНСЕРВАЦИИ В ТЕЧЕНИЕ 18—24 ЧАСОВ

Исследовано энергетическое состояние изолированных гепатоцитов (ИГ), выделенных из гипотермически консервированной печени, по содержанию адениновых нуклеотидов (АН). Функциональную полноценность и жизнеспособность ИГ оценивали по скорости синтеза мочевины, стимулированного добавками орнитина и глутамата, а также по тесту витального окрашивания трипановым синим. Показано, что гипотермическая консервация печени в растворе евро-Коллинза в течение 24 ч существенно не влияет на скорость синтеза мочевины и процент непрокрашенных трипановым синим ИГ. Мало меняется при этом общий объем пула АН и доля АТФ в пуле АН. Отношение сухого веса ИГ к влажному остается неизменным, что свидетельствует об отсутствии осмотических нарушений в ИГ. Делается вывод о возможности использования гипотермически консервированной печени (до 24 ч) с целью получения суспензии ИГ для клинических нужд.

Сохранение органоспецифических функций у изолированных гепатоцитов (ИГ) обусловило внедрение в клиническую практику новых методов лечения печеночной недостаточности: трансплантации ИГ и экстракорпо-

ральной перфузии через взвесь ИГ [1, 2, 3]. Для экстренного и широкого применения этих методов в клинике требуется создание функционирующего банка аллогенных и ксеногенных изолированных гепатоцитов.

Настоящее исследование посвящено изучению возможности получения функционально полноценных ИГ из печени после длительных сроков ее гипотермической консервации (18—24 ч). Необходимость изучения этого вопроса обусловлена требованием более полной утилизации донорского материала и снижения себестоимости получения ИГ при создании банка этих клеток.

Эксперименты выполнены на печени 20 беспородных белых крыс. Для консервации печень отмывалась от крови оксигенированным раствором Хенкса (37 °C) через портальную вену в течение 5 мин. Затем производилась гипотермическая перфузия печени раствором евро-Коллинза (5 мин), после чего перфузия прекращалась и печень хранилась в этом же растворе при $4 \div 6$ °C в течение 18—24 ч.

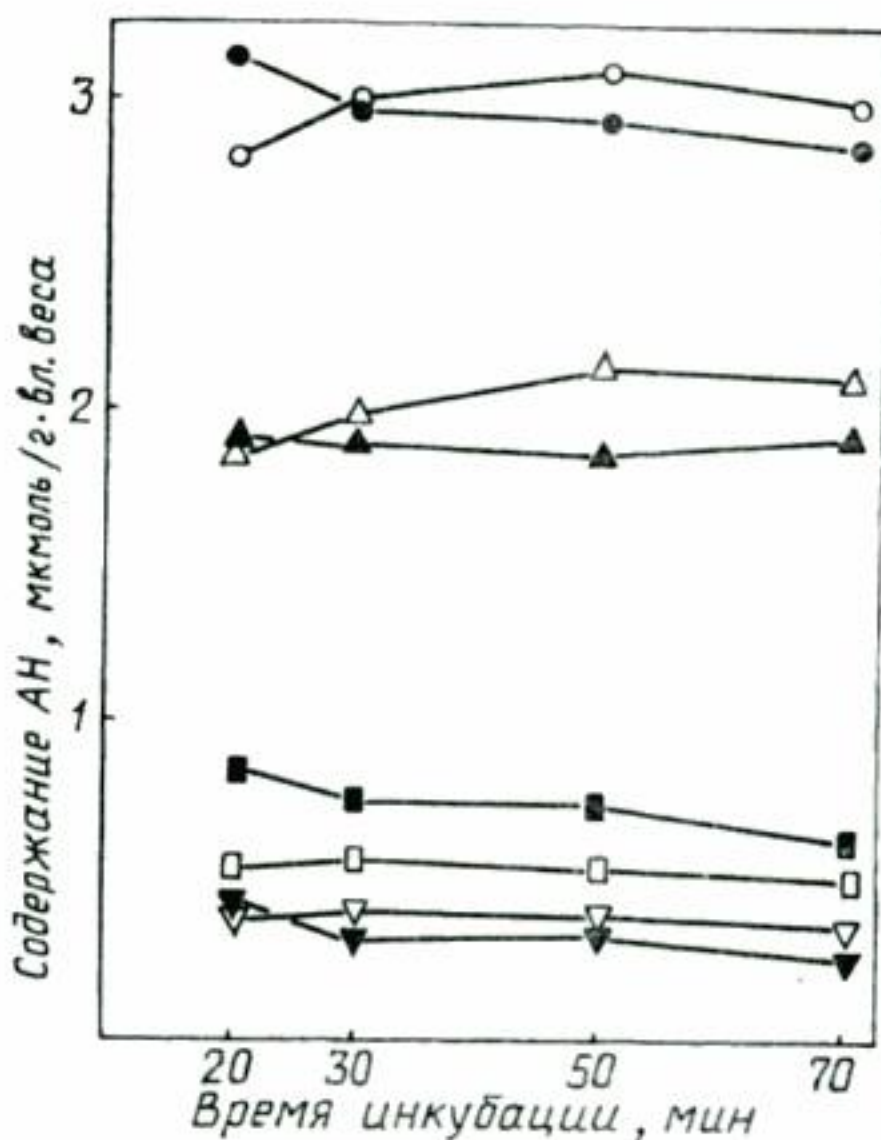
Выделение гепатоцитов осуществляли ферментативным методом [5] с незначительными модификациями. Инкубацию клеток производили при 37 °C на роторном шейкере в условиях пассирования карбогена над поверхностью суспензии ИГ. Состав среды инкубации включал: NaCl — 120 мМ, KCl — 5 мМ, Na_2HPO_4 — 1 мМ, CaCl_2 — 1 мМ, MgSO_4 — 3 мМ, ГЕПЕС — 10 мМ, NaHCO_3 — 25 мМ, бычий сывороточный альбумин (БСА) — 0,2 %, pH 7,5.

Скорость эндогенного синтеза мочевины определялась в условиях добавки к суспензии ИГ 20 мМ глутамата. Скорость стимулированного синтеза мочевины определялась в условиях добавки к суспензии ИГ 20 мМ глутамата, 2 мМ орнитина и 2 мМ NH_4Cl . Содержание мочевины определяли при помощи наборов реактивов «Лахема» (ЧССР).

Содержание АТФ в суспензии ИГ определяли энзиматически [4]. Содержание АДФ и АМФ определяли при помощи наборов «Бёринджер» (ФРГ). Жизнеспособность клеток определяли по витальному окрашиванию их в 0,2 %-ном растворе трипанового синего. Данные нормированы на сухой и влажный вес ИГ [5]. Результаты обработаны статистически и представлены с указанием среднего и дисперсии.

В работе использовали гексокиназу, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу, НАДФ, ЭДТА, ГЕПЕС, БСА (фракция 5) фирмы «Серва», коллагеназа тип IV получена от «Сигма», остальные реактивы были отечественного производства марок «х.ч.» и «о.с.ч.».

Проведенные нами эксперименты показали, что жизнеспособность ИГ, оцененная по тесту с трипановым синим, существенно не меняется при выделении ИГ из консервированной печени (78 ± 8 % против 86 ± 4 % в контроле, $p > 0,05$). Это указывает на целостность плазматической мембраны основной массы клеток печени после 18—24 ч консервации. Мы нашли также, что гипотермическая консервация печени существенно не влияет на содержание адениновых нуклеотидов (АН) в суспензии ИГ во время инкубации.



Типичная динамика содержания адениновых нуклеотидов (АН) в суспензии свежесинтезированных изолированных гепатоцитов (ИГ) (○, △, □, ▽) и в суспензии ИГ, выделенных из печени, подвергнутой 20-часовой консервации (●, ▲, ■, ▼): ○ — сумма АН; △ — АТФ; □ — АДФ; ▽ — АМФ

На рисунке показано, что общий объем пула АН сохраняется на уровне 3,0 мкмоль/г, а доля АТФ в общем объеме пула АН достаточно высока и стабильна в течение полуторачасовой инкубации ИГ при 37 °С.

Кроме того, наши результаты показали полную сохранность цикла образования мочевины в печени. В присутствии глутамата (20 мМ) скорость эндогенного синтеза мочевины изолированными гепатоцитами, выделенными из консервированной печени, составляла $(0,088 \pm 0,018)$ мкмоль/мин · г влажного веса (в контроле $(0,033 \pm 0,012)$ мкмоль/г), тогда как при добавлении орнитина она возрастала до $(0,755 \pm 0,052)$ мкмоль/мин · г (в контроле $0,596 \pm 0,041$) мкмоль/мин · г). Оценочно, запуск синтеза мочевины в условиях наших экспериментов соответствовал увеличению АТФазной нагрузки на 2,0—3,5 мкмоль/мин · г. В контрольных экспериментах увеличение энерготрат не вызывало уменьшения доли АТФ в общем объеме пула АН. В суспензии ИГ, выделенных из консервированной печени, при запуске синтеза мочевины наблюдается некоторое снижение доли АТФ в общем объеме пула АН (таблица). Однако резкого падения этого показателя не происходит. Этот факт, а также высокая скорость синтеза мочевины такими ИГ указывают на то, что фосфатный потенциал ИГ достаточно хорошо стабилизирован в отношении роста АТФазной нагрузки.

Некоторые метаболические характеристики ИГ, выделенных из печени, подвергнутой гипотермической консервации в течение 18—24 ч

Добавки в среду инкубации	Продолжительность консервации, ч	АТФ, мкмоль/г	АДФ, мкмоль/г	АМФ, мкмоль/г	Сумма АН, мкмоль/г	АТФ / АТФ+АДФ+АМФ
—	0	$1,97 \pm 0,12$	$0,52 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,01$	$2,88 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,01$
—	18—24	$1,89 \pm 0,13$	$0,75 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03$	$2,97 \pm 0,32$	$0,64 \pm 0,01$
Глутамат 20 мМ	0	$1,76 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,02$	$2,48 \pm 0,14$	$0,71 \pm 0,01$
	18—24	$1,73 \pm 0,06$	$0,62 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,04$	$2,65 \pm 0,29$	$0,66 \pm 0,02$
Глутамат 20 мМ	0	$1,54 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,02$	$2,20 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,01$
Орнитин 2 мМ NH ₄ Cl 2 мМ	18—24	$1,59 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$2,68 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,01$

Сопоставляя полученные данные о хорошей сохранности ИГ из консервированной печени с известными данными литературы о допустимости лишь коротких сроков консервации печени как органа перед трансплантацией (не более 6 ч) [6], мы приходим к выводу, что ограничение допустимых сроков гипотермической консервации печени для трансплантации не связано с острой потерей функциональной способности клеточных элементов паренхимы печени. К вероятным причинам, ограничивающим жизнеспособность печени как органа, могут быть отнесены изменения, возникающие на уровне стромальных структур этого органа при гипотермической консервации. Подтверждением данного тезиса могут служить особенности получения ИГ из консервированной печени. Мы нашли, что процедура диспергирования консервированной печени при выделении ИГ после перфузии раствором коллагеназы в течение 10 мин существенно облегчается по сравнению с интактной печенью. Выход ИГ достоверно увеличивается с $(58 \pm 4) \%$ в контроле до $(78 \pm 4) \%$ от массы печени, при этом отсутствуют изменения в осмотическом состоянии ИГ. Отношение сухого веса к влажному весу ИГ составляло в контроле $(22,7 \pm 3,2) \%$, после консервации — $(23,1 \pm 2,8) \%$. Полученные нами данные указывают на то, что при консервации печени имеет место холодový аутолиз стромальных структур, в результате

которого и ослабевают межклеточные контакты. «Блок оттока» и набухание печени, наблюдаемые в первые минуты ее перфузии после этапа гипотермической консервации, свидетельствуют также в пользу выдвигаемого положения о преобладании надклеточных механизмов повреждения печени на сроках консервации до суток.

Таким образом, в настоящей работе нами установлено, что этап гипотермической консервации печени в течение 18—24 ч существенно не влияет на жизнеспособность и функциональные свойства выделенных гепатоцитов. Этот факт позволяет рекомендовать консервированную донорскую печень для получения ИГ и последующего применения их в клинике. Проведенная нами работа расширяет сферу использования донорской печени, а также открывает новые возможности в создании функционирующего банка ИГ как для трансплантации, так и для экстракорпорального подключения больным с печеночной недостаточностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев М. А., Островерхов Г. Е., Бруслик В. Г. и др. Трансплантация консервированных клеток печени при острой печеночной недостаточности // *Здравоохранение Казахстана*.— 1984.— № 2.— С. 15—19.
2. Корухов Н. Ю., Полоцкий М. А., Писаревский А. А. Первый клинический опыт применения аппарата «Вспомогательная печень» // *Трансплантация и искусственные органы*.— М. : Б. и., 1986.— С. 193—197.
3. Маргулис М. С., Андрейман Л. А., Сизова С. М. и др. Гемокарбоперфузия при лечении печеночно-почечной недостаточности // *Успехи гепатологии*.— 1984.— Т. X.— С. 402—406.
4. Lamprecht W., Trautschold J. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Methods of Enzyme Analysis*.— New York, 1974.— P. 2101—2110.
5. Seglen O. Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell. Biol.*— 1976.— 13, N 1.— P. 29—83.
6. Wood R. T., Rikkers L. F., Shaw B. W., Williams L. A review of liver transplantation for gastroenterologists // *Amer. J. Gastroenterol.*— 1987.— 82, N 7.— P. 593—606.

НИИ трансплантологии и
искусственных органов МЗ СССР,
г. Москва

Поступила 12.12.88

V. Yu. TOSHCHAKOV, S. D. ARTAMONOV, M. A. DANILOV, N. K. SHESTAKOVA,
N. A. ONISHCHENKO

THE STATE OF HEPATOCYTES ISOLATED FROM THE LIVER SUBJECT TO HYPOTHERMAL PRESERVATION FOR 18 TO 24 HOURS

Research Institute for Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The energy state of hepatocytes isolated from the liver subject to hypothermal preservation has been judged by the content of adenine nucleotides. The functional value and viability of hepatocytes were estimated by the rate of urea synthesis stimulated by added ornithine and glutamate and by trypan blue exclusion. It has been shown that the urea synthesis and trypan blue exclusion of liver cells preserved in Euro-Collins solution for 24 hr changed but insignificantly. The total adenine nucleotide pool and the proportion of ATP remained unchanged. The dry-wet weight ratio of hepatocytes maintained, thus indicating the absence of osmotic alterations in hepatocytes. The liver preserved under conditions of hypothermia (for up to 24 hr) may be used for obtaining suspensions of hepatocytes for clinical purposes.

ДЕЙСТВИЕ ТРИПСИНА, ВЕРСЕНА И КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ВНЕПЛАНОВЫЙ СИНТЕЗ ДНК КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ПОСЛЕ ДЕКОНСЕРВАЦИИ

Данные, полученные на постоянных *ISM CHO-K1* и диплоидной ФЭЧ линиях клеток, показали, что обработка клеток версеном или трипсином существенного влияния на внеплановый синтез ДНК не оказывает; при оптимальных концентрациях криопротекторов высокий уровень внепланового синтеза ДНК коррелирует с более высокой выживаемостью клеток после деконсервации.

Ранее нами было показано, что при криоконсервации и хранении клеточных линий в жидком азоте в ДНК клеток возникают повреждения, которые затем в ходе культивирования репарируются [1]. Внеплановый (репаративный) синтез ДНК можно наблюдать по включению ^3H -тимидина в репарируемые места на ДНК с помощью метода автордиографии. При подготовке к замораживанию клетки монослойных культур переводят в суспензионное состояние с помощью трипсина или версена, затем вводят в суспензию криопротекторы (ДМСО или глицерин) и только после этого проводят процесс криоконсервации. Цель данной работы — выяснить, какое влияние оказывает на внеплановый синтез ДНК обработка клеток агентами, используемыми для снятия клеток с субстрата, и криопротекторами при подготовке к криоконсервации и после деконсервации.

Работа проводилась на монослойных культурах клеток китайского хомячка *CHO-K1*, мышинных фибробластах *ISM* и диплоидных фибробластах эмбриона человека ФЭЧ (10—15 пассажи). Культура *CHO-K1* росла на среде F_{12} («Флоу лабораторис», Англия) с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Белорусский НИИЭМ, Минск), клетки *ISM* росли на среде Игла, а культура ФЭЧ — на смеси сред Игла и 199 (Института полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва) с добавлением 15 % сыворотки крупного рогатого скота (мясокомбинат, Киев). Клетки снимали с субстрата с помощью 0,02 % версена или 0,25 % трипсина (Предприятие по производству бактериальных препаратов, Минздрав СССР, Москва). Все культуры были свободны от микоплазм.

Культуры, которые были использованы в опытах, замораживали в присутствии 5 и 10 % ДМСО отечественного производства и фирмы «Мерк», (ФРГ), 5 и 10 % глицерина отечественного производства). Время контакта клеток с криопротекторами до замораживания и после размораживания не более 2 ч, так как столько времени требуется в среднем для подготовки 50—100 ампул каждой линии клеток и криоконсервации. Консервацию проводили в программном замораживателе типа ЗПБ-1 (с включением второго этапа после кристаллизации при -16°C). Деконсервацию проводили путем отогрева в аппарате РТ-3 при 40°C в течение 80 с. После размораживания ампулу с клетками центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин и удаляли среду. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл свежей среды без криопротектора и вводили во флакон с 5 мл среды. Через 24 ч меняли среду, чтобы удалить погибшие клетки и обломки. Выживаемость клеток определяли с помощью трипанового синего. Изучение внепланового синтеза ДНК проводили на 0—5 пассажах после криоконсервации. Любая асинхронная культура клеток, которая не подвергалась никакому воздействию, состоит на 45—50 % из клеток, находящихся в фазе S , и на 55—50 % — из клеток, находящихся в фазах G_1 , G_2 и M клеточного цикла, а 2—6 % клеток, находящихся в этих фазах, имеют слабую метку выше фона (фон 5—10 зерен): в этих клетках наблюдается спонтанный внеплановый синтез ДНК как результат каких-то воздействий, неизвестных нам. Установлено, что после лучевых и нелучевых воздействий в клетках, находящихся в несинтетических фазах,

появляется слабая метка. Эти клетки из группы немеченых переходят в группу слабомеченых, т. е. в клетках идет внеплановый (unsheduled) синтез ДНК, обнаруживаемый с помощью метода автордиографии. Подробности методики описаны в нашей предыдущей статье [1].

Исследование внепланового синтеза проводили методом автордиографии с помощью ^3H -тимидина (удельная активность 0,79 ТБк/ммоль). Клетки высеивали в пластиковые чашки Петри ($\varnothing$ 35 мм) с 2 мл среды на покровные стекла и инкубировали от 2 до 48 ч. Затем в среду вводили ^3H -тимидин в концентрации $37,0 \cdot 10^4$ МБк/мл и инкубировали в течение 1 ч. В некоторых экспериментах за 2 ч до введения изотопа в среду добавляли ингибитор репликации — оксимочевину (5 ммоль/мл). Необходимо отметить, что в данной работе в каждом варианте опытов было 2—3 повтора. При микроскопии клетки относили к одной из 3-х групп: 1 — сильно меченые (свыше 70 зерен над ядром), 2 — слабомеченые (11—70 зерен) и 3 — немеченые (5—10 зерен, фон). Показателем внепланового синтеза ДНК служило увеличение числа слабомеченых клеток за счет уменьшения числа немеченых, без сколько-нибудь значительного изменения числа сильно меченых клеток. В каждом варианте подсчитывали 1000—2000 клеток. Средняя ошибка на таблицах вычислялась по формуле:

$$m = \sqrt{\frac{a(n-a)}{n}}, \quad m\% = \frac{m \cdot 100\%}{n} \quad [2].$$

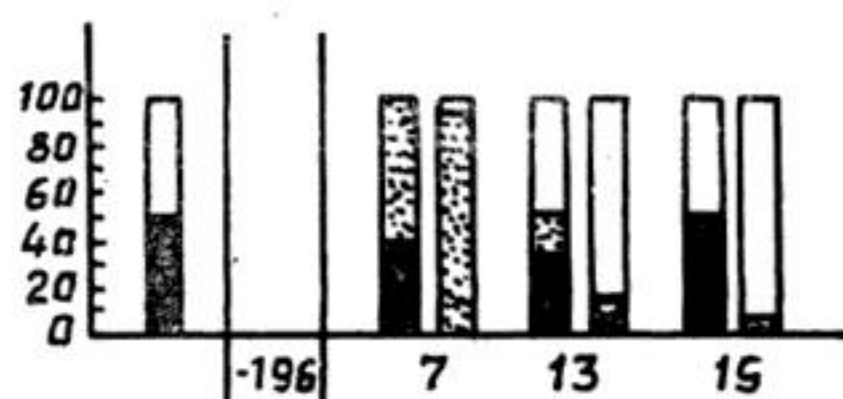


Рис. 1. Распределение клеток *ISM* по интенсивности мечения ^3H -тимидином до криоконсервации и в разные сроки после деконсервации (в каждой паре столбиков правый — инкубация клеток в присутствии оксимочевины): ■ — сильно меченые клетки, ▣ — слабомеченые клетки, □ — немеченые клетки. По оси абсцисс — срок после деконсервации, сут; по оси ординат — число клеток, %

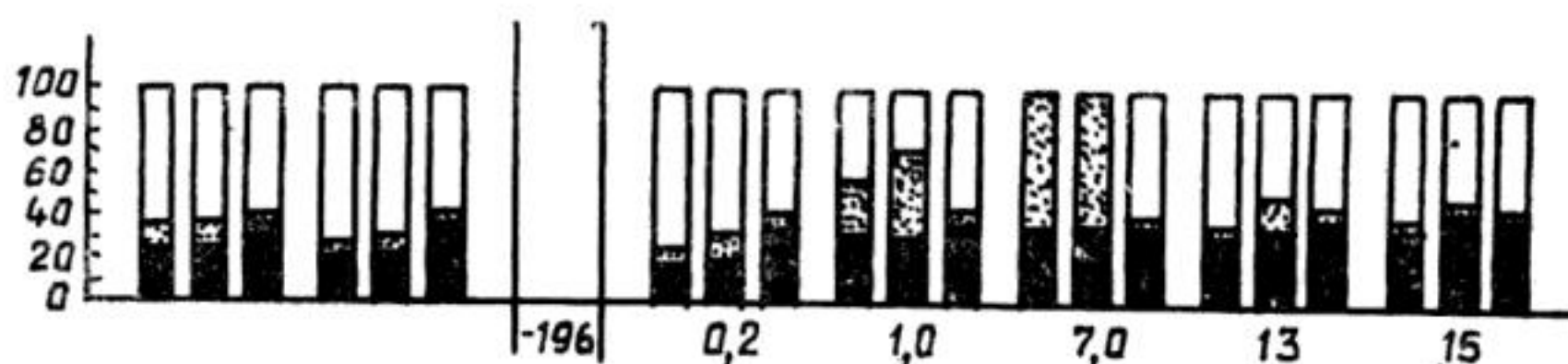


Рис. 2. Распределение клеток *ISM* по интенсивности мечения ^3H -тимидином при снятии клеток с субстрата трипсином (левый столбик), версеном (средний столбик) и контроль (правый столбик) до криоконсервации (1-я группа столбиков — 40 мин, 2-я группа столбиков — 120 мин воздействия ДМСО) и в разные сроки после деконсервации в присутствии 10 % ДМСО: ■ — сильно меченые клетки, ▣ — слабомеченые клетки, □ — немеченые клетки. По оси абсцисс — срок после деконсервации, сут; по оси ординат — число клеток, %

На рис. 1 показано распределение клеток *ISM* в популяции по интенсивности метки над ядром до и после криоконсервации с 10 % ДМСО («Мерк»), а также влияние на ДНК оксимочевины. Как видно из рисунка, пик внепланового синтеза наступает на 7 сут, т. е. наибольшее число клеток имеет слабую метку. В то же время под влиянием оксимочевины происходит ингибирование репликативного синтеза ДНК и почти во всех клетках (90 %) обнаруживается репаративный синтез, т. е. он маскировался репликативным. Через 15 сут, как видим, распределение клеток такое же, как и до криоконсервации — внеплановый синтез ДНК наблюдается у 5 % клеток. Выживаемость через 7—15 сут такая же, как до криоконсервации, 98—99 %.

На рис. 2 продемонстрировано влияние версена и трипсина, а также 10 % ДМСО (фирма «Мерк») на клетки *ISM* до и после криоконсервации.

Как видно, количество клеток со слабой меткой после обработки версеном нарастает и уменьшается несколько быстрее, чем после трипсина. Необходимо также отметить, что в большинстве сроков наблюдается небольшое ингибирование репликативного синтеза по сравнению с контролем (постоянно идущая культура). Выживаемость (по трипановому синему) сразу после деконсервации составляет 83—87 %, через сутки падает до 65—70 %, а через 7 сут и позже составляет 98—99 %, т. е. является такой же, как до криоконсервации.

Таблица 1

Включение ^3H -тимидина в ДНК клеток *CNO-KI* после 2-часового воздействия ДМСО и глицерина (выпуск 1986 г.)

Воздействие		Распределение клеток в популяции по интенсивности метки, %			Выживаемость, %
Криопротектор	Концентрация, %	Сильномеченные, более 70 зерен	Слабомеченные, 11—70 зерен	Немеченные, 5—10 зерен, фон	
ДМСО	5	$48,8 \pm 1,5$	$7,4 \pm 0,8$	$43,2 \pm 1,5$	99
ДМСО	10	$38,0 \pm 1,5$	$9,3 \pm 0,9$	$52,7 \pm 1,5$	98
ДМСО	10	$14,1 \pm 1,1$	0	$85,9 \pm 1,1$	10
ДМСО*	10	$52,3 \pm 1,5$	$4,9 \pm 0,6$	$42,9 \pm 1,5$	98
Глицерин	5	$52,7 \pm 1,5$	$6,5 \pm 0,7$	$44,8 \pm 1,5$	98
Глицерин	10	$45,6 \pm 1,5$	$3,4 \pm 0,5$	$51,0 \pm 1,5$	99
Контроль	—	$58,5 \pm 1,5$	$5,9 \pm 0,7$	$35,6 \pm 1,5$	99

* Криопротектор фирмы «Мерк».

Влияние криопротекторов в концентрациях 5 и 10 % на синтез ДНК до криоконсервации интересно сопоставить при исследовании на постоянной линии *CNO-KI* и диплоидной линии фибробластов эмбриона человека ФЭЧ. В табл. 1 показано влияние 2-часового воздействия 5-, 10 %-ного глицерина и ДМСО разных сроков хранения и производства на распределение клеток *CNO-KI* в популяции по интенсивности метки (опыты были поставлены в сентябре — декабре 1986 г.). Как видно из таблицы, сильное ингибирующее действие на репликативный и внеплановый синтез ДНК оказывает ДМСО большого срока хранения (1980 г.), в то время как в других случаях криопротекторы, и в частности ДМСО, оказывают небольшое ингибирующее действие на репликативный и репаративный синтез ДНК, что согласуется с данными других авторов [3, 4]. Выживаемость при этом не изменяется (98—99 %) и лишь после воздействия ДМСО (1980 г.) падает до 10 %.

Влияние различных концентраций и производства разных фирм ДМСО и глицерина на внеплановый синтез ДНК клеток ФЭЧ (10—15 пассажи) и их выживаемость до криоконсервации и после деконсервации показана в табл. 2. Прежде всего необходимо отметить, что у клеток до замораживания, как и ранее у *CNO-KI*, наблюдают после 2-часового воздействия криопротекторами небольшое ингибирование репликативного и внепланового синтезов ДНК без изменения выживаемости (98—99 %). После деконсерваций, как видно из таблицы, при 20 %-ном уровне клеток с внеплановым синтезом в контроле (без криоконсервации), наиболее интенсивно он идет через 3 сут (65—75 %) в тех случаях, где применяют криоконсервацию с 5 % ДМСО и глицерина. Выживаемость при этом через сутки оказывается 30—40 %, а затем начинает возрастать, и через 6 сут во флаконах нарастает полный монослой. Несколько меньше, у 50 % клеток, наблюдается внеплановый синтез ДНК после криоконсервации с 10 % ДМСО фирмы «Мерк». Выживаемость в этом случае падает через 3 сут до 8 %, а затем начинается очень медленное увеличение количества клеток. После криоконсервации с 10 % ДМСО и глицерином отечественного производства через сутки только у 20—25 % клеток отмечается внеплановый синтез ДНК при выживаемости около 10 %, а через 3 сут живых клеток не остается.

Включение ^3H -тимидина в ДНК клеток ФЭЧ при действии ДМСО и глицерина до и в разные сроки после криоконсервации

Срок после раз- моражи- вания	Воздействие		Распределение клеток в популяции по интенсивности метки, %			Выживае- мость, %
	Криопротектор	Концент- рация, %	Сильномече- ные, более 70 зерен	Слабомеченные, 11—70 зерен	Немеченные, 5—10 зерен, фон	
До криоконсервации (время воздействия 40 мин)						
	ДМСО	5	16,1 ± 1,1	19,0 ± 1,2	64,9 ± 1,5	98
	ДМСО	10	15,9 ± 1,1	18,2 ± 1,2	65,9 ± 1,5	98
	ДМСО*	5	18,0 ± 1,2	19,8 ± 1,2	62,2 ± 1,5	99
	ДМСО*	10	16,9 ± 1,2	19,6 ± 1,2	63,5 ± 1,5	98
	Глицерин	5	11,9 ± 1,0	15,8 ± 1,1	72,3 ± 1,4	99
	Глицерин	10	13,2 ± 1,0	21,6 ± 1,3	65,2 ± 1,5	99
	Контроль	—	19,9 ± 1,2	16,9 ± 1,2	63,2 ± 1,5	99
До криоконсервации (время воздействия 120 мин)						
	ДМСО	5	15,1 ± 1,1	17,6 ± 1,2	68,3 ± 1,4	98
	ДМСО	10	12,8 ± 1,0	7,1 ± 0,8	79,1 ± 1,2	98
	ДМСО*	5	15,1 ± 1,1	12,9 ± 1,0	72,0 ± 1,4	99
	ДМСО*	10	16,2 ± 1,2	12,4 ± 1,0	71,4 ± 1,4	99
	Глицерин	5	12,6 ± 1,0	9,1 ± 0,9	77,6 ± 1,3	98
	Глицерин	10	12,2 ± 1,0	9,8 ± 0,9	80,0 ± 1,2	98
	Контроль	—	20,5 ± 1,2	18,5 ± 1,2	61,0 ± 1,5	99
После криоконсервации (—196° С) и деконсервации (время воздействия криопротектора 120 мин)						
Сразу	ДМСО	5	—	—	—	76
	ДМСО	10	—	—	—	50
	ДМСО*	5	—	—	—	64
	ДМСО*	10	—	—	—	50
	Глицерин	5	—	—	—	63
	Глицерин	10	—	—	—	52
	Контроль	—	—	—	—	8
	Контроль без криоконсервации	—	—	—	—	99
1 сут	ДМСО	5	31,4 ± 1,4	22,2 ± 1,3	46,4 ± 1,5	30
	ДМСО	10	24,0 ± 1,3	25,6 ± 1,3	50,4 ± 1,5	10
	ДМСО*	5	34,4 ± 1,5	65,6 ± 1,5	0	30
	ДМСО*	10	33,4 ± 1,5	51,3 ± 1,5	15,3 ± 1,1	20
	Глицерин	5	26,2 ± 1,3	40,8 ± 1,5	33,0 ± 1,5	20
	Глицерин	10	19,5 ± 1,2	20,3 ± 1,2	60,2 ± 1,5	10
	Контроль	—	—	—	—	0
	Контроль без криоконсервации	—	19,6 ± 1,2	17,8 ± 1,2	62,6 ± 1,5	98
3 сут	ДМСО	5	30,7 ± 1,4	69,3 ± 1,4	0	40
	ДМСО	10	—	—	—	0
	ДМСО*	5	34,5 ± 1,5	65,5 ± 1,5	0	30
	ДМСО*	10	—	—	—	8
	Глицерин	5	24,8 ± 1,3	75,2 ± 1,3	0	40
	Глицерин	10	—	—	—	0
	Контроль без криоконсервации	—	20,1 ± 1,2	18,3 ± 1,2	61,1 ± 1,5	99
	Контроль без криоконсервации	—	—	—	—	—
11 сут	ДМСО	5	28,1 ± 1,4	38,8 ± 1,5	33,1 ± 1,4	99
	ДМСО*	5	19,6 ± 1,2	34,5 ± 1,5	45,9 ± 1,5	98
	ДМСО*	10	29,7 ± 1,4	29,9 ± 1,4	40,4 ± 1,5	99
	Глицерин	5	20,3 ± 1,2	34,0 ± 1,5	49,7 ± 1,5	99
	Контроль без криоконсервации	—	18,5 ± 1,2	17,2 ± 1,2	64,3 ± 1,5	98

Срок после размораживания	Воздействие		Распределение клеток в популяции по интенсивности метки, %			Выживаемость, %
	Криопротектор	Концентрация, %	Сильномеченные, более 70 зерен	Слабомеченные, 11—70 зерен	Немеченные, 5—10 зерен, фон	
15 сут	ДМСО	5	$26,3 \pm 1,3$	$19,9 \pm 1,2$	$53,8 \pm 1,5$	99
	ДМСО*	5	$19,5 \pm 1,2$	$9,0 \pm 0,9$	$71,5 \pm 1,4$	98
	ДМСО*	10	$21,4 \pm 1,3$	$22,3 \pm 1,3$	$57,3 \pm 1,5$	98
	Глицерин	5	$17,6 \pm 1,2$	$18,3 \pm 1,2$	$66,1 \pm 1,5$	99
	Контроль без криоконсервации	—	$18,4 \pm 1,2$	$14,0 \pm 1,2$	$67,6 \pm 1,4$	99
20 сут	ДМСО	5	$19,3 \pm 1,2$	$16,5 \pm 1,2$	$64,2 \pm 1,5$	98
	ДМСО*	5	$22,8 \pm 1,3$	$9,2 \pm 0,9$	$68,0 \pm 1,4$	99
	ДМСО*	10	$19,2 \pm 1,2$	$17,6 \pm 1,2$	$63,2 \pm 1,5$	99
	Глицерин	5	$21,9 \pm 1,3$	$15,8 \pm 1,1$	$62,3 \pm 1,5$	98
	Контроль без криоконсервации	—	$18,7 \pm 1,2$	$16,8 \pm 1,2$	$64,5 \pm 1,5$	99

* Криопротектор фирмы «Мерк».

Необходимо отметить, что если суммировать результаты, полученные в данной работе и предыдущей нашей статье [1] по обнаружению внепланового синтеза ДНК до и после криоконсервации с криопротекторами ДМСО и глицерином на постоянных линиях *CHO-K1* и *ISM*, то можно сказать, что на этих линиях внеплановый синтез ДНК после криоконсервации идет в клетках, находящихся во всех фазах цикла, включая *S*, где он маскируется репликативным синтезом ДНК. При этом для клеток характерен высокий процент выживаемости: 80—90 %.

Таким образом, на основе данных, полученных при исследовании на постоянных *CHO-K1* и *ISM* и диплоидной ФЭЧ линий, можно сделать следующие выводы: 1) обработка клеток трипсином или версеном существенного влияния на внеплановый синтез ДНК и выживаемость не оказывает; 2) повышенный уровень внепланового синтеза ДНК у клеток после криоконсервации коррелирует с более высокой выживаемостью; 3) для клеток исследованных нами культур оптимальными являются различные концентрации криопротекторов: для диплоидных ФЭЧ — 5 %, а для постоянных *CHO-K1* и *ISM* — 10 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенова Е. Г. Внеплановый синтез ДНК в культивируемых клетках после криоконсервации // Криобиология. — 1988. — № 1. — С. 17—20.
2. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. — М.: Медицина, 1963. — 157 с.
3. Cleaver J. E., Painter R. B. Absence of specificity in inhibition of DNA repair replication by DNA binding agent, cocarcinogens and steroid in human cells // Cancer Res. — 1975. — 35, N 7. — P. 1773—1778.
4. Gaudin D., Gregg R. S., Jilding K. L. DNA-repair inhibition: a possible mechanism of action of cocarcinogens // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1971. — 45, N 3. — P. 630—636.

Ин-т цитологии АН СССР, г. Ленинград

Поступила 20.07.88

E. G. SEMENOVA

THE EFFECTS OF TRYPSINUM, VERSENE, AND CRYOPROTECTANTS ON THE UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS IN CELL CULTURE DURING PREPARATION FOR CRYOPRESERVATION AND AFTER THAWING

Institute for Cytology of the USSR Academy of Sciences, Leningrad

The treatment of *ISM*, *CHO-K1* and human diploid embryo fibroblast cell lines with Versene or Trypsinum did not induce changes in unscheduled DNA synthesis. With optimal cryoprotectant concentrations, the high level of unscheduled DNA synthesis correlated with higher cell viability after thawing.

КЛЕТКИ И ТКАНИ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА КАК ИСТОЧНИК КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Представлены литературные и собственные данные об особенностях метаболизма и преимуществах использования клеток и некоторых тканей плодов человека в клинических целях перед клетками и тканями взрослых доноров.

Использование в криобиологии биологических объектов разного уровня организации в онтогенетическом аспекте, включая пренатальное развитие, является перспективным не только с точки зрения изучения механизмов устойчивости биологических объектов к действию низких температур в ходе естественного изменения их структур, но и благодаря такому свойству, как иммунологическая толерантность. Именно такие свойства определяют в целом ряде случаев преимущества использования тканей и клеток плодов перед аналогичными тканями взрослых доноров [7] при лечении ряда патологических состояний организма. Создание банка плодовых и эмбриональных клеток является целесообразным не только с целью их клинического использования, но и с общебиологической точки зрения, а именно накопления дифференцированных клеток человека как начального этапа борьбы со старением организма [9]. Это утверждение основано на убеждении ряда геронтологов в том, что старение организма начинается с клетки, т. е. представляется возможным замена старых клеток новыми, более молодыми, например клетками плодов человека.

Работы такого рода еще только начаты и создание банка криоконсервированного плодового материала потребует изучения целого ряда не только криобиологических и криомедицинских вопросов, но и общебиологических, связанных с изменением морфофункциональных свойств определенного вида ткани и клеток в процессе развития, так как систематических исследований, прослеживающих эти изменения на всех этапах, в настоящее время нет.

Исходя из особенностей строения плодовых тканей в процессе дифференцировки и целей их использования в качестве криоконсервированного трансплантационного материала, целесообразным считается забор тканей и клеток в сроки от 16 до 26 недель развития [2, 25]. Определенные успехи в разработке методов получения и криоконсервирования получены при работе с β -клетками поджелудочной железы [2], гемопоэтическими клетками и гепатоцитами [5, 6, 25], тимоцитами [25].

Успехи, достигнутые в настоящее время в лечении больных сахарным диабетом, определяются включением в комплекс лечения традиционными методами трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы плодов человека 16—26 недель развития. Срок забора тканей в этом случае определяется особенностями ее строения: в процессе развития доля эндокринной ткани резко снижается, составляя в постнатальном периоде всего один процент от общей массы железы, в то время как в 16—26 недель она составляет 20—40 %.

Преимущества использования плодовых β -клеток поджелудочной железы определены рядом свойств. Имея уровень гормональной инсулинпродуцирующей активности лишь незначительно ниже, чем у взрослых, островковые β -клетки в плодной поджелудочной железе обладают значительно меньшей антигенностью. Немаловажное значение имеет то, что суммарные клетки эндокринного отдела поджелудочной железы плода имеют минимальную ферментативную активность. В ткани поджелудочной железы плода содержится меньшее количество лейкоцитов, что немаловажно в процессе инициации иммунного конфликта и отторжения трансплантата [2, 4].

Хранение β -клеток плодной поджелудочной железы можно проводить, используя их рост в культуре [4], что имеет ряд преимуществ. В процессе культивирования увеличивается количество клеток, гибнут клетки, инициирующие иммунный конфликт [2], снижается их антигенность [4]. Однако для длительного хранения и накопления материала целесообразно создание низкотемпературного банка клеток, поскольку накопление клеток в качестве культуры не позволяет хранить их длительно [4].

Первыми об использовании метода криоконсервирования β -клеток экспериментальных животных сообщили Кемп и соавт. [22]. Авторами были получены обнадеживающие результаты при использовании регулируемых скоростей замораживания клеток в среде с 1,0 М ДМСО. Дальнейшие разработки показали, что при использовании простых одноэтапных (нерегулируемых на этапах) быстрых или медленных скоростей можно добиться такого же эффекта. Улучшение показателей жизнеспособности клеток получено в более поздних работах, где показано [23], что при увеличении концентрации ДМСО до 1,5 М возможно упростить процедуру замораживания, регулируя скорости охлаждения не на четырех, а на двух этапах.

В настоящее время эффективность использования ДМСО и регулируемых скоростей замораживания показана в целом ряде работ [2, 23].

Работы по криоконсервированию культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека впервые выполнены в СССР [2]. Культуру клеток получали из поджелудочной железы 5—7 дней культивирования, а затем замораживали, регулируя скорости на 3-х этапах. В качестве защитных соединений в состав среды 199 вводили 10 % глицерина и 10 % бычьей сыворотки.

Благодаря интенсивно проводимым исследованиям в разных странах мира [30], в настоящее время выяснены не только оптимальные условия на этапах подготовки клеток к криоконсервированию, но и некоторые криобиологические аспекты, как, например, влияние ДМСО на культивируемые клетки, реакция клеток на различные скорости охлаждения.

Перспективным направлением при лечении ряда патологических состояний организма, в частности острой печеночной недостаточности, является пересадка изолированных гепатоцитов, которые могут быть получены из здоровой ткани печени, удаляемой во время резекции по поводу различных очаговых поражений органа [5], из трупной печени человека [14, 15], из трупной печени плодов человека [13], из печени свиньи [5].

Работы по использованию алло- и ксеногепатоцитов в качестве компонента биологической диализирующей жидкости для детоксикации организма проводятся рядом исследователей при перитонеальном диализе, гемодиализе, лимфодиализе [15]. Некоторые исследователи включают использование взвеси клеток в качестве трансплантационного материала [8].

Вместе с тем механизм действия изолированных гепатоцитов при любом методе использования до настоящего времени не выяснен [10, 11, 30]. Не выяснен и неясен пока и механизм действия гепатоцитов, полученных из плодов печени человека. Например, считают, что в цитозольной фракции и пересаженных гепатоцитах есть какие-то низкомолекулярные и термостабильные факторы, стимулирующие пролиферативные процессы в пораженной печени [11]. Исследование факторов стимуляции регенерации, содержащихся в субклеточных препаратах печени, является, бесспорно, перспективным. Взвесь клеток плодовой печени оказывается эффективной в качестве биостимулятора для компенсации утраченных функций и повышения обменных и репаративно-восстановительных процессов, а также для детоксикации крови и лимфы, предупреждения анафилактических реакций и аллергического шока.

Такой широкий спектр использования гепатоцитов ставит вопрос о создании банка клеток. Существующие гипотермические методы хранения не позволяют создать банк клеток длительного хранения [16], поэтому мето-

ды длительного хранения с использованием низких температур в настоящее время интенсивно разрабатываются.

В СССР впервые криоконсервированные нами аллогенные гепатоциты были использованы в качестве компонента диализирующей биологической жидкости в Московском городском научно-исследовательском институте скорой помощи им. В. Н. Склифосовского. Гепатоциты в среде с 10 % ДМСО замораживали по 2-этапной программе. Деконсервированные клетки сохраняли высокую антиокислительную способность, активно включали меченые предшественники в суммарные белки.

Работы по криоконсервированию гепатоцитов плодов человека разных сроков развития (16—26 недель) показали, что они имеют низкую антиокислительную способность, не изменяющуюся после замораживания, но высокий уровень биосинтетических процессов [13].

Следует отметить, что в настоящее время не разработан метод криоконсервирования, позволяющий получить после деконсервации ксено- и аллоклетки с уровнем структурно-функциональных параметров, не отличающихся от свежевыделенных клеток. Решение этой проблемы требует выяснения особенностей метаболизма развивающихся клеток, научно обоснованной криозащиты метаболических систем клеток.

Работы, проводимые в последнее десятилетие по трансплантации участков ткани головного мозга млекопитающих и человека, имеют важное не только медицинское, но и общепаразитическое значение [17, 26], так как известно [12], что ткань центральной нервной системы обладает очень низкой способностью к регенерации. Использование ткани головного мозга будет эффективно при ряде патологических состояний, например для возмещения нейронов, погибших в результате действия ионизирующей радиации, паркинсонизме, повреждений и разрыве спинного мозга, несахарного диабета [12], коррекции генетически обусловленных дефектов [1]. Интенсивно проводимые в последнее время в этом направлении исследования позволили заключить, что ткань мозга плодов и молодых млекопитающих более пригодна для трансплантации, чем ткань взрослых, которая не переживает как после пересадки в головной мозг млекопитающих [19], так и в переднюю камеру глаза [22, 27, 28].

Показано, что эмбриональная нервная ткань после замораживания сохраняет способность приживляться и выполнять возложенную на нее функцию [18].

В экспериментах на животных разных видов (крысы, кролики, морские свинки) показано [18], что в среде Игла или лактат-рингеровском растворе 10 % ДМСО при медленном замораживании до -70°C или -95°C ткани эмбрионального мозга сохраняли жизнеспособность, росли и дифференцировались в паренхиме мозжечка. Установлено [18], что замена среды, Игла на амниотическую жидкость при той же концентрации ДМСО дает возможность улучшить результаты криоконсервирования.

Успех трансплантации в данном случае обусловлен тем обстоятельством, что для трансплантации берут эмбриональную или плодовую ткань, отличающуюся по своим антигенным свойствам от тканей взрослого организма, состоящую из недифференцированных клеток-предшественников, которые, дифференцируясь, вступают в интегральную связь с нервными клетками мозга-реципиента, органически входят в состав его тканей.

Учитывая то, что головной мозг является иммунологически привилегированным местом, в котором трансплантат защищен от действия иммунных сил организма, в будущем, как считает ряд ученых [24], в лечебных целях, по-видимому, можно будет трансплантацию эмбриональной нервной ткани различных видов млекопитающих (например коровы, обезьяны, свиньи и т. д.) производить людям.

Эффективным при замораживании коры больших полушарий или мозжечка без мозговых оболочек является использование в качестве среды физиологического раствора с 10 % ДМСО и использование медленной ско-

рости охлаждения ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -70°C). Показано [21], что после трансплантации деконсервированной ткани нейроны, возникшие из трансплантатов замороженной ткани мозга, не отличаются от нейронов, образовавшихся из незамороженных тканей [17].

Перспективным при лечении ряда нервных расстройств оказалось использование вместо нервной ткани надпочечника плода, пересаженной вместо «черного вещества», например при лечении болезни Паркинсона.

В работе В. Н. Блюмкина [3] приведены экспериментальные данные использования в клинике полностью сформированных флотирующих культур, полученных из щитовидной железы плодов человека 4—5-месячного срока, по сути дела, состоящих из тиреоцитов миниатюрных щитовидных желез. Оседлые очаговые культуры, полученные из щитовидной железы плодов человека, не отличались по гистологическим параметрам от флотирующих культур. Флотирующие культуры, полученные из щитовидной железы человека, сохраняют жизнеспособность до 4-х недель [3], что дает возможность накопления материала для низкотемпературного хранения.

В практической медицине нашли применение и твердые ткани плодов человека. Незрелая малодифференцированная костная ткань плода человека и животных, обладая низкой антигенной активностью, устойчивостью к инфекции и гипоксии, высокой остеогенной способностью, является идеальным материалом для пластических операций при восстановлении целостности костей свода черепа (КСЧ) и твердой мозговой оболочки (ТМО).

В настоящее время существует анатомо-топографическое обоснование использования костно-оболочечного блока плода человека для поэтажной пластики дефектов КСЧ и ТМО и разработан способ ортотопической пластики и дефектов КСЧ и ТМО неонатальным костно-оболочечным трансплантатом, предотвращающий образование оболочечно-мозговых рубцов в послеоперационном периоде [16].

Разработан метод криоконсервирования костно-оболочечного блока теменных костей плода человека с использованием 15 %-ного раствора 1,2-пропандиола при замораживании со скоростью $10\text{—}15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -80°C и погружении в жидкий азот [16].

Криоконсервированный костно-оболочечный трансплантат позволяет считать его наиболее эффективным при костно-оболочечных дефектах любого происхождения не более $8,0\text{ см}^2$.

Интересными и перспективными представляются также исследования, касающиеся идентификации факторов роста, синтезируемых тканями эмбрионов и плодов [20, 29], а также разработки, связанные с использованием кожи, роговицы, сухожилий.

Таким образом, плодовые клетки и ткани имеют ряд преимуществ в качестве трансплантационного материала перед материалом взрослых доноров. При этом в криобиологическом аспекте эффективным практически для всех видов клеток является использование ДМСО в концентрации от 10 до 15 % и 2-этапного режима замораживания. Криоконсервированные клетки и ткани плодов человека после деконсервации имеют высокий уровень жизнеспособности и эффективны после трансплантации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова М. А., Полежаев Л. В. Трансплантация эмбриональной замороженной ткани мозга в головной мозг взрослых крыс, интактных и после гипоксии // Докл. АН УССР. — 1983. — 269, № 5. — С. 1206—1209.
2. Блюмкин В. Н. Трансплантация поджелудочной железы: Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ, 1984. — 11. — С. 164—247.
3. Блюмкин В. Н., Бабинова Р. А., Скалецкий Н. Н. и др. Флотирующие культуры, полученные из щитовидной железы плодов человека и животных // Трансплантация и искусственные органы. — М.: Б. и., 1986. — С. 92—94.
4. Блюмкин В. Н., Скалецкий Н. Н., Деревянко В. П. Культуры гепатоцитов, полученные из печени эмбрионов человека // Трансплантация и искусственные органы. — М.: Б. и., 1986. — С. 102—105.
5. Гальперин Э. И., Карагулян С. Р. Трансплантация печени: Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ, 1984. — 11. — С. 5—70.

6. Грищенко В. И., Лобыкцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени.— Киев : Наук. думка, 1988.— 190 с.
7. Дизна С. Н. Явление физиологического гипобиоза плода и новорожденного // Акушерство и гинекология.— 1989.— № 1.— С. 9—14.
8. Дугладзе Д. И., Мчелиашвили Т. И., Дгебуадзе Н. Н. и др. Лечение острой печеночной недостаточности гетеротопической пересадкой печени (экспериментальное исследование) // Хирургия.— 1983.— № 7.— С. 17—50.
9. Зорин Е. В. Создание банка дифференцированных и стволовых клеток человека как начальный этап борьбы со старением // Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза.— Харьков : Б. и., 1987.— С. 73—74.
10. Островерхов Г. Е., Бруслик В. Г., Чечельницкая С. М., Сергеева В. С. Внутриворотная трансплантация изолированных клеток печени в лечении острой печеночной недостаточности // Трансплантация органов и тканей.— Тбилиси : Б. и., 1982.— С. 140—141.
11. Петров В. И., Гальперин Э. И., Карагюлян С. Р. и др. Методы очистки крови и стимуляция регенерации в комплексном лечении печеночной недостаточности // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в хирургии: Материалы II Всесоюз. конф.— Ташкент : Б. и., 1984.— С. 13—14.
12. Полежаев Л. В., Александрова М. И. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии.— М. : Наука, 1986.— 151 с.
13. Суббота Н. П., Пономарев Ю. И., Мишнев Л. Г. Влияние низких температур и ДМСО на митохондрии печени плодов человека // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.— Харьков: Б. и., 1990.— С. 23—30.
14. Суббота Н. П., Шиманко И. И., Зимина Л. Н. Криоконсервирование аллогенных гепатоцитов и их детоксикационная активность // Клиническая токсикология.— Баку : Б. и., 1989.— С. 17—18.
15. Шиманко И. И., Мусселиус С. Е., Бруслик В. Г. и др. Использование взвеси интактных клеток аллогенной печени в лечении больных с острой почечной и печеночной недостаточностью различной этиологии : Метод. рекомендации.— М. : Б. и., 1986.— 15 с.
16. А.с. 1162421 СССР, МКИ А 61 В 17/56. Способ пластики дефектов костей свода черепа и твердой мозговой оболочки / В. А. Пятикоп, В. И. Сипитый, А. М. Вентак, Н. П. Масалитин.— Оpubл. 17.01.83, Бюл. № 23.
17. Das G. D., Houle J. D., Brasko J., Das K. G. Freezing of neural tissues and their transplantation in the brain of rats : Technical details and histological observations // J. Neurosci. Meth.— 1983.— 8, N 1.— P. 1—15.
18. Frotscher M., Buck E., Mannsfeld B., Wense J. Zur Regeneration des cortex cerebri nach Replantation lines cortexabschittes bei ratus norvegicus B // J. Hirnforsch.— 1983.— 33, N 2.— S. 123—133.
19. Chew K. E., Cameron J. Increase in mitotic activity of regenerating limbs by growth factor — impregnated implants // J. Exp. Zool.— 1983.— 226, N 2.— P. 325—329.
20. Houle J. D., Das G. D. Freezing and transplantation of brain tissue in rats // Experimentia.— 1980.— 36, N 15.— P. 1114—1115.
21. Hoffer B. J., Seiger A., Zjunberg T., Olson Z. Electrophysiological and cytological studies of brain homographs in the anterior chamber of the eye : maturation of cerebellar cortex in oculo // Brain. Res.— 1974.— 79, N 2.— P. 165—184.
22. Kemp J. A., Hurt S. N., Brown J., Clark W. P. Recovery and function of human fetal pancreas frozen to -196°C // Transplantation.— 1981.— 32, N 1.— P. 10—15.
23. Kolata G. Grafts correct brain damage // Science.— 1982.— 217, N 4457.— P. 342—344.
24. Löweberg B., Vossen J. M. J. J., Dooren L. J. Transplantation of fetal liver cells in the treatment of severe combined immunodeficiency disease // Blut.— 1977.— 34, N 3.— P. 181—195.
25. Malin M. C., Touraine J. L., Perrot H., Traeger J. // Proc. Eur. Dialysis and Transplant. Assoc., 16. 16 th Congr.— Amsterdam : Tunbridge Wells, 1979.— P. 413—418.
26. Norgren G., Ebendal T. Nerve growth activities present in the developing chick embryo // Neurosci. Lett. Suppl.— 1983, N 14.— P. 262.
27. Parr E. L., Bowen K. M., Lafferty K. J. Cellular changes in cultured mouse thyroid gland and islets of Langerghans // Transplantation.— 1980.— 30, N 2.— P. 135—141.
28. Popelkova J., Hedlund K. O., Ebendal T. Morphometric evaluation of NaF injections given to the chick embryo // Neurosci. Lett. Suppl.— 1983.— N 4.— P. 289.
29. Prummer O., Raghawachar A., Calvo W. et al. Transplantation of cryopreserved fetal liver cells in the dog after total irradiation // Abstr. 12 Ann. Meet. of Intern. Soc. for Exp. Hematol.— London, 1983.— P. 9797.
30. Røsjøtte R. V., Scharp D. W., Downing B. et al. Pancreatic islet banking : the transplantation of frozen—thawed rat islets transported between centers // Cryobiology.— 1981.— 18, N 4.— P. 357—369.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 01.12.89

HUMAN FETAL CELLS AND TISSUES AS A SOURCE OF CRYOPRESERVED MATERIAL FOR TRANSPLANTATION

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

The literature and own data on the peculiarities of metabolism and advantages of using human fetal cells and some tissues for clinical purposes over those of adult donor are discussed.

УДК 57.043

Н. Х. П. М. Джутте, П. Хейсе, П. Х. Цейльмакер

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА МЫШИ, ОБЕЗЬЯНЫ И ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Трансплантация островков Лангерганса в будущем может стать методом лечения инсулинзависимого диабета. В отличие от всей железы, изолированные островки Лангерганса после замораживания снижают свою иммуногенность, что значительно улучшает результаты их аллотрансплантации. Поскольку трудно одновременно выделить большое количество островков, приходится их концентрировать от разных доноров, а затем замораживать. В данной работе описаны методы, используемые в лаборатории авторов для выделения островков Лангерганса поджелудочной железы мыши, обезьяны и человека, представлены результаты криоконсервации этих объектов. Замораживание клеток осуществляли под защитой ДМСО и методом витрификации с помощью смеси криопротекторов.

У больных инсулинзависимым диабетом после инъекций инсулина часто развиваются хронические осложнения со стороны глаз, почек и других систем. На основании экспериментальных данных авторы пришли к выводу, что более оптимальная регуляция уровня глюкозы в крови может быть достигнута путем трансплантации островков Лангерганса, что в существенной мере предотвратит или уменьшит указанные выше осложнения [1, 2].

Трансплантация изолированных островков Лангерганса обладает многими преимуществами перед трансплантацией всей поджелудочной железы или ее части. Во-первых, трансплантация островков менее инвазивна для больного. Во-вторых, иммуногенность островковой ткани можно уменьшить перед трансплантацией, что пока невозможно для всей ткани поджелудочной железы. Имеются данные о том, что концентрация антигенов класса I в β -клетках находится на низком уровне, а антигены класса II отсутствуют [3].

Следовательно, удаление клеток, несущих антигены класса II, например капиллярных эндотелиальных клеток и лейкоцитов-пассенджеров, может существенно уменьшить антигенность островков. Такой эффект может быть полностью или частично достигнут культивированием островков грызунов при высокой концентрации кислорода или низкой температуре, обработкой островков анти-Ia-антителом, антителом антидендритных клеток или облучением, а также криоконсервацией. У грызунов эти манипуляции приводят к более длительному приживлению аллотрансплантатов после трансплантации [4, 6]. В этой связи перспективным следует признать изучение влияния предварительной обработки островков человека на процесс их отторжения после трансплантации.

Недостатком трансплантации изолированных островков Лангерганса является то, что из поджелудочной железы донора удается выделить очень небольшое количество клеток. Метод выделения островков Лангерганса из поджелудочной железы человека не разработан еще в такой степени как метод выделения их у животных.

Метод выделения островков поджелудочной железы мыши линии BCBA, который используется в нашей лаборатории, предполагает использование коллагеназы (13 мин при 37 °C; 1,5 мг коллагеназы/мл), дисперсионную фильтрацию и многократное центрифугирование [7].

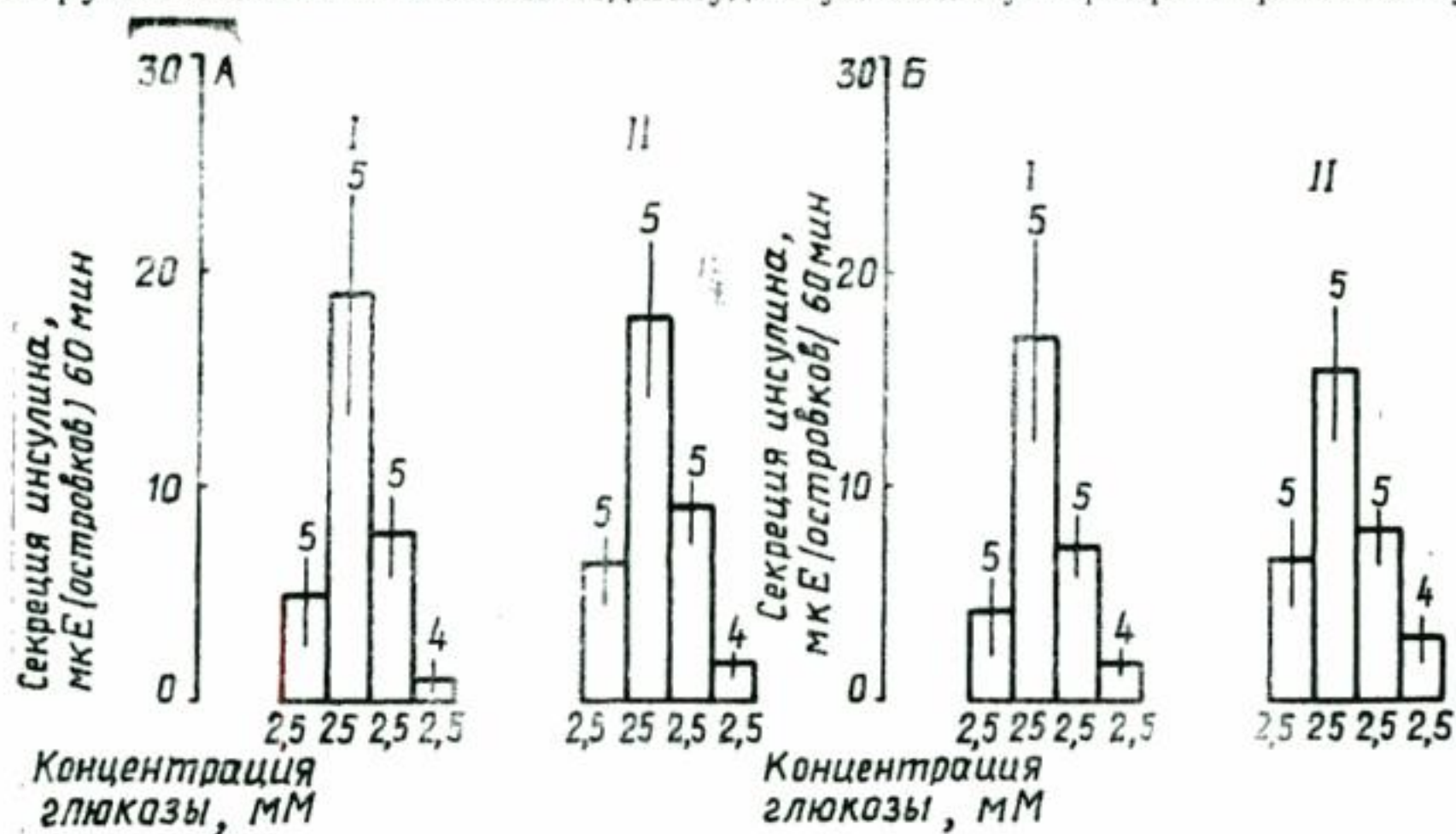
Островки мыши можно идентифицировать под фазово-контрастным микроскопом по их четкому светлomu контуру на темном фоне, в то время как экзокринная ткань более прозрачна. С помощью этого метода можно получить более 150 островков из поджелудочной железы одной мыши. После выделения островки, собранные вручную, инкубируют при свободном их плавлении в среде RPMI-1640, содержащей 5 % инактивированной нормальной сыворотки человека, в течение разных периодов времени.

Метод, используемый для выделения островков у грызунов, непригоден для выделения этих объектов у человека. Однако обнадеживающие результаты получены при

работе с поджелудочной железой человека в некоторых лабораториях при использовании ранее описанного метода выделения островков [8]. Нами использован модифицированный метод Грея для выделения островков из поджелудочной железы обезьяны-резус и человека (рисунок). Для получения оптимальных результатов нам казалось лучше начать с органов, тепловая ишемия которых не превышает 30 мин, а холодовая менее 15 мин. Поджелудочную железу перфузировали холодным раствором [6].

Известно, что нейтральный красный окрашивает островки крыс и мышей при введении его через аорту [9], при этом краситель не мешает их функции [10]. Окрашивание островков может сильно повысить эффективность метода, занимающего много времени и требующего ручной работы. В нашей работе некоторые (не все) островки окрашивались при введении нейтрального красного через проток в поджелудочную железу человека. Неокрашенные островки можно было отличить по структуре от экзокринной ткани. С помощью этого метода удавалось получить 300 островков на 1 грамм поджелудочной железы, небольшой процент от общего количества островков. В нашей лаборатории, как и в других, продолжаются поиски методов увеличения выхода островков.

В настоящее время необходимы методы, с помощью которых можно быстро обрабатывать крупные сегменты или всю поджелудочную железу. При фильтровании суспен-



Секреция инсулина островками поджелудочной железы человека, витрифицированными через 2 (А) или 6—9 (Б) дней после выделения. Островки культивировали в течение 4 дней после отогрева. Контрольные островки культивировали в течение 6 (А) или 10—13 (Б) дней. Секретию инсулина при концентрации глюкозы 2,5 и 25 мм измеряли в конце периода культивирования и выражали в средних значениях $\pm SEM$. Цифрами указано число разных препаратов островков, выделенных из того же числа разных поджелудочных желез (I — контроль; II — витрификация)

зии ткани через фильтры с разным диаметром отверстий достигается грубая очистка. Центрифугирование суспензии в градиенте плотности также нередко используется на стадии очистки. Продолжаются исследования влияния присутствия экзокринной ткани на трансплантаты. На Международном симпозиуме по осложнениям при диабете (Гаага, 1986 г.) сообщалось, что если сейчас невозможно добиться чистого выхода очищенных островков из поджелудочной железы человека, то можно трансплантировать частично очищенные островки.

Целостность изолированных островков проверяли *in vitro* при последующей 60-минутной инкубации десяти островков в средах, содержащих 2,5 мМ глюкозы, 25 мМ глюкозы и снова 2,5 мМ глюкозы. Инсулин определяли в средах радиоиммунным методом, а секрецию инсулина на 1 островок/ч рассчитывали для каждого периода инкубации. Функция островков считалась сохраненной, если секреция инсулина в присутствии 25 мМ глюкозы по меньшей мере в два раза превышала его выделение в присутствии 2,5 мМ глюкозы. Кроме того, секреция инсулина островками должна уменьшаться при снижении концентрации глюкозы. При инкубации островков в присутствии глюкозы разной концентрации подтвердился факт, что концентрации глюкозы 2,5 мМ и 25 мМ являются действительно соответственно стимулирующей и нестимулирующей для изолированных островков мыши и человека. Перед исследованием свойств островков мыши и человека в среде, содержащей 2,5 мМ глюкозы, их необходимо инкубировать в течение 1 ч, что позволяет выяснить уровень секреции инсулина в присутствии 25 мМ глюкозы.

Островки поджелудочной железы мыши, как и островки обезьяны и человека, выделенные вышеуказанными методами, сохраняли свою функцию, по данным теста *in vitro*, в присутствии 25 мМ глюкозы, увеличивали секрецию инсулина, а при последующей инкубации с глюкозой в нестимулирующей концентрации — снижали.

Интактность изолированных островков нами проверялась *in vivo* методом трансплантации. В связи с этим островки мыши трансплантировали под почечную капсулу самки мыши линии ВСВА, у которой был вызван диабет внутривенным введением стрептозотоцина (250—275 мг/кг веса). Концентрация глюкозы в сыворотке крови этих мышей снижалась от 20 до 8 мМ по меньшей мере за 17 недель после трансплантации 150—200 островков мыши.

До тех пор, пока не будет повышена эффективность метода выделения островков и не достигнуто соотношение одного донора к одному реципиенту, островки разных доноров придется собирать и хранить, при этом должно проводиться типирование ткани. На короткое время островки можно хранить в культуре, но риск загрязнения увеличивается с увеличением длительности периода инкубации. При этом необходимо постоянно следить за жизнеспособностью островков. Таким образом, метод криоконсервации более предпочтителен для долгосрочного хранения, когда клетки теоретически можно хранить бесконечно. Есть сведения о замораживании и оттаивании островковой ткани с сохранением секреции инсулина *in vitro* и/или *in vivo* [11]. В этих исследованиях для защиты клеток от криоповреждения использовали криопротектор, чаще всего ДМСО. В нашей лаборатории замораживание изолированных островков осуществлялось двумя методами.

1. Метод с ДМСО. Островки насыщали 1,5 М ДМСО при комнатной температуре двумя этапами по 5 мин, затем их выдерживали 15—20 мин при температуре от 0 до -8°C . После этого островки замораживали со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от -8 до -40°C и погружали в жидкий азот (-196°C). Через некоторое время от одного часа до нескольких дней островки быстро оттаивали на воздухе при комнатной температуре и отмывали от ДМСО. Для восстановления островков после процедуры выделения их культивировали в течение двух (мыши) или семи (обезьяна, человек) дней перед замораживанием. После оттаивания островки культивировали в течение четырех дней для восстановления после замораживания — оттаивания.

Островки мыши, обезьяны и человека, замороженные-оттаянные этим методом, стимулировались глюкозой, что проявлялось в увеличении секреции инсулина *in vitro*. По меньшей мере 55 % островков мыши, восстановленных после замораживания-оттаивания, переживало период культивирования после оттаивания. Процент выживших островков человека колебался от 80 до 100 %. После трансплантации 100—300 островков мыши, замороженных—оттаянных с ДМСО, мышам с диабетом, вызванным стрептозотоцином, уровень глюкозы в сыворотке крови удавалось снизить четырем из шести мышей.

2. Витрификация. Поскольку высокие концентрации криопротекторов токсичны для клеток, Ролл и Фейхи [12] смешивали несколько криопротекторов, концентрация которых каждая в отдельности не была токсичной. Кроме того, смесь 20,5 % ДМСО, 15,5 % ацетамида, 10 % пропиленгликоля и 6 % полиэтиленгликоля с молекулярной массой 8000 отвердевает при низких температурах без образования кристаллов льда, влияющих на клеточную мембрану. Эмбриональные клетки в присутствии этой смеси хорошо переживали последующее погружение непосредственно в жидкий азот и оттаивание с большой скоростью [12]. Таким образом, этот метод замораживания может быть отнесен к быстрым.

Метод витрификации использовали для криоконсервации изолированных островков Лангерганса. Перед замораживанием и после оттаивания островки культивировали в течение такого же периода времени, как и островки, замороженные с ДМСО. Островки обрабатывали в три этапа средой витрификации (СВ), которая состояла из RPMI-1640 и 0,3 % бычьего сывороточного альбумина: 15 мин с 25 %-ной, 10 мин с 50 %-ной и 10 мин со 100 %-ной конечной концентрацией криопротекторов. При инкубации в 50 %-ной СВ островки переносили от комнатной температуры к 0°C . В конце обработки островки погружали непосредственно в жидкий азот. Через некоторое время от 1 ч до нескольких дней островки оттаивали, а смесь разводили в четыре этапа, начиная при 0°C : 10 мин до 50 %-ной, 10 мин до 25 %-ной и затем до 12,5- и 6,3 %-ной концентраций. В процессе инкубации при 25 %-ной концентрации островки переносили в условия комнатной температуры, после чего их помещали в свежую среду. Изолированные островки мыши, обезьяны и человека, замороженные — оттаянные этим методом, сохраняли способность повышать секрецию инсулина после стимуляции глюкозой *in vitro* (рисунок).

Скорость секреции инсулина была сравнима с таковой при замораживании оттаивании с использованием ДМСО. Количество островков, переживших период культивирования после оттаивания, также было сравнимым при использовании этих методов. Островки мыши, криоконсервированные методом витрификации, были способны после трансплантации снижать уровень глюкозы в крови в течение более длительного времени у шести из шести мышей с диабетом, вызванным стрептозотоцином.

В заключение следует отметить, что метод витрификации можно использовать для криоконсервации изолированных островков Лангерганса поджелудочной железы мыши, обезьяны и человека. Преимущество этого метода перед методом, использующим ДМСО, заключается в его скорости и простоте, поскольку не приходится использовать сложное охлаждающее оборудование. Возможность криоконсервации изолированных островков Лангерганса, успехи в повышении эффективности метода выделения островков человека и достижения в уменьшении иммуногенности островков повышают вероятность успешной клинической трансплантации островков Лангерганса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scharp D. W. Clinical feasibility of islet transplantation // Transplant. Proc.— 1984.— 16.— P. 820—825.
2. Sutherland D. E. R. Pancreas and islet transplantation. II. Clinical trials // Diabetologia.— 1981.— 20.— P. 435—450.
3. Janeway C. The immune destruction of pancreatic β -cells // Immunology Today.— 1985.— 6.— P. 229—249.
4. Bretzel R. G., Blum B. E., Hol! E. et al. Rat islet allograft survival following different immunomodulative and immunosuppressive treatment // Easds Study Group (Aidspit), Assisi, 1986.
5. Federlin K. F., Bretzel K. F. Immunology of transplants of isolated islets of Langerhans // Immunology in diabetes.— London: Kimpton Medical Pul., 1984.— P. 187—193.
6. Lacy P. E., Scharp D. W. Islet transplantation in treating diabetes // Ann. Rev. Med.— 1986.— 37.— P. 33—40.
7. Pipeleers D., Veld P. A., Van den Winkel M. et al. A new *in vitro* model for the study of pancreatic α and β cells // Endocrinology.— 117.— P. 806—816.
8. Gray D. W. R., McShane P., Grant A. et al. A method of isolation of islets of Langerhans from the human pancreas // Diabetes.— 1984.— 33.— P. 1055—1061.
9. Bensley R. R. Studies on the pancreas of the guinea pig // Am. J. Anat.— 1911.— 12.— P. 297—388.
10. Gray D. W. R., Millard P. R., McShane P. et al. The use of the dye neutral red as a specific non-toxic, intra-vital stain of islets of Langerhans // Br. J. Exp. Pathol.— 1983.— 64.— P. 553—558.
11. Bank H. L. Cryobiology of isolated islets of Langerhans circa 1982 // Cryobiology.— 1983.— 20.— P. 119—128.
12. Rall W. F., Fahy G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification // Nature.— 1985.— 313.— P. 573—575.
13. Jutte N. H. P. M., Heijse P., Jansen H. G. et al. Vitrification of human islets of Langerhans // Cryobiology.— 1987.— 24.— P. 403—411.

Эразмский ун-т,
г. Роттердам, Нидерланды

Перевод с англ. З. В. Линевиц
Поступила 21.03.88

N. H. P. M. JUTTE, P. HEIJSE, G. J. BRUINING, G. N. ZEILMAKER CRYOPRESERVATION OF MOUSE, MONKEY AND HUMAN ISLETS OF LANGERHANS FOR TRANSPLANTATION PURPOSE

Erasmus University, Rotterdam

Transplantation of islets of Langerhans is a possible future therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. In contrast to total pancreas, isolated islets of Langerhans can be treated prior to transplantation to reduce their immunogenicity. Thus, the success rate in allotransplantation of islets can be increased. The isolation of large amounts of islets from human pancreas is still a problem and islets from different donors have to be collected and stored by cryopreservation. In this paper we describe the methods used in our laboratory to isolate islets of Langerhans from rodent, monkey and human pancreas. The results are presented of successful cryopreservation of these islets. Firstly, by a more conventional freezing method using dimethylsulfoxide as cryoprotectant. Secondly, by vitrification using a mixture of cryoprotectants.

УДК 576.093

Т. М. Сидякина, Н. Д. Лозицкая

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS* *DENITRIFICANS* ВКМ В-892 ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ ЗАЩИТНЫХ СРЕДАХ

Изучена возможность использования лиофилизации и криоконсервации для длительного хранения грамотрицательных почвенных бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892. Установлено, что криоконсервация и хранение в жидком азоте являются наиболее эффективным методом консервации. Этот метод обеспечивает максимальный титр жизнеспособных клеток, близкий к 100 %, и его стабильность при -196°C .

В последние годы в микробиологии все большее применение находят такие методы длительного хранения микроорганизмов, как лиофилизация

и криоконсервация. Известно, что жизнеспособность микроорганизмов, подвергнутых консервации, зависит от многих факторов: условий культивирования, физиологического возраста культуры, плотности клеток в суспензии, состава защитной среды, режимов консервации, условий хранения и восстановления культуры после расконсервации, а также от видовых и штаммовых особенностей микроорганизмов [1—3,7]. Хорошо установленным фактом является повышенная чувствительность неспорообразующих грамотрицательных бактерий к стрессовым воздействиям, связанным с консервацией [3, 7]. Поэтому поиск оптимальных режимов хранения, обеспечивающих высокую жизнеспособность и стабильность свойств неспорообразующих грамотрицательных бактерий в течение длительного времени, по-прежнему остается актуальным.

Среди неспорообразующих грамотрицательных бактерий род *Pseudomonas* является чрезвычайно гетерогенным [10], в то же время отдельные виды псевдомонад имеют важное практическое значение и широко используются в биотехнологии, почвенной микробиологии и других областях. Некоторые представители этого рода требуют разработки специальных методов консервации и хранения, обеспечивающих сохранение не только жизнеспособности, но и физиолого-биохимических характеристик [1].

Целью настоящей работы явилась оптимизация условий консервации почвенной бактерии *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892, обладающей слабой устойчивостью при длительном хранении. Хотя видовое название *Ps. denitrificans* не принадлежит к числу одобренных [5], работа с этими бактериями ведется достаточно широко (см. например [1]). В то же время сравнительные данные о жизнеспособности при различных режимах лиофилизации в доступной литературе отсутствуют. По имеющимся сведениям [5], эта группа бактерий примыкает к кластеру *Ps. fluorescens*, одному из важнейших представителей рода *Pseudomonas* [11, 12].

Объектом исследования служила грамотрицательная подвижная почвенная бактерия *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892. Перед консервацией культуру выращивали на разведенном водой (1 : 10) мясо-петонном бульоне (МПБ) в условиях повышенной аэрации на качалке (200 об/мин) до начала стационарной базы роста в течение 28 ч при температуре $26 \pm 28^\circ\text{C}$. Для получения исходной концентрации 10^9 — 10^{10} кл/мл (оптимальной по результатам предварительных опытов) клетки культуры центрифугировали в стерильных условиях (3000 об/мин) в течение 10 мин. В первой серии опытов отмытые от среды клетки помещали в 1 %-ную пептонную воду (пептон — 1 г, вода дистиллированная — 1 л). Суспензия клеток хранилась до консервации в течение 12—14 ч в холодильнике при 4°C . Во второй серии опытов отмытые от среды клетки помещали в стерильную водопроводную воду. Консервацию проводили сразу же после приготовления суспензии клеток. Для консервации во всех сериях опытов полученную суспензию клеток культуры разливали в ампулы из нейтрального стекла по 0,2 мл. Предварительно в суспензию клеток добавляли равные объемы защитных сред в случае лиофилизации или криопротекторов — в случае криоконсервации.

Лиофилизацию культуры осуществляли на центробежно-сублимационной установке фирмы «Edwards High Vacuum Company» (Англия) на следующих защитных средах: 1 — СЖА (10 % сахарозы, 1,5 % желатины, 0,1 % агара), 2 — 12 %-ный весовой раствор сахарозы, 3 — сепарированное обезжиренное молоко, 4 — бычья сыворотка с 5 % мезо-инозита. Для сравнения использовали суспензию клеток в стерильной водопроводной воде. Высушивание проводили в течение 5 ч на первичной сушке 30 РІ при остаточном вакууме 100 мк рт. ст., температуре рефрижератора -45°C и температуре сублиматора 22°C . На вторичной сушке 30 SІ культура досушивалась при комнатной температуре и остаточном вакууме 50 мк рт. ст. в течение 3 ч, затем ампулы с лиофилизированными препаратами запаивались под вакуумом. Остаточная влажность культуры определялась на ИК-спектрометре «М-1106» фирмы «Анакон» (США) и составляла от 1,5 до 2,2 %.

Лиофилизированные препараты хранили при температуре 4 °С без доступа света. Регидратацию лиофилизированной культуры проводили путем добавления 0,2 мл стерильной водопроводной воды при комнатной температуре и выдерживали в течение 30 мин до высева на питательную среду.

Для лиофилизированной культуры бактерий проводили «тест на ускоренное хранение» при температурах 28 и 37 °С [4, 6] с целью определения возможного времени хранения при 4 °С и оценки эффективности использованных защитных сред. Известно, что падение жизнеспособности высушенных клеток зависит от температуры хранения и подчиняется уравнению Аррениуса:

$$Y_t = Y_0 \cdot e^{-Kt}$$

где Y_t — титр жизнеспособных клеток в момент времени t , Y_0 — титр жизнеспособных клеток в исходном контроле при $t = 0$, t — время наблюдений, $K = f(T)$ — коэффициент Аррениуса, являющийся линейной функцией температуры хранения.

Для любой температуры хранения коэффициент K может быть определен по формуле:

$$K_T = \frac{\lg Y_0 - \lg Y_t}{t}.$$

Зная коэффициент K для 3-х различных температур хранения и построив зависимость $K = f(T)$, можно определить для любой температуры возможное гарантированное время хранения, в течение которого титр жизнеспособных клеток упадет до низшего порогового значения.

Криоконсервация культуры проводилась путем непосредственного погружения в жидкий азот со скоростью охлаждения ~ 400 °С/мин (ультрабыстрый режим) и с использованием предварительного программного замораживания на замораживателе ЗПБ (производства ИПКиК АН УССР). Замораживание суспензии клеток осуществляли, используя двухступенчатое охлаждение, по двум программам: I — Программа 1: охлаждение от комнатной температуры до -10 °С со скоростью $V_1 = 1$ °С/мин, от -10 до -140 °С со скоростью $V_2 = 10$ °С/мин; II — Программа 9: охлаждение от комнатной температуры до -10 °С со скоростью $V_1 = 10$ °С/мин, от -10 до -140 °С со скоростью $V_2 = 30$ °С/мин. После достижения температуры -140 °С ампулы с замороженной суспензией клеток культуры опускали непосредственно в жидкий азот и хранили при -196 °С. В опытах по криоконсервации культуры использовали следующие криопротекторы: 1 — 10 %-ный раствор глицерина в дистиллированной воде; 2 — 20 %-ный раствор глицерина; 3 — 12 %-ный раствор сахарозы. Для сравнения использовали также суспензию клеток культуры в стерильной водопроводной воде. Диметилсульфоксид (ДМСО) даже в 5 %-ной концентрации оказался токсичным для данного вида бактерий и использовался только на стадии предварительных опытов. Для восстановления культуры после криоконсервации применяли быстрое оттаивание в теплообменном размораживателе при температуре 37 °С с покачиванием в течение 1 мин для улучшения теплообмена.

Жизнеспособность культуры определяли методом предельных разведений путем высева на плотную питательную среду (МПА) с последующим подсчетом числа выросших колоний. Во всех опытах брали 15-кратные повторности (для каждого варианта опыта контроль производился из 3-х ампул посевом на 5 чашек из каждой ампулы). Титр жизнеспособных клеток определяли как в процентном отношении числа колониеобразующих единиц после воздействия режимов консервации к их числу до консервации, так и в значениях десятичного логарифма числа жизнеспособных клеток $\lg Y$. Результаты обрабатывались статистически и для каждого значения определялся доверительный интервал.

В табл. 1 представлены данные о жизнеспособности культуры *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 после консервации суспензии клеток в пептонной воде. Контроль жизнеспособности культуры осуществляли через 1 и 4 мес. хранения. Как видно из представленных данных, наиболее высокий титр жизнеспособных клеток ~ 60 % был получен при криоконсервации культуры по Программе 1 (со скоростью охлаждения 1 °С/мин) в 20 %-ном растворе глицерина. При криоконсервации по Программе 9 (со скоростью охлаждения 10 °С/мин) наиболее стабильные результаты были получены с использованием 10 %-ного глицерина. Эти данные подтверждают имеющиеся в литературе [8] сведения о том, что при криоконсервации клеточных суспензий титр жизнеспособных клеток может быть повышен при увеличении концентрации проникающего криопротектора (глицерина) и снижении скорости охлаждения на первом этапе замораживания. Для непроникающего криопротектора, 12 %-ного раствора сахарозы, были получены более низкие значения жизнеспособности: 5—17 % для всех исследованных скоростей охлаждения. Существенно, что для всех вариантов криоконсервации культуры титр жизнеспособных клеток оставался постоянным при хранении в жидком азоте (в пределах точности определения жизнеспособности).

Таблица 1

Жизнеспособность культуры бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 после лиофилизации и криоконсервации суспензии клеток в пептонной воде

Способ консервации	Режим консервации	Защитная среда, криопротектор	Титр жизнеспособных клеток					
			До консервации		1 мес.		4 мес.	
			lgY ₀	%	lgY ₁	%	lgY ₂	%
Лиофилизация	С предварительным центрифугированием	12 % сахароза	10,08	100	9,17	9—17	8,65	3—4
		СЖА	10,08	100	8,80	3—7	9,0	6—11
		10 % молоко	9,69	100	8,24	0,8—2	7,24	0,08—0,2
Криоконсервация	Ультрабыстрый (~400° С/мин)	12 % сахароза	10,08	100	8,95	5—11	9,22	8—15
		10 % глицерин	10,11	100	9,32	11—26	9,39	15—25
		20 % глицерин	10,11	100	9,62	27—36	9,40	12—38
	Программа 1 (1° С/мкн)	12 % сахароза	10,08	100	9,15	8—16	9,46	16—25
		10 % глицерин	10,11	100	9,25	10—21	9,40	17—24
		20 % глицерин	10,11	100	9,79	43—54	9,79	38—63
	Программа 9 (10° С/мин)	12 % сахароза	10,08	100	8,84	5—7	8,84	5—7
		10 % глицерин	10,11	100	9,76	39—53	9,72	36—48
		20 % глицерин	10,11	100	7,69	—	9,74	39—50

Лиофилизация культуры бактерий на всех исследованных защитных средах приводила к значительному снижению титра жизнеспособных клеток как сразу после консервации, так и при последующем хранении. Для всех вариантов защитных сред жизнеспособность культуры после лиофилизации была в 4—5 раз ниже, чем при криоконсервации. Наиболее стабильные результаты были получены при лиофилизации культуры в СЖА. Хотя максимальный титр жизнеспособных клеток при лиофилизации в 12%-ной сахарозе был значительно выше сразу после консервации и составлял ~ 17 %, однако за 4 мес. хранения при 4 °С титр упал до 3—4 %. При лиофилизации культуры в сепарированном молоке титр жизнеспособных клеток сразу после лиофилизации составил 2—6 % и упал в 10 раз в течение 4 мес. наблюдений, что говорит о непригодности этой защитной среды для лиофилизации данной культуры бактерий. Из дальнейших опытов сепарированное молоко было исключено и заменено бычьей сывороткой с 5 % мезоинозита.

Во второй серии опытов лиофилизация культуры в среде СЖА обеспечивала более высокий титр жизнеспособных клеток, 14—24 % сразу после высушивания, лиофилизация в среде с бычьей сывороткой с 5 % мезо-инозита, 6—13 %, однако «тест на ускоренное хранение», проведенный для двух защитных сред в течение 3-х недель наблюдений при температурах 4, 28 и 37 °С, показал, что для длительного хранения исследованной культуры бактерий наиболее предпочтительной защитной средой является бычья сыворотка с 5 % мезо-инозита. Результаты этого опыта представлены в табл. 2, а на рис. 1 (а, б) в виде графиков зависимости логарифма жизнеспособности от времени $\lg Y = f(t)$ представлены данные о падении титра жизнеспособных клеток, лиофилизированных на бычьей сыворотке с 5 % мезо-инозита и на СЖА и хранившихся при 4, 28 и 37 °С. Из анализа данных следует, что сыворотка с 5 % мезо-инозита обеспечивает меньшее падение жизнеспособности лиофилизированной культуры при хранении. Расчеты показали, что титр жизнеспособных клеток культуры, лиофилизированной на сыворотке с 5 % мезоинозита, снизится до 10^2 кл/мл за 15 мес. хранения при 4 °С, в то время как при лиофилизации на СЖА такое падение титра будет происходить за 5 мес. хранения при этой температуре.

Таблица 2
Результаты «теста на ускоренное хранение» культуры бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892

Защитная среда	Температура хранения, °С	Титр жизнеспособных клеток		
		1 сут	2 недели	3 недели
		$\lg Y_0$	$\lg Y_1$	$\lg Y_2$
Бычья сыворотка с инозитом	4	8,19	8,05	7,75
	28	8,19	6,84	6,62
	37	8,19	6,67	6,48
СЖА	4	8,13	7,74	7,02
	28	8,13	5,35	3,99
	37	8,13	4,41	3,22

На рис. 2 представлены результаты расчетов коэффициента K уравнения Аррениуса [4, 6]. Как видно из рис. 2, экспериментальные значения $\lg K = f\left(\frac{1}{T} \cdot 10^3\right)$, соответствующие использованным нами температурам 4, 28 и 37 °С, легли на одну прямую, что подтверждает возможность приме-

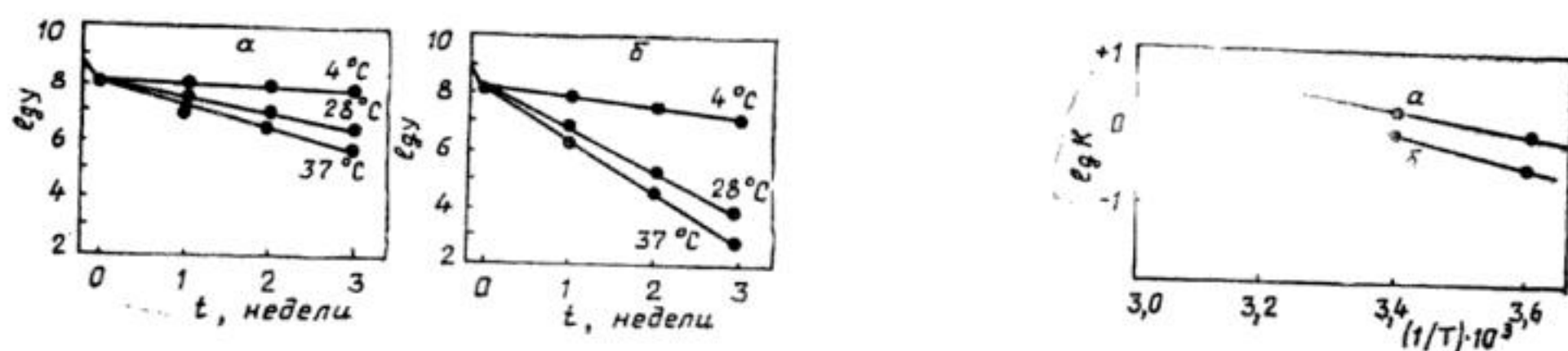


Рис. 1. Результаты «теста на ускоренное хранение» культуры бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 после лиофилизации в различных защитных средах: а — бычья сыворотка, б — СЖА

Рис. 2. Результаты расчетов коэффициента K уравнения Аррениуса: а — бычья сыворотка с инозитом, б — СЖА

нения теста для прогнозирования времени хранения культуры. По этому графику можно определить коэффициент K для любой температуры хранения.

Результаты второй серии опытов по консервации суспензии клеток культуры бактерий в водопроводной воде представлены в табл. 3. Условия подготовки культуры к консервации, как и следовало ожидать, оказывают большое влияние на устойчивость культуры к стрессовым воздействиям при консервации. В экспериментах второй серии изменение условий подготовки культуры (суспензия клеток в водопроводной воде подвергалась консервации сразу через 28 ч роста) отразилось на устойчивости к стрессу,

вызываемом замораживанием. Если в первой серии опытов с выдерживанием клеток в 1 %-ной пептонной воде при 4 °С в течение 12—14 ч максимальный процент жизнеспособных клеток не превышал 60 % при всех использованных скоростях замораживания и криопротекторах, то во второй серии опытов он составил 59—93 % для Программы 1 и 12 %-ной сахарозы и 55—100 % для ультрабыстрого режима с этим же криопротектором.

Таблица 3

Жизнеспособность культуры бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 после лиофилизации и криоконсервации суспензий клеток в водопроводной воде

Способ консервации	Режим консервации	Защитная среда, криопротектор	Титр жизнеспособных клеток							
			До консервации		1 сут		1,5 мес.		6 мес.	
			lg Y ₀	%	lg Y ₁	%	lg Y ₂	%	lg Y ₃	%
Лиофилизация	С предварительным центрифугированием	Сыворотка с инозитом СЖА Н ₂ О	9,27	100	8,2	6—13	7,02	2—4	Не определяли — » — — » —	
			8,97	100	8,24	14—24	7,75	0,8—2,0		
			9,30	100	8,66	13—26	6,83	0,4—1,1		
Криоконсервация	Ультрабыстрый (400 °С/мин)	12 % сахароза 20 % глицерин Н ₂ О	9,71	100	9,65	55—100	9,71	59—94	9,34	66—85
			9,22	100	8,96	28—60	9,65	68—100	9,3	30—62
			9,68	100	9,71	69—100	9,61	82—100	9,87	84—100
	Программа 1 (1 °С/мин)	12 % сахароза 20 % глицерин	9,71	100	9,77	59—93	9,90	87—100	9,83	64—100
			9,22	100	8,16	18—76	8,56	20—64	7,75	Не определяли
		Н ₂ О	9,68	100	9,53	51—82	9,52	62—88	9,91	59—89
	Программа 9 (10 °С/мин)	12 % сахароза 20 % глицерин Н ₂ О	9,71	100	9,12	59—93	9,14	37—91	8,93	55—92
			9,22	100	8,73	5—22	9,03	5—96	8,93	5—17
			9,68	100	9,75	93—100	9,61	82—100	9,81	94—100

Неожиданным результатом этой серии опытов явился высокий уровень жизнеспособности, близкий к 100 %, для всех вариантов криоконсервации культуры бактерий в водопроводной воде. Даже для ультрабыстрого режима охлаждения (со скоростью ~ 400 °С/мин) жизнеспособность бактерий составляла 69—100 %. Контроли жизнеспособности культуры через 1,5 и 6 мес. хранения в жидком азоте показали постоянство титра жизнеспособных клеток при криоконсервации и хранении при —196 °С.

Выводы. Проведенные исследования жизнеспособности культуры бактерий *Pseudomonas denitrificans* ВКМ В-892 при лиофилизации и криоконсервации в различных средах показали, что условия подготовки культуры к консервации имеют существенное значение для сохранения высокого титра жизнеспособных клеток. Оптимальным является использование концентрированной суспензии клеток в водопроводной воде (10⁹—10¹⁰ кл/мл) и проведение консервации непосредственно после достижения культурой стационарной фазы роста. Криоконсервация культуры как ультрабыстрым способом, так и с использованием предварительного программного замораживания имеет существенные преимущества перед лиофилизацией. Титр жизнеспособных клеток при криоконсервации культуры в 4—5 раз выше, чем при лиофилизации, и сохраняется на этом уровне при длительном хранении в жидком азоте. Для исследованного вида подвижных грамотрицательных почвенных бактерий может быть рекомендован ультрабыстрый режим

замораживания суспензии клеток в водопроводной воде и хранение при -196°C . Жизнеспособность культуры бактерий при криоконсервации в этих условиях близка к 100 % и сохраняется на этом уровне при длительном хранении в жидком азоте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аркадьева З. А., Козлова Е. И., Коваленко Т. В. Влияние фазы развития культуры и состава среды на выживаемость лиофилизированных клеток *Pseudomonas denitrificans* // Прикл. биохимия и микробиология. — 1975. — 11, вып. 4. — С. 519—522.
2. Аркадьева З. А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Науч. докл. высшей школы : Биол. науки. — 1983. — № 4. — С. 93—105.
3. Сидякина Т. М. Консервация микроорганизмов. — Пущино : Изд. ОНТИ БИ АН СССР, 1985. — 63 с.
4. Banno J., Sakane T. Prediction of prospective viability of L-dried cultures of bacteria after long-term preservation // I. F. O. Res. Commun. — 1981. — 10, N 1. — P. 33—38.
5. Bergey's Manual Systemic Bacteriology, 9th Ed. — Baltimore, 1986. — 271 p.
6. Griffin C. N., Cook E. S., Mehafley M. A. Prediction of the stability of freeze-dried *Fuzobacterium moriferum* proficiency testing samples by accelerated storage tests // Cryobiology. — 1981. — 18, N 5. — P. 420—425.
7. Heckly R. J. Preservation of microorganisms // Adv. Appl. Microbiol. — 1978. — 24, N 1. — P. 1—53.
8. Low Temperature Preservation in Medicine and Biology / Eds. M. J. Ashwood—Smith, J. Farrant. — London : Pitman Medical, 1980. — 323 p.
9. Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods // Eds. B. S. Kirsop, J. J. Snell. — New York : Acad. Press, 1984. — 207 p.
10. The Prokaryotes. A Handbook on Habits, Isolation and Identification of Bacteria. — Berlin, New York : Springer—Verlag, 1981. — P. 653—778.
11. Palleroni N. J. Genus *Pseudomonas* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — Baltimore : Williams and Wilkins, 1984. — P. 141—199.
12. Wilkinson S. G. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylenediaminetetraacetic acid // J. Bacteriol. — 1970. — 104. — P. 1035—1044.

Всесоюзная коллекция микроорганизмов;
Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов
АН СССР, г. Пущино;
МГУ им. М. В. Ломоносова

Поступила 12.08.88

T. M. SIDYAKINA, N. D. LOZITSKAYA

THE VIABILITY OF BACTERIA *PSEUDOMONAS DENITRIFICANS* BKM B-892 SUBJECT TO LYOPHILIZATION AND CRYOPRESERVATION IN DIFFERENT PROTECTIVE MEDIA

All-Union Collection of Microorganisms;

Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the USSR Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region;

M. V. Lomonosov State University of Moscow;

The possibility of using lyophilization and cryopreservation for long-term storage of gram-negative soil bacteria *Pseudomonas denitrificans* BKM B-892 was studied. Freezing and storage in liquid nitrogen was found to be the most effective method of preservation. It provides a maximum titer of the viable cells nearly 100 % which is stable at -196°C .

УДК 616.981.452 : 615.37 : 57.086.132

Н. В. Лопатина, А. Н. Терентьев, Л. А. Наталич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДХОД К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕСТА «УСКОРЕННОГО ХРАНЕНИЯ» ДЛЯ ПРОГНОЗА СРОКОВ ГОДНОСТИ ЖИВОЙ СУХОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ

Показана возможность различных методических подходов к получению прогнозов сроков годности живой сухой чумной вакцины. Прогнозируемые значения сроков годности сопоставляли с данными прямого эксперимента. Выявлены различия в прогнозах, полученных с применением разных методических подходов. Обосновывается выбор методов проведения теста с учетом характера биологического агента и его назначения.

Прогнозирование сроков годности живой сухой чумной вакцины с применением метода «ускоренного хранения» имеет большое научно-практическое значение.

Теоретической основой этого метода являются положения, объясняющие основные закономерности кинетики тепловых химических процессов в неживой природе. Возможность использования этих положений в термоинактивации микроорганизмов и других биологических систем была доказана многочисленными исследователями [1, 2, 5, 7, 8]. Работами этих авторов было показано, что гибель большого числа микроорганизмов под влиянием высоких температур в основном подчиняется кинетическим закономерностям реакций 1-го порядка, которые характерны для превращений химических веществ. Эти закономерности описываются кинетическим уравнением 1-го порядка и уравнением Аррениуса.

Достоверность прогноза, как указывают Д. Бэрбэри, Ф. Томпсон и С. Смит [6], обеспечивается выполнением ряда условий.

Цель работы — выбор оптимальных условий реализации теста «ускоренного хранения» для получения достоверного прогноза сроков годности вакцины *EV*.

В работе использованы экспериментальные серии живой сухой чумной вакцины, лиофилизированные с применением защитной среды, состоящей из 10 % сахарозы, 1 % желатины и 1 % тиомочевины. Прогноз сроков годности вакцины осуществляли с использованием метода «ускоренного хранения» в его основном и экспресс-варианте [3, 4]. В опыте использовано 6 температурных режимов (27, 37, 47, 57, 67, 77 °C), в которых изучали динамику снижения биологической активности вакцины. Для этого через определенные промежутки времени высевали 100 и 1000 микробных клеток *Y. pestis EV* на агар Хоттингера, pH 7,2. Критерием биологической активности служило число жизнеспособных клеток *Y. pestis EV*, учитываемое после лиофилизации. Время наблюдения за снижением активности вакцины зависело от температуры хранения и составляло от 6 ч до 1,5 мес.

Константы скоростей термоинактивации для каждой из взятых в опыт температур определяли по формуле, вытекающей из логарифмированного кинетического уравнения 1-го порядка

$$K = \frac{\lg y_0 - \lg y}{t \cdot 0,434} \quad (1),$$

где $\lg y_0$ — логарифм исходной выживаемости микробных клеток в вакцине после лиофилизации, $\lg y$ — логарифм выживаемости через некоторое время, 0,434 — модуль перехода от натуральных логарифмов к десятичным.

Эти же показатели рассчитывали с использованием экспресс-методики, ограничивающей набор температур (37, 47, 57 °C) и время наблюдения за динамикой снижения микробных клеток в процессе хранения (от 2 до 14 сут).

В аррениусовских координатах ($\lg K$) и ($1/T$) построен график, на котором путем экстраполяции прогнозированы значения констант при температуре хранения 4 °C. Прогноз осуществлялся с использованием аррениусовских прямых, построенных по значениям констант для 6 высокотемпературных точек и для каждой 3 из 6 взятых в опыт точек, варьируемых в различных сочетаниях. Согласно экспресс-методике, прогнозируемые значения констант при 4 °C рассчитывали с применением правила Вант-Гоффа.

Достоверность прогнозируемых величин определяли методом постановки прямого эксперимента, высевая на агар Хоттингера 100 и 1000 микробных клеток через 100 сут хранения вакцины при 4 °C. Для прогноза сроков 50 %-ного снижения активности вакцины использовали формулу:

$$T = \frac{0,691}{K} \quad (2),$$

где K — константа скорости термоинактивации вакцины с возрастанием температур хранения.

Константы скоростей термоинактивации вакцины, рассчитанные с применением экспресс-методики, несколько отличались от констант, полученных с использованием основной методики (табл. 1). По значениям логарифмов констант построен график Аррениуса, являющийся своеобразной прогностической моделью (рисунок). Прогнозируемые на графике значения констант для 4°C и рассчитанные на их основе сроки 50 %-ного снижения биологической активности вакцин представлены в табл. 2. Обращают на себя внимание колебания значений прогнозируемых констант в зависимости от метода прогнозирования. Соответственно различаются между собой и сроки 50 %-ного снижения активности вакцины при 4 °С. Результаты прямого эксперимента, позволяющие оценить достоверность прогноза, приведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, прогноз жизнеспособности микробных клеток *Y. pestis EV*, проведенный с использованием графика Аррениуса по 6 точкам, дает наибольшее совпадение с результатами, полученными в эксперименте. В меньшей мере соответствует экспериментальным данным прогнозируемое значение выживаемости микробных клеток *Y. pestis EV*, полученное с применением графика Аррениуса, построенного по 3 точкам, и с использованием правила Вант-Гоффа.

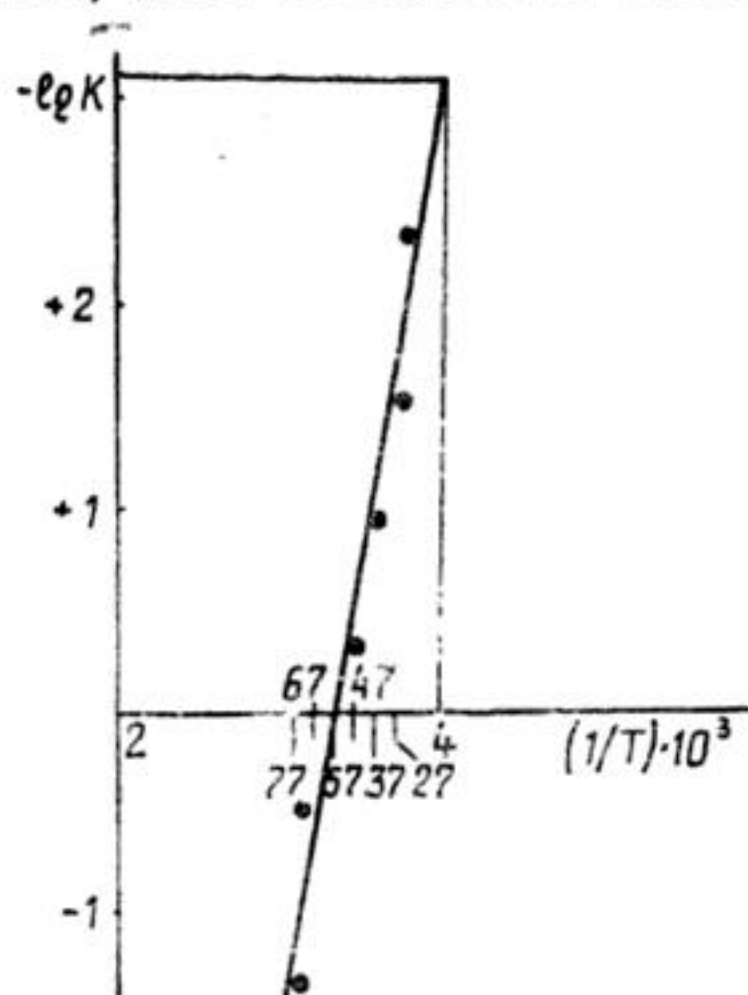


График Аррениуса для прогнозирования сроков годности живой сухой чумной вакцины

Учитывая трудоемкость постановки теста, многими авторами при его реализации используется 3 высокотемпературные точки. Как показано в табл. 4, диапазон и значение этих температур оказывают существенное влияние на объективность прогноза. Наибольшее совпадение с прогнозом, полученным по значениям констант для 6 температурных точек, обнаруживают данные, рассчитанные для температур 47, 57, 67 и 57, 67, 77 °С. Использование этих сочетаний температур позволит не только получить достоверный прогноз сроков год-

Таблица 1

Значение констант скоростей термоинактивации вакцины при хранении в условиях повышенных температур

Температура, °С	Константа скорости термоинактивации	
	По основной методике	По экспресс-методике
27	0,028	—
37	0,144	—
47	0,499	0,140
57	1,674	1,07
67	2,8	—
77	21,0	—

Таблица 2

Прогнозируемые сроки хранения живой сухой чумной вакцины при 4° С

Метод прогнозирования	Значение прогнозированной константы	Срок 50 %-ного снижения активности вакцины, сут
График Аррениуса (по 6 точкам)	0,0007	987
График Аррениуса (по 3 точкам)	0,001	691
По правилу Вант-Гоффа	0,00047	1470

Таблица 3

Прогнозируемые и экспериментальные значения жизнеспособности вакцинного штамма чумного микроба через 100 сут хранения вакцины при 4° С

Метод прогнозирования	Исходное число клеток в вакцине после сушки	Число живых клеток через 100 сут хранения
График Аррениуса (по 6 точкам)	25,5	19,8
График Аррениуса (по 3 точкам)	25,5	21,3
Правило Вант-Гоффа	25,5	25,0

Таблица 4

Прогноз сроков годности живой сухой чумной вакцины при использовании различных сочетаний высокотемпературных точек

Сочетание температур	Константа скорости термоин-активации при 4° С	Срок 50 %-ного снижения числа микроб-ных кле-ток при 4° С
27, 37, 47	0,001	691
27, 37, 57	0,001	691
27, 37, 67	0,0015	460
27, 37, 77	0,001	691
27, 47, 57	0,0015	460
27, 47, 67	0,0017	406
27, 47, 77	0,0014	493
27, 57, 67	0,0015	460
27, 57, 77	0,0011	628
27, 67, 77	0,0011	628
37, 47, 57	0,001	691
37, 47, 67	0,0028	246
37, 47, 77	0,0015	460
37, 57, 67	0,0015	460
37, 57, 77	0,0017	406
47, 57, 77	0,0007	987
47, 57, 77	0,001	691
57, 67, 77	0,00063	1096
27, 37, 47, 57, 67, 77	0,0007	987

ности вакцины, но и сократить срок проведения теста до 4—5 сут вместо 1,5 мес.

Как показали данные прямого эксперимента, прогноз сроков годности вакцины с использованием правила Вант-Гоффа значительно уступает прогнозу, полученному на модели графика Аррениуса.

Таким образом, проведенные исследования показали возможность многих подходов, как общепризнанных, так и экспериментальных, к получению прогнозов сроков годности сухой чумной вакцины. Наиболее достоверный прогноз был получен при использовании в тесте «ускоренного хранения» большого числа точек, охватывающих широкий диапазон температур.

Если полученные расхождения в прогнозах сроков годности вакцины могут не иметь существенного значения при оценке различных этапов технологического процесса, то в случае выпуска вакцины в практику здравоохранения прогноз

должен быть достаточно достоверным. Поэтому существующие методические подходы к проведению теста «ускоренного хранения», основанные на общепризнанных теоретических положениях, требуют конкретизации с учетом характера биологического объекта и его назначения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов В. Д., Филиппова С. И., Муравьева С. А. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actynomyces parcellus*, основанное на методе «ускоренного хранения» // Микробиология. — 1977. — 46, № 2. — С. 427—431.
2. Мунблит В. Я., Тальрозе В. Л., Трофимов В. И. Термоинактивация микроорганизмов. — М. : Наука, 1985. — 248 с.
3. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания—высушивания биологических препаратов. — М. : Б. и., 1981. — 34 с.
4. Методика определения термостабильности живых сухих вакцин и прогнозирование их жизнеспособности в процессе хранения. — Ставрополь : Б. и., 1985. — 10 с.
5. Тутова Э. Г., Федорова Т. Л. Кинетика инактивации микробной биомассы // Докл. АН БССР. — 1972. — 19, № 8. — С. 749—752.
6. Barbaree J. M., Thompson F., Smith S. J. Use of thermal stability studies to compare *Bacterioides fragilis* liophilized in skin milk and polyvinylpyrrolidone solution // Cryobiology. — 1982. — 18, N 1. — P. 92—98.
7. Griffin D. M., Cook E. S., Mehaffey M. A. Predicting the stability of freeze-dried *Fusobacterium mortiferum* proficiency testing samples by accelerated storage tests // Ibid. — 1981. — 18, N 4. — P. 420—425.
8. Mitic S., Otenhajmer J., Damjanovic V. Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test // Ibid. — 1974. — 11, N 1. — P. 116—120.

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский
противочумный ин-т

Поступила 04.07.88

N. V. LOPATINA, A. N. TERENTYEV, L. A. NATALICH

EXPERIMENTAL APPROACH TO USE THE ACCELERATED STORAGE TEST FOR ESTIMATION OF THE SHELF-LIFE OF ALIVE LYOPHILIZED PLAQUE VACCINE

Order of the Red Banner of Labour Antiplaque Research Institute of Rostov-on-Don

The possibility of using various approaches to predict the shelf-life of alive lyophilized plaque vaccine has been demonstrated. Calculated values of the shelf-life were compared with experimental results. Differences have been found in predictions by different methods. The choice of estimation method is substantiated taking into account the nature of biological agent and the purpose of its utilization.

УДК 57.043

В. Л. Тихонова, В. П. Викторов, И. Ю. Макеева, С. Г. Яшина

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ХРАНЕНИЯ НА ЛАБОРАТОРНУЮ ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН ДИКОРАСТУЩИХ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ.

II. СЕМЕНА ВИДОВ РОДА *Campanula* L. (КОЛОКОЛЬЧИК)

Изучено влияние криоконсервации семян 9 видов рода колокольчик (35 популяций) на сохранение ими всхожести и жизнеспособности. Семена всех изученных видов хорошо переносят замораживание до -10 и -196 °C. Для надежного сохранения генофонда вида необходима криоконсервация генетически разнородного материала из разных ценопопуляций, из разных экологических условий. Длительное хранение в жидком азоте (1 год) по сравнению с 1 мес. идентично или способствует повышению всхожести семян (*Campanula cervicaria*, *Campanula glomerata*).

Растения видов рода колокольчик весьма декоративны и численность многих из них за последнее время сильно сокращается. Виды этого рода уже взяты под союзную охрану [6], входят в «Красные книги» союзных республик, крупных регионов страны и в списки охраняемых растений административных областей Советского Союза. Для восстановления численности редких и исчезающих видов необходимо уметь сохранять их семена без потери всхожести и генетической целостности, что возможно путем их криоконсервации. Работы по замораживанию семян дикорастущих видов, нуждающихся в охране и восстановлении численности, только начинаются [16], и экспериментальные данные этого плана чрезвычайно актуальны для создания банка долговременного хранения геномов редких и исчезающих видов.

В данной статье обобщены экспериментальные материалы по реакции на замораживание семян 9 видов рода *Campanula* L. (колокольчик), произрастающих в Московской области. Это позволило не только оценить реакцию семян отдельных видов на криоконсервацию (подобных данных в литературе нет), но и сравнить между собой по этой реакции таксономически близкие виды. Объектами работы были следующие виды:

1. *Campanula bononiensis* L. — колокольчик (к.) болонский — многолетний травянистый поликарпик [9], охраняется в Литве [10], Ярославской области [2] и т. д.

2. *C. cervicaria* L. — к. жестковолосый (к. олений) — декоративный травянистый монокарпик, очень редко встречающийся в природных условиях; охраняется в Карелии [5], Архангельской [8] и др. областях.

3. *C. glomerata* L. — к. скученный — травянистый поликарпик, широко распространенный луговой вид [9], декоративный [17], лекарственный [15], медонос.

4. *C. latifolia* L. — к. широколистный. Очень декоративный травянистый поликарпик, охраняется почти по всему ареалу: включен в «Красные

книги» Белоруссии [4] и Карелии [5], взят под охрану в Удмуртии [12], в Горьковской, Псковской [11], Ивановской, Владимирской [18], Московской [14] и др. областях.

5. *C. patula* L. — к. раскидистый — травянистый монокарпик, широко распространенный луговой вид с некрупными многочисленными цветками [9].

6. *C. persicifolia* L. — к. персиколистный — очень декоративный травянистый поликарпик, взят под охрану почти по всему ареалу: в Белоруссии [4], в Московской [14], Ивановской, Владимирской [18], Калининградской [7] областях, на Урале и в Приуралье [1].

7. *C. rapunculoides* L. — к. рапунцелевидный — травянистый поликарпик, охраняющийся в Карелии [5], Сибири [13], Ивановской, Владимирской [18] и др. областях.

8. *C. rotundifolia* L. — к. круглолистный — травянистый поликарпик, широко распространенный декоративный луговой вид с многочисленными цветками, имеющий лекарственное применение [9, 15].

9. *C. trachelium* L. — к. крапиволистный — травянистый поликарпик, очень декоративный вид, охраняется в Карелии [5], Сибири [13], Удмуртии [12], Московской [14], Ярославской [10] и др. областях.

Семена всех видов собирались в природных ценопопуляциях Московской области и в питомнике размножения (с грядками на солнце и в тени). Размеры семян определяли измерением 30 шт. в каждом образце, массу взвешиванием 100 шт. в 4—5-кратной повторности. Влажность определялась путем высушивания семян в 3—5 повторностях по 100 шт до постоянного веса. Семена для опытов специально не подсушивали; брали с равновесной влажностью, т. е. с той, которую они приобрели сами при хранении в комнатных условиях в течение 1—2 мес. после сбора. Определение лабораторной всхожести проводили в чашках Петри на фильтровальной бумаге с тонкой подстилкой ваты, по 50 шт. в одной чашке, в 5-кратной повторности.

Температурные режимы определения всхожести видоспецифичны: семена к. персиколистного и к. раскидистого легко прорастают в комнатных условиях ($18 \div 22^\circ\text{C}$) и обычно проращивались до окончания опыта, т. е. пока семена или прорастали или сгнивали (нежизнеспособные). У всех остальных видов семена весьма разнородны по периоду покоя: для проращивания семян применялись режимы с переменной температурой ($30^\circ\text{C} — 8\text{ ч}$ и $5^\circ\text{C} — 16\text{ ч}$), однократные и многократные обработки фитогормонами (гибберелловая кислота — ГК₃ 500 мг/л). У семян с затрудненным прорастанием для полного проращивания требуются многие месяцы, поэтому опыт часто прекращался, когда часть семян оставалась еще непроросшей, но они были живыми и твердыми, потенциально жизнеспособными. Результаты определения всхожести по этим видам представлены в виде дроби, в числителе которой — всхожесть, % (среднее арифметическое с ошибкой из 5 повторностей), в знаменателе — сумма всхожих и непроросших, но потенциально жизнеспособных семян [3].

Замораживание семян проводили в герметично закупоренных пластмассовых ампулах: до температуры -196°C семена доводили опусканием непосредственно в жидкий азот (БЗ — быстрое замораживание, $700^\circ\text{C}/\text{мин}$) и медленным охлаждением со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -70°C , а затем перенесением в жидкий азот (медленное замораживание — МЗ). Отогревали семена всегда одинаково: вынутые из азота ампулы размораживались при комнатной температуре.

Размеры, масса 100 шт. и равновесная влажность семян изучаемых видов колокольчиков сгруппированы в табл. 1. Семена мелкие: в длину 0,6—1,8 мм; в ширину — 0,4—0,9 мм, масса 100 шт. — от 4 до 21 мг. Влажность семян в комнатных условиях (равновесная) — 3—6 %. В пределах одного образца размеры семян варьируют гораздо больше, чем масса и влажность; морфологическая неоднородность семян отмечается как в природных популяциях, так и в питомнике. Определение лабораторной всхожести семян после трех вариантов замораживания проводилось по 3 видам дважды

(к. скученный, к. персикolistный, к. рапунцелевидный), по остальным — один раз (параллельно посеву в грунт). Сроки проращивания и его результаты приведены в табл. 2. Замораживание при сверхнизких температурах достоверно снизило всхожесть семян изученных популяций к. болонского ($t \frac{K}{MЗ} = 2,4$), к. крапиволистного ($t \frac{K}{MЗ} = 3,8$); температура -10°C достоверно повлияла на снижение всхожести семян к. крапиволистного ($t \frac{K}{MЗ} = 3,9$). Семена всех остальных видов перенесли замораживание при -10°C и -196°C без снижения лабораторной всхожести, а иногда даже повысили ее (к. круглолистный). Анализ вариационных коэффициентов всхожести семян в контроле и после разных режимов замораживания показал, что всхожесть семян варьирует в пределах одного образца как в контроле (V от 2,5 до 47,8 %), так и у замороженных семян (V от 1,2 до 45 %) в зависимости от вида. Влияние жидкого азота видоспецифично: у одних видов (к. персикolistный, к. рапунцелевидный) замораживание не влияет на степень варьирования ($V\%$) всхожести по повторностям; у других (к. крапиволистный) криоконсервация повысила $V\%$; у третьих (к. скученный, к. круглолистный, к. жестковолосый) даже снижается варьирование по всхожести между повторностями опыта.

Т а б л и ц а 1

Морфологические показатели семян видов рода *Campanula* (колокольчик)

Вид	Размеры семян, мм		Масса 100 шт., мг	Влажность, %
	Длина	Ширина		
<i>Campanula bononiensis</i>	$1,11 \pm 0,01$ 6,8 %	$0,56 \pm 0,01$ 8,1 %	$5,2 \pm 0,2$ 7,9 %	$5,2 \pm 0,2$ 5,6 %
<i>Campanula cervicaria</i>	$1,04 \pm 0,02$ 12,5 %	$0,56 \pm 0,02$ 15,7 %	$4,8 \pm 0,1$ 4,7 %	$5,4 \pm 0,1$ 3,6 %
<i>Campanula glomerata</i>	$1,08 \pm 0,02$ 9,1 %	$0,52 \pm 0,02$ 21,8 %	$4,4 \pm 0,4$ 20,2 %	$5,5 \pm 0,2$ 7,9 %
<i>Campanula latifolia</i>	$1,85 \pm 0,02$ 8,2 %	$0,81 \pm 0,02$ 11,3 %	$26,4 \pm 0,5$ 4,3 %	$5,7 \pm 0,1$ 4,4 %
<i>Campanula patula</i>	$0,61 \pm 0,02$ 15,7 %	$0,40 \pm 0,01$ 15,4 %	$2,5 \pm 0,1$ 9,4 %	$3,4 \pm 0,2$ 9,1 %
<i>Campanula persicifolia</i>	$0,67 \pm 0,02$ 12,4 %	$0,43 \pm 0,01$ 13,8 %	5 ± 0 0 %	$5,1 \pm 0,1$ 2,1 %
<i>Campanula rapunculoides</i>	$1,63 \pm 0,02$ 6,7 %	$0,89 \pm 0,02$ 10,3 %	$20,8 \pm 0,2$ 1,7 %	$5,1 \pm 0,1$ 3,7 %
<i>Campanula rotundifolia</i>	$0,85 \pm 0,02$ 15,9 %	$0,46 \pm 0,01$ 18,3 %	$4,9 \pm 0,1$ 4,9 %	$5,7 \pm 0,1$ 3,9 %
<i>Campanula trachelium</i>	$1,43 \pm 0,03$ 11,6 %	$0,70 \pm 0,02$ 12,2 %	$18,5 \pm 0,3$ 3,1 %	$5,3 \pm 0,2$ 6,6 %

П р и м е ч а н и е. Показатели представлены в виде дроби, в числителе которой среднее арифметическое с ошибкой ($M \pm m$), в знаменателе — вариационный коэффициент ($V\%$).

Изучение динамики появления всходов показало, что в изученных образцах замораживание не повлияло на динамику появления всходов у 6 видов из 9; у к. круглолистного замораживание сильно ускорило появление всходов, у к. крапиволистного БЗ и температура -10°C замедлили появление всходов, у к. болонского МЗ и -10°C замедлили появления всходов.

Весной 1987 г. (табл. 3) был проведен массовый опыт по замораживанию (режим БЗ, экспозиция в азоте 1 мес.) семян разного происхождения сбора 1986 г. по одному и тому же виду; время проращивания 1—2 мес., часть

Результаты проращивания семян видов рода *Campanula* после замораживания

Вид	Срок проращивания	Режим хранения (1 мес.)				t		
		5° С (конт- роль, К)	5° С — БЗ**	5° С — МЗ	5° С — I	К БЗ	К МЗ	К —10°С
<i>Campanula bononiensis</i>	30/X 1986— —16/II 1987	75±5* 78±3	62±7 65±4	58±5 68±7	58±8 76±4	1,5 2,6	2,4 1,3	1,8 0,4
<i>Campanula cervicaria</i>	27/X — 14/XI 1986	46±10 68±8	25±3 55±3	32±5 64±5	52±5 68±6	2,0 1,5	1,2 0,4	0,5 0
<i>Campanula glomerata</i>	7/V — 20/X 1986	43±6 66±6	48±9 79±5	38±9 65±9	37±7 52±7	0,5 1,7	0,5 0,1	0,7 1,5
	27/X — 13/XI 1986	60±6 77±5	54±1 67±3	58±5 76±3	61±6 71±6	1,0 1,7	0,2 0,2	0,1 0,8
<i>Campanula latifolia</i>	24/XII 1986 — — 23/I 1987	59±5 98±2	67±5 99±1	65±6 99±1	—	1,1 0,6	0,8 0,6	—
<i>Campanula patula</i>	6/III — 24/III 1987	98±1	90±4	—	—	1,9	—	—
<i>Campanula percisifolia</i>	7/V — 16/VII 1986	91±2	93±1	98±1	93±2	1,0	3,2	0,5
	23/X — 11/XI 1986	95±2 99±1	97±2 99±1	94±2 95±1	94±3 95±2	0,7 0	0,4 2,8	0,3 1,8
<i>Campanula rapunculoides</i>	13/V — 10/X 1986	67±8 91±2	54±3 87±3	55±9 85±3	55±8 91±2	1,5 1,1	1,0 1,7	1,1 0
	24/X — 14/XI 1986	77±3 96±1	76±3 93±2	79±3 96±1	76±3 92±1	0,2 1,3	0,4 0	0,2 4,0
<i>Campanula rotundifolia</i>	10/III — 16/VI 1987	68±4 88±3	96±1 100±0	—	—	6,8 4,0	—	—
<i>Campanula trachelium</i>	3/XI 1986 — — 9/IV 1987	43±1 94±3	37±3 88±3	31±3 88±4	23±5 81±2	1,9 1,4	3,8 1,2	3,9 3,6

Примечание. *В числителе дроби всхожесть, % ($M \pm m$), в знаменателе — сумма всхожих и непроросших живых семян ($M \pm m$), %; ** БЗ (быстрое замораживание) — семена в ампулах погружаются непосредственно в жидкий азот; МЗ (медленное замораживание) — семена в ампулах охлаждаются со скоростью 1° С/мин до —70° С, а затем переносятся в жидкий азот; t — критерий достоверности разницы (при пятикратной повторности разница достоверна при $t = 2, 3$ на 95%-ном доверительном уровне).

семян не успела выйти из периода покоя и прорасти. Этот опыт показал, что семена одного и того же вида, собранные в один и тот же год в разных природных популяциях и в разных экологических условиях, могут по-разному реагировать на криоконсервацию. Так, БЗ семян двух изученных популяций к. болонского не повлияло ни на их всхожесть, ни на жизнеспособность семян (хотя семена популяции в табл. 2 показали тенденцию к снижению всхожести). Семена, собранные в условиях питомника, близкого по экологическим условиям к природным популяциям (гряды на солнце, к. болонский — луговой вид), реагировали на криоконсервацию подобно природным.

Тенденция к снижению всхожести после замораживания семян к. жестковолосого (табл. 2) подтвердилась при изучении четырех популяций, но разница по всхожести между контролем и опытом достоверна только у одной популяции (пл. Садовая $t = 3,2$). У популяции из пос. Возрождение всхожесть семян даже имела тенденцию к повышению, но разница недостоверна ($t = 1,1$). На общее число жизнеспособных семян криоконсервация не влияет.

Семена к. скученного, собранные в 5 природных популяциях и в условиях питомника (гряды в тени, условия резко отличаются от природных),

Влияние криоконсервации на всхожесть и жизнеспособность семян видов рода *Campanula* (колокольчик)

Вид	Происхождение	Всхожесть, %			Жизнеспособность*, %		
		Контроль	<i>t</i>	БЗ, —196°С	Контроль	<i>t</i>	БЗ, —196°С
<i>C. bononiensis</i>	с. Хатунь Питомник (солнце)	75±7	0,1	76±6	79±5	0,2	80±3
		90±1	0,9	88±2	92±1	0,6	90±3
<i>C. cervicaria</i>	Питомник (тень) пос. Возрождение д. Сабурово пл. Садовая	44±6	1,4	53±5	50±6	0,3	47±6
		38±7	1,1	53±11	61±7	0,7	69±8
		63±7	0,6	57±8	70±8	0,2	72±4
		90±3	3,2	74±4	94±2	2,5	85±3
<i>C. glomerata</i>	д. Сабурово пос. Володарского д. Чулково с. Хатунь ГИЗЛ «Горки Ленинские» Питомник (тень)	67±4	1,1	73±4	73±4	2,2	83±2
		52±7	2,4	70±3	84±2	0	84±2
		64±5	1,6	82±10	92±1	0	92±1
		41±8	5,8	70±3	46±8	3,0	72±3
		73±4	0,7	78±6	86±4	0,5	89±4
		28±5	2,0	40±3	90±1	1,6	85±3
<i>C. latifolia</i>	ст. Икша (солнце) ст. Икша (тень) ст. Икша (поляна в лесу) Питомник (солнце)	32±7	0,2	30±7	82±5	0	82±3
		33±4	0,3	31±4	84±4	0,4	86±2
		41±2	1,1	49±7	91±3	0	91±3
		40±5	4,5	14±3	74±4	3,9	52±4
<i>C. persicifolia</i>	Приокско-Террасный заповедник (тень) Приокско-Террасный заповедник (солнце) пос. Володарского (тень) Питомник (солнце)	98±1	0	98±1	—	—	—
		97±1	1,1	95±1	—	—	—
		98±1	0	98±1	—	—	—
		92±2	1,3	95±1	—	—	—
<i>C. trachelium</i>	Питомник (тень) Боровской курган (солнце) д. Чулково (тень)	48±4	3,0	65±4	67±4	1,6	77±5
		73±3	0,6	76±4	90±2	0,3	89±3
		62±3	0,6	59±4	84±2	1,9	91±3

Примечание. * Сумма всхожих и непроросших за время опыта семян, %.

показали устойчивое повышение всхожести после криоконсервации (*t* от 0,7 до 5,8). У семян, собранных в неоптимальной экологии (питомник), всхожесть была низка из-за глубокого периода покоя семян как в контроле, так и при БЗ. Замораживание при сверхнизких температурах больше влияет на процент всхожих семян, чем на общий процент семян, сохраняющих жизнеспособность.

Семена к. широколистного (вид приурочен к светлым лесам), собранные в одном местообитании (т. е. генетически однородные), но в разной экологии (ст. Икша), весьма близки по всхожести и в контроле и после замораживания. При посеве семян этой популяции в условиях питомника на солнце (в несвойственной виду экологии) выросшие растения продуцировали семена менее жизнеспособные, чем в природных популяциях (*t* = 3,9), и с более низкой всхожестью (*t* = 4,5). Замораживание эти семена переносили плохо.

Семена к. персиколистного как из природных популяций, так и из питомника, практически не реагировали на замораживание.

Быстрое замораживание семян к. крапиволистного повысило всхожесть семян из питомника (*t* = 3,0), но мало повлияло на семена из природных популяций.

Таким образом, результаты замораживания семян одной популяции (особенно собранные в условиях культуры) еще не определяют видовой

реакции на криоконсервацию. Изучение генетически разнородного материала из разных экологических условий показывает, что их реакция на замораживание может быть неодинаковой.

По 6 видам колокольчиков образцы семян, собранные в 1985 г., были заложены на долговременное хранение в жидкий азот. В табл. 4 приведены результаты проращивания семян этих образцов через 1 мес. хранения при -196°C и через 1 год.

Таблица 4.

Влияние срока хранения при -196°C на лабораторную всхожесть и жизнеспособность семян видов рода *Campanula* (колокольчик)

Вид	1 мес.			1 год			$t \frac{1 \text{ мес.}}{1 \text{ год}}$	
	Контроль	-10°C	БЗ, -196°C	Конт-роль	-10°C	БЗ, -196°C	К	-196°C
<i>Campanula glomerata</i>	$43 \pm 6^*$ 66 ± 6	37 ± 7 52 ± 7	48 ± 9 79 ± 5	66 ± 4 90 ± 2	63 ± 5 75 ± 2	76 ± 6 84 ± 5	3,2 3,8	2,6 0,7
<i>Campanula cervicaria</i>	46 ± 10 68 ± 8	52 ± 5 68 ± 6	25 ± 3 55 ± 3	53 ± 6 69 ± 4	— —	44 ± 8 67 ± 8	0,6 0,1	2,2 1,4
<i>Campanula latifolia</i>	32 ± 7 82 ± 5	—	30 ± 7 82 ± 3	22 ± 3 56 ± 3	39 ± 5 72 ± 5	30 ± 3 80 ± 3	1,3 4,5	0 0,5
<i>Campanula persicifolia</i>	91 ± 2	93 ± 2	93 ± 1	95 ± 2	94 ± 3	94 ± 4	1,4	0,2
<i>Campanula rapunculoides</i>	67 ± 8 91 ± 2	55 ± 8 91 ± 2	54 ± 3 87 ± 3	52 ± 2 71 ± 2	63 ± 4 79 ± 2	53 ± 4 85 ± 2	1,8 7,1	0,2 0,5
<i>Campanula rotundifolia</i>	68 ± 4 88 ± 3	—	96 ± 1 100 ± 0	97 ± 1 97 ± 1	72 ± 3 74 ± 3	75 ± 4 78 ± 3	7,0 2,8	14,9 7,3

* См. примечание к табл. 2.

Хранение в холодильнике (контроль, 1 мес. и 1 год) способствовало повышению всхожести и жизнеспособности семян к. скученного и к. круглолистного, снижению всхожести и жизнеспособности к. широколистного, к. рапунцелевидного и не повлияло на семена к. персиколистного и к. жестковолосого. Сверхглубокое замораживание семян в течение года по сравнению с одним месяцем достоверно повысило всхожесть семян к. скученного ($t = 2,6$; жизнеспособность не изменилась) и снизило всхожесть и жизнеспособность семян изученной популяции к. круглолистного. Хранение семян при -10°C в течение года повысило всхожесть семян к. скученного, практически не повлияло на семена к. персиколистного и к. рапунцелевидного. Причины этого изучаются и проверяются на других популяциях, но уже сейчас можно констатировать большую перспективность сверхглубокого замораживания для долговременного хранения семян видов рода колокольчик.

Выводы

1. Семена 9 изученных дикорастущих видов рода колокольчик мелкие, масса 100 шт. семян от 4 до 21 мг. Равновесная влажность семян при хранении в комнатных условиях 3—6 %.

2. Замораживание до -10 и -196°C переносят семена всех изученных видов; колебания всхожести и жизнеспособности зависят и от вида и от популяции. При организации банков долговременного хранения семян генофонд вида должен быть представлен генетически разнородным материалом из различных природных популяций.

3. Семена из питомников размножения по реакции на криоконсервацию могут быть подобны природным (если экологические условия питомника оптимальны для вида) или резко отличаться от них.

4. Сравнительное изучение длительности экспозиции в азоте (1 мес. и 1 год) семян 6 видов рода колокольчик показало, что она или совсем не влияет на всхожесть семян или иногда способствует повышению всхожести.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горчаковский П. Л., Шурова Е. А. Редкие и исчезающие растения Урала и Приуралья.— М. : Наука, 1982.— 208 с.
2. Дубровина Л. В., Прозорова М. М. Ценные, редкие и исчезающие виды растений Ярославской области // Растительный покров Ярославского и Костромского Поволжья и его преобразование.— 1974.— Вып. 125 (III).— С. 3—9.
3. Зайцев Г. Н. Методика биометрических измерений.— М. : Наука, 1973.— 256 с.
4. Красная книга Белорусской ССР.— Минск : Белорусская сов. энциклопедия, 1981.— 281 с.
5. Красная книга Карелии.— Петрозаводск : Карелия, 1985.— 183 с.
6. Красная книга СССР.— Л. : Лесная промышленность, 1984.— Т. 2.— 480 с.
7. Кученева Г. Г., Андропова Н. Н., Семенова З. Е. и др. Флора и растительность Калининградской области (редкие и исчезающие виды растений).— Калининград : Б. и., 1983.— 80 с.
8. Мироненко О. Н. Нуждающиеся в охране растения и фитоценозы Архангельской области // Проблемы охраны природы в бассейне Белого моря.— Мурманск : Кн. изд-во, 1984.— С. 64—79.
9. Определитель растений Московской области.— М. : Наука, 1966.— 367 с.
10. Основы охраны растительного покрова Литовской ССР.— Вильнюс : Мокслас, 1986.— С. 259.
11. Растения Псковской области, подлежащие охране.— Псков : Б. и., 1977.— 20 с.
12. Растительный мир Удмуртии.— Ижевск : Удмуртия, 1980.— 71 с.
13. Редкие и исчезающие растения Сибири.— Новосибирск : Наука, Сиб. отд., 1980.— 224 с.
14. Скворцов А. К., Тихомиров В. Н. Редкие, исчезающие и нуждающиеся в охране виды сосудистых растений Московской области // Бюл. МОИП, 1986.— 91, вып. 6.— С. 111—118.
15. Теслов Л. С. Фитохимическое исследование некоторых представителей рода *Campanula* — Автореф. дис. ... канд. фарм. наук.— Тарту, 1974.— 25 с.
16. Тихонова В. Л. Стратегия мобилизации и сохранения генофонда редких и исчезающих видов растений.— Пушкино, 1985.— 36 с.
17. Цветочно-декоративные травянистые растения.— М. : Наука, 1983.— 272 с.
18. Шилов М. П. Список охраняемых и нуждающихся в охране видов растений и животных Ивановской и Владимирской областей // Методические указания по проведению собеседований на природоохранные темы.— Иваново : Б. и., 1982.— С. 10—28.

ВНИИ природы и заповедного дела,
г. Москва

Поступила 31.08.88

V. L. TIKHONOVA, V. P. VICTOROV, I. YI. MAKEYEVA, S. G. YASHINA

THE EFFECT OF LOW AND SUPERLOW STORAGE TEMPERATURES ON THE LABORATORY GERMINATION ABILITY OF WILD GRASS SEEDS. II. SEEDS OF *CAMPANULA* L. (BLUEBELL)

All Union Research Institute for Nature and Reservation Business, Moscow

The effect of cryopreservation on the germination and viability of seeds of 9 species of *Campanula* L. (35 populations) was studied. The seeds of all species studied survived freezing to -10 and -196°C . It has been concluded that successful preservation of the gene fund requires cryopreservation of different genetic materials from different populations taken under different ecological conditions. The effects of long-term storage in liquid nitrogen for 1 year and for 1 month were identical or increased the germination ability of seeds of such species as *Campanula cervicaria* and *Campanula glomerata*.

Ф. В. Дахно, М. И. Грошевой, А. С. Снурников, В. Н. Тельнюк

СОВРЕМЕННАЯ АППАРАТУРА ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Проведен сравнительный анализ аппаратуры для криоконсервации эмбрионов. Отмечены преимущества разработанного мобильного замораживателя эмбрионов с автоматическим режимом инициирования кристаллизации и программами, зафиксированными в регуляторе.

В биологической науке возникло совершенно новое направление, эмбрионинженерия, основой которого является культивирование и криоконсервация эмбрионов. Активная перестройка генома животных на самых ранних этапах онтогенеза позволяет реализовать теоретические предпосылки по реконструкции эмбрионов путем клонирования, слияния или непосредственной инъекции в их ядра чужеродной ДНК (генов) с целью получения эмбриональных клонов, химер или трансгенных животных.

Перенос криоконсервированных и оттаянных эмбрионов позволяет избежать климатический стресс, испытываемый завезенным животным, и получать особи, адаптированные к местным условиям в процессе эмбриогенеза, опосредовано через организм реципиента местной породы.

Эмбрионы стерильны, поэтому почти полностью отпадает необходимость соблюдения сложных карантинных ветеринарных требований. Самостоятельное значение имеет проблема криоконсервации ооцитов и эмбрионов человека.

Методика низкотемпературной консервации (НТК) эмбрионов млекопитающих имеет существенные отличия от методик криоконсервации других биообъектов. С этим связаны особенности в построении систем низкотемпературного консервирования, заключающиеся в весьма низких скоростях замораживания ($0,1 \div 1,0$ °C/мин⁻¹), длительном процессе программного охлаждения, повышенной точности реализации режимов охлаждения и т. д.

Трансплантация эмбрионов — биотехнический метод ускоренного воспроизведения высокопродуктивных животных, который стал возможен только после того, как были установлены основные условия поддержания жизни яйцеклеток и эмбрионов вне организма: разработаны искусственные среды с определенным составом солей, сахаров, аминокислот, растворимых белков, гормонов; сконструированы инструменты для получения эмбрионов от доноров и пересадки их реципиентам, различное оборудование для поиска, идентификации, оценки и инкубации эмбрионов, криоконсервации эмбрионов.

В нашей стране с 1984 г. на основе теоретических разработок метод трансплантации эмбрионов в молочном скотоводстве с учетом зарубежного опыта стали внедрять в практику: создано 22 центра при научно-исследовательских институтах и более 50 пунктов в хозяйствах.

Анализ различных конструкций оборудования для НТК эмбрионов показывает, что все они относятся к устройствам, в которых реализуется однотипная технология НТК суспензий вместе с криопротектором, упакованных в контейнеры-пайеты или ампулы и помещенных в камеры замораживания. Различное оборудование отличается в основном камерами, в которых осуществляется программное замораживание биообъектов, и системами передачи хладагента в теплообменник [1].

С 1976 г. Опытное производство ИПКиК АН УССР изготавливает универсальный замораживатель, позволяющий в автоматическом режиме реализовать практически любую программу охлаждения в широком диапа-

зоне температур. Опыт эксплуатации этого замораживателя показал явное несоответствие аппаратуры поставленным задачам: полностью автоматический цикл охлаждения прерывается в самом ответственном пункте ведения технологического процесса вмешательством оператора для ручного инициирования кристаллизации криопротектора. Кроме того, для столь малого объема замораживаемого материала габариты аппаратуры и ее стоимость были несоразмерно завышены, а расход азота недопустимо высок.

Сравнительный анализ данного замораживателя с информационными и патентными материалами по замораживателям зарубежных фирм показал, что они весьма схожи. Поэтому следующие замораживатели изготавливались по схеме, принятой в отечественных и зарубежных аппаратах: камера замораживателя, предназначенная для размещения пайет или ампул, система снабжения хладагентом, предназначенная для подачи жидкого азота в камеру в количестве, обеспечивающем ведение заданной программы охлаждения, и регулятора, обеспечивающего контроль температуры в камере и изменение этой температуры по заданной программе путем управления подачей азота.

Поскольку эта структурная схема и устройства для ее реализации достаточно подробно описаны в литературе, представляется целесообразным ограничиться анализом отдельных недостатков, устранение которых заставило искать принципиально новые подходы при создании дешевого и надежного в эксплуатации замораживателя, предназначенного для широкого применения в сельскохозяйственной практике.

Камера охлаждения, в которой размещены объекты криоконсервирования и датчики температуры, представляет собой теплоизолированную емкость, внутренняя полость которой организована таким образом, чтобы все упаковки с эмбрионами в защитной среде находились в одинаковых условиях. В таких же условиях должен находиться и датчик температуры. Наиболее распространенным решением этой задачи является симметричное построение внутренней полости и интенсивное перемешивание распыленного жидкого азота при помощи вентилятора, приводимого во вращение электродвигателем с достаточно высокими оборотами.

Понижение температуры и ее стабилизации по заданным программам осуществляется подачей в камеру жидкого азота от системы снабжения хладагентом, состоящей из сосуда Дьюара, сообщающегося с камерой охлаждения азотным шлангом через регулируемый клапан или вентиль. Для обеспечения подачи азота по заданной программе сосуд Дьюара должен быть закрыт герметично, а внутри его создано избыточное давление, например за счет испарения части жидкого азота. Дозирование азота осуществляется регулируемым клапаном или вентилем, управляемыми по соответствующим сигналам от блока управления по информации о температуре в контрольной точке — месте установки датчика температуры. Характерными особенностями такого замораживателя, которые при определенных условиях можно отнести к недостаткам, являются, в первую очередь, наличие подвижных частей в зоне прохождения жидкого или газообразного азота или в непосредственной близости от этой зоны, ротор электродвигателя, якорь клапана электромагнитного или регулируемого вентиля, заслонка клапана предохранительного. Поскольку сосуд Дьюара в рабочем состоянии находится под избыточным давлением, требуются дополнительные меры обеспечения безопасной работы обслуживающего персонала. Существующие замораживатели должны совершенствоваться в части создания одинаковых условий для эффективного охлаждения всех расположенных в камере биообъектов, повышения точности программ охлаждения, снижения энергетических затрат на выполнение процесса замораживания, т. е. улучшения расходной характеристики жидкого азота.

В процессе эксплуатации таких замораживателей было обращено внимание на характерные особенности, которые впоследствии были учтены при разработке мобильного замораживателя, предназначенного для широ-

комасштабного внедрения на станциях трансплантации эмбрионов, сеть которых создается в настоящее время в СССР.

Это, прежде всего, замораживание малого объема биоматериала — до 10 мл за один цикл. Несложные расчеты показывают, что для охлаждения такого объема криопротектора от 20°C до $-30 \div -36^{\circ}\text{C}$ необходимо затратить около полутора килокалорий холода, что при эффективном использовании хладагента привело бы к расходованию примерно 25 г жидкого азота. Его расход в разных замораживателях для реализации программы составляет более одного килограмма. Вывод очевиден — подавляющая часть хладагента используется на компенсацию теплопритоков из окружающей среды через поверхности камеры, шланга и системы снабжения хладагентом.

В результате возникло решение совместить камеру охлаждения с системой снабжения хладагентом, разместив укладку с ампулами или пайетами непосредственно в горловине сосуда Дьюара. При этом представилось целесообразным использовать газообразную фазу азота.

Несмотря на то, что не используется холод газообразования, это не приводит к увеличению расхода хладагента, так как его потери на компенсацию внешних теплопритоков сведены к минимуму. Отсутствие интенсивного теплообмена было компенсировано размещением ампул или пайет в укладке, изготовленной из материала с высокой теплопроводностью, что обеспечило достаточную для практических целей идентичностью условий для каждого замораживаемого эмбриона.

Второй характерной особенностью устройства для замораживания эмбрионов является необходимость искусственного инициирования кристаллизации криопротектора во избежание гибели биообъектов. Известные из литературных, информационных и патентных материалов методы — внесение переохлажденного кристаллика, применение элементов Пельтье, переохлажденной детали и т. п. оказались малоэффективными, так как температура инициирования кристаллизации выбирается и устанавливается на регуляторе оператором. Различные теплофизические свойства криопротекторов в связи с различной степенью очистки, например глицерина, приводят часто к тому, что температура инициирования выбирается неправильно, это приводит к гибели эмбрионов или к снижению их жизнеспособности после замораживания.

Наиболее щадящим для эмбрионов режимом является такое инициирование, при котором кристаллизация происходит без переохлаждения и последующего отогрева криопротектора. Такой режим был достигнут в конструкции камеры, у которой верхняя часть ампул или пайет находится в постоянно переохлажденной по сравнению с укладкой зоне; кристаллы в верхней части ампул или пайет зарождаются уже при положительных температурах и рост их в основную часть криопротектора начинается при достижении им верхнего значения температурного гистерезиса независимо от теплофизических свойств криопротектора. Таким образом, исключаются ошибки оператора при наборе программы в регуляторе, а процесс замораживания становится полностью автоматическим.

Замораживатель позволяет консервировать эмбрионы, размещенные в среде криопротектора в 7 пластиковых ампулах или 21 пайете диаметром 2 мм, по двум жестко фиксированным программам.

Первая программа, общепринятая в СССР, широко распространенная в мировой практике, предназначена для работы с криопротектором, для которого температура инициирования кристаллизации составляет -7°C : 1-й этап — стабилизация температуры 20°C без ограничения времени; 2-й этап — охлаждение со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от 20 до -7°C ; 3-й этап — стабилизация температуры -7°C в течение 2 мин; 4-й этап — охлаждение со скоростью $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от -7 до -32°C ; 5-й этап — стабилизация температуры -32°C в течение 30 мин.

Вторая программа отличается от первой тем, что 2-й этап заканчивается при температуре 0°C , 3-й этап отсутствует, а 4-й этап начинается с 0°C .

Как сказано выше, характерной особенностью предлагаемого замораживателя является естественное инициирование кристаллизации за счет переохлаждения верхнего слоя криопротектора и образования в нем кристалликов льда задолго до температуры кристаллообразования в основном слое. Ввиду этого 2-я программа — щадящая — может быть рекомендована для всех криопротекторов, в том числе с неопределенными теплофизическими свойствами.

На рис. 1 приведены термограммы процесса охлаждения с инициированием кристаллизации для различных конструктивных вариантов камер замораживания. На термограммах наглядно виден процесс кристаллообразования криопротектора в ампулах.

На рис. 2 представлен мобильный вариант замораживателя. Масса замораживателя в заправленном состоянии 50 кг, масса азота 25 кг. После заправки азотом замораживатель обеспечивает проведение не менее 15 программ в течение 30 суток. В блоке управления предусмотрена цифровая индикация текущего значения температуры на световом табло и необходимая

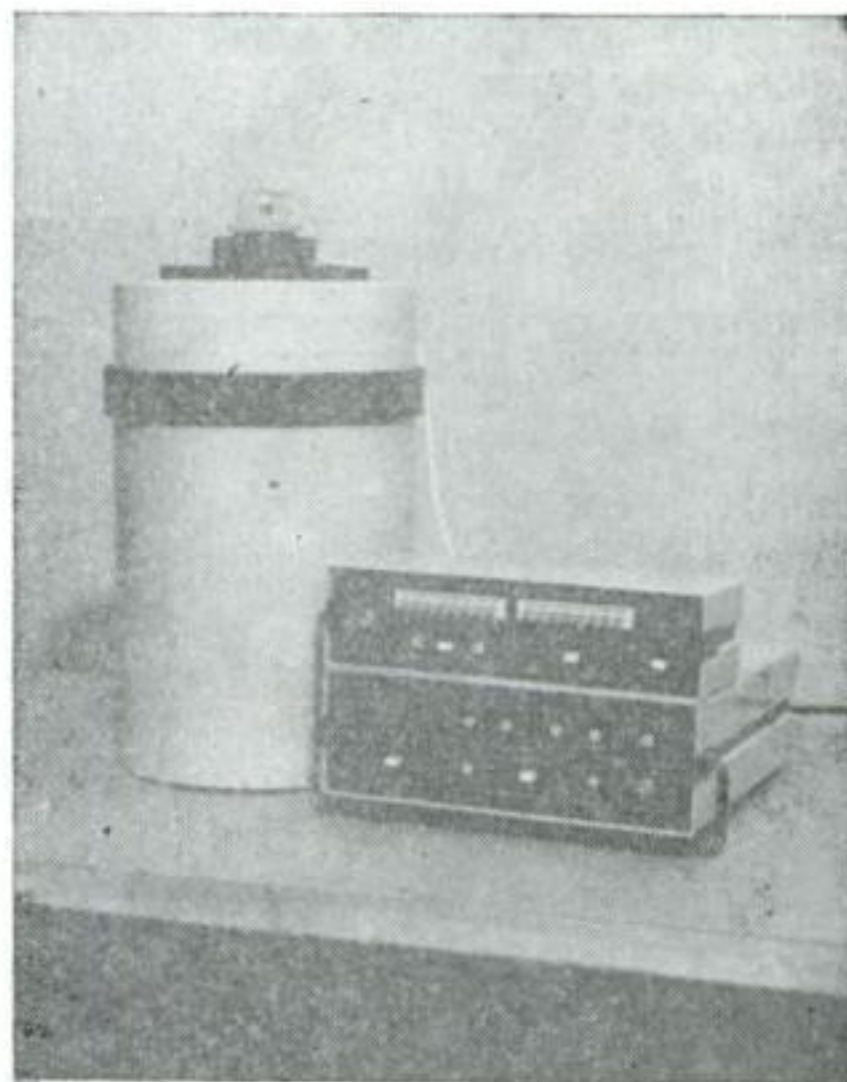
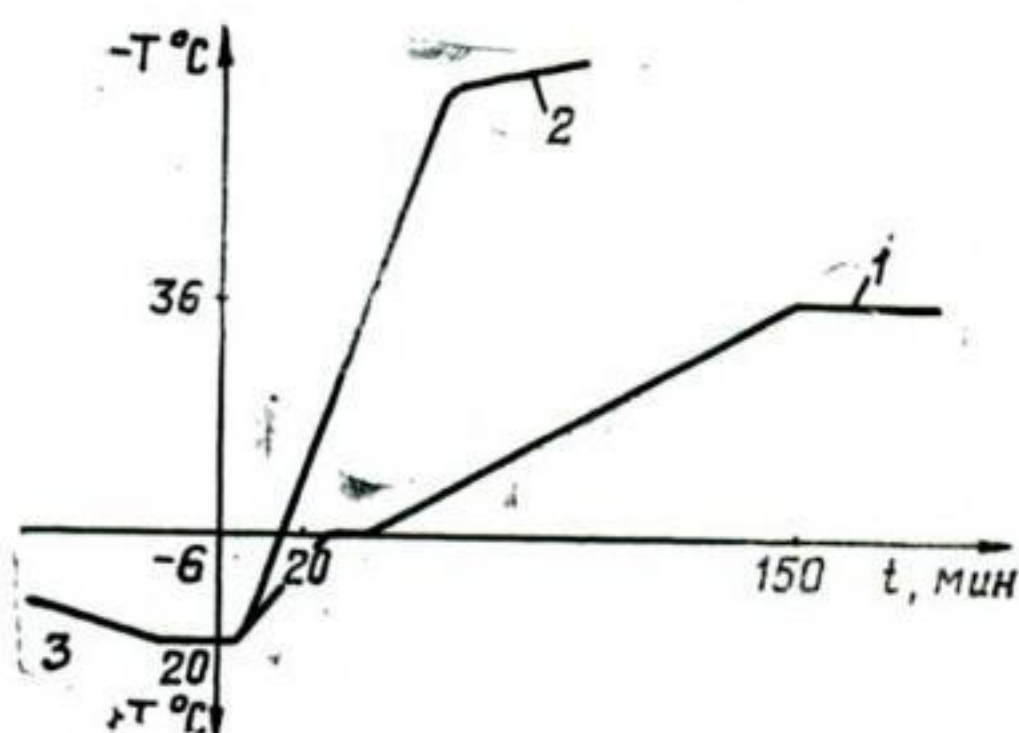


Рис. 1. Копия термограммы замораживания эмбрионов с использованием замораживателя ЗЭМ: 1 — в пайете; 2 — на кристаллизаторе; 3 — выход на режим

Рис. 2. Мобильный вариант замораживателя ЗЭМ

оперативная информация с помощью светодиодов. Замораживатель может быть укомплектован дополнительным переносным элементом, рассчитанным на проведение 2—3 циклов охлаждения по заданным программам с использованием блока управления основного замораживателя.

Подводя итоги, необходимо отметить основные преимущества разработанной аппаратуры.

1. Полностью автоматический режим замораживания по программам, жестко зафиксированным в регуляторе, исключающий воздействие оператора на результаты замораживания.

2. Автоматическое прохождение кристаллизации в щадящем для эмбриона режиме — без переохлаждения и отогрева — независимо от теплофизических свойств криопротектора.

3. Отсутствие подвижных частей — двигателей, клапанов, реле давления и т. д., что приводит к технологичности, долговечности и высокой надежности замораживателя.

4. Отсутствие в открытом сосуде Дьюара избыточного давления в процессе работы, что гарантирует безопасную работу обслуживающего персонала без применения специальных мер.

5. Упрощение схемы и конструкции регулятора ввиду отсутствия силовых элементов управления электродвигателями, клапанами, вентилями, а также контура стабилизации давления в сосуде Дьюара.

6. Низкий расход жидкого азота — 400 л на 1 программу позволяет без дозаправки провести в течение месяца 15—20 циклов замораживания эмбрионов.

В 1988—1990 гг. изготовлено около 90 замораживателей эмбрионов, которые в основном по разнарядкам ВНПО по племенному делу в животноводстве и НПС «Плембиосистема» поставлялись в специализированные институты и хозяйства. Испытания аппаратов с участием ведущих организаций: ВНИИ животноводства и НИИ животноводства Лесостепи и Полесья, а также ряда других выявили пригодность аппаратуры для криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н. С. Пушкаря и А. М. Белоуса. — Киев : Наук. думка, 1981. — 606 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР,
г. Харьков

Поступила 01.12.89

F. V. DAKHNO, M. I. GROSHEVOY, A. S. SNURNIKOV, V. N. TELNUK

MODERN EQUIPMENT FOR CRYOPRESERVATION OF MAMMALIAN EMBRYOS

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

A comparative analysis of the equipment for cryopreservation has been performed. Advantages of the developed mobile freezer for embryos with programmed regimen for seeding ice nucleation and programmes fixed in the regulator are discussed.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043

В. А. Чуйко, Л. Г. Карпенко, И. М. Бондарева, И. В. Пивненко, В. В. Линевиц

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПОСЛЕ ГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ДО — 196 °С

Исследовались процессы гормонообразования, секреции и регуляции в срезах и клетках щитовидной железы и коры надпочечников после их замораживания до температуры —196 °С. Установлено, что указанное воздействие существенно (на 50 %) уменьшает захват йодида срезами щитовидной железы, если замораживание производилось без применения криопротекторов со скоростью 1—3 °С/мин ($0,0112 \pm 0,005$, контроль $0,221 \pm 0,017$).

Способность щитовидной железы органифицировать йодид под влиянием замораживания увеличивается (рис. 1), при этом сохраняется чувствительность исследуемого процесса к ингибирующему влиянию избытка КJ и мерказолила.

Замораживание — оттаивание оказывало выраженный угнетающий эффект на включение ^{14}C -аминокислот в суммарные белки (рис. 2).

Кроме того, в клетках щитовидной железы наблюдается увеличение активности катепсина Д, его неосаждаемой фракции. (рис. 3). В большей степени указанным действием обладает медленное (1—3 °С/мин) замораживание. При использовании скорости 200 °С/мин изменения активности данного фермента незначительны (рис. 3).

Медленное замораживание не изменяет характер общего неспецифического и специфического связывания ^3H -норадреналина соответствующими рецепторами плазматических мембран. При этом, однако, увеличивается количество связывающих мест с 2685 до 3500 ФМ/мг белка, что приводит к незначительному увеличению константы ассоциации с $7,3$ до $8,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ (рис. 4).

Кривая связывания норадреналина с адренергическими рецепторами в системе координат Скэтчарда носит линейный нисходящий характер и не отличается от кривой для незамороженной ткани. Насыщение адренорецепторов лигандом происходит в пре-

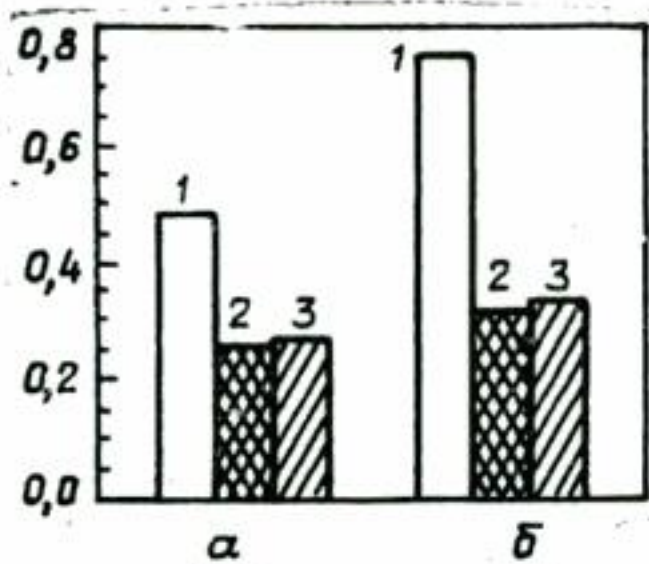


Рис. 1

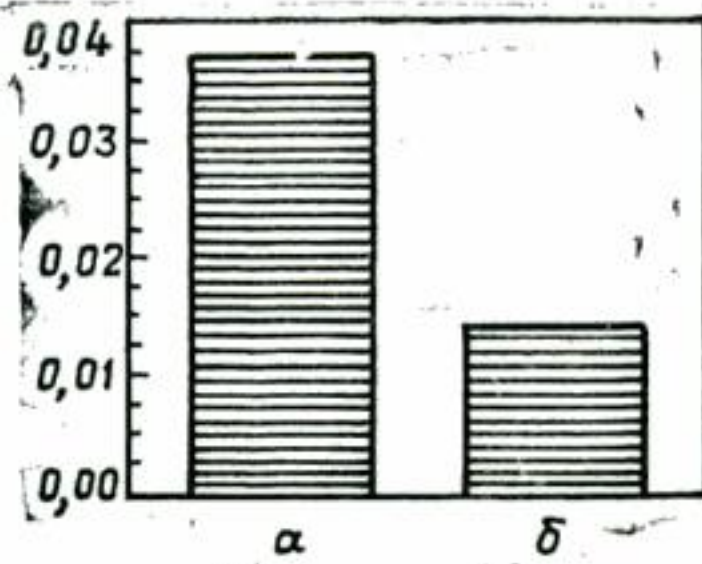


Рис. 2

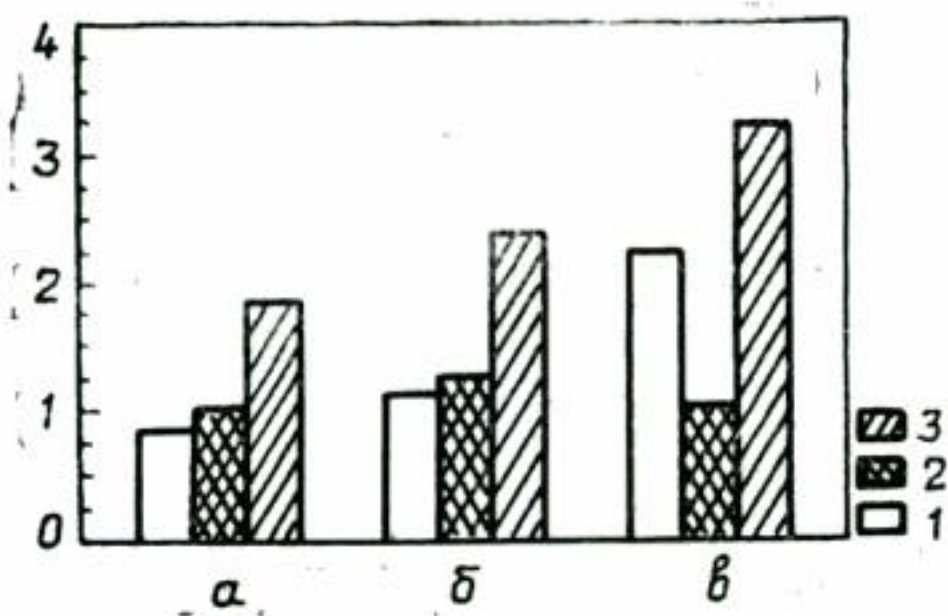


Рис. 3

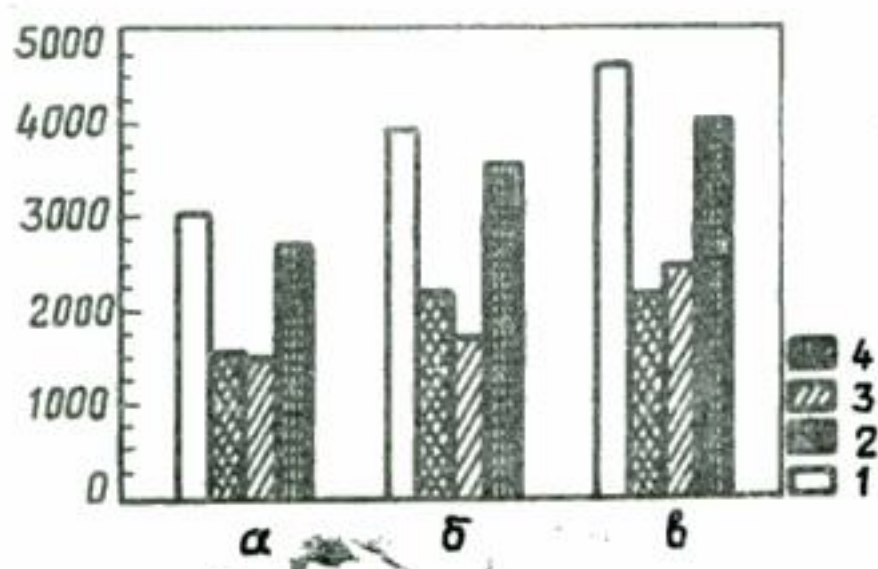


Рис. 4

Рис. 1. Влияние замораживания на органификацию ^{131}I срезами щитовидной железы быка: а — интактная ткань; б — замораживание ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$); 1 — базальная активность; 2 — $\text{KI } 10^{-4}\text{M}$;

Рис. 2. Влияние замораживания ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$) на включение ^{14}C -аминокислот в белки щитовидной железы (имп/мин/мг белка): а — интактная ткань (контроль); б — замораживание.

Рис. 3. Влияние замораживания на активность катепсина Д (мкг тирозина/мг белка/мин): а — интактная железа; б — быстрое замораживание ($85-100^\circ\text{C}/\text{мин}$), в — медленное замораживание. Активность: 1 — неосаждаемая; 2 — связанная; 3 — общая

Рис. 4. Влияние замораживания на связывание норадреналина: а — интактная ткань; б — замораживание ($1^\circ\text{C}/\text{мин}$); в — замораживание ($85-100^\circ\text{C}/\text{мин}$). Связывание (фМ/мг белка): 1 — общее; 2 — неспецифическое; 3 — максимальное специфическое; 4 — количество мест (фМ/мг белка)

делах концентраций $10^{-8}-10^{-4}$ м, что указывает на гомогенность популяции рецепторов, присутствующих в исследуемых мембранных структурах.

Установлено, что замораживание оказывает незначительное влияние на секрецию триодтиронина срезами щитовидной железы. Под влиянием замораживания увеличивается базальная активность аденилатциклазы, а также чувствительность исследуемой системы к фториду, в то время как мембранный комплекс гормонорецептор (ТТР и адреналин) — аденилатциклаза сохраняется после указанного воздействия в неизменном виде.

Таким образом, щитовидная железа человека и животных характеризуется вы-

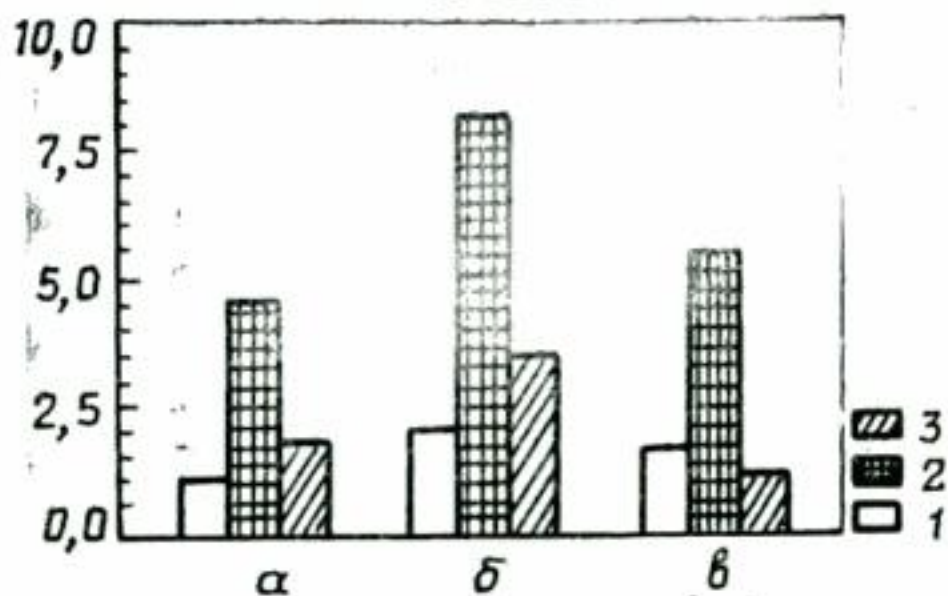


Рис. 5. Влияние замораживания на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников, пмоль цАМФ/мг белка): а — интактная ткань; б — замораживание ($1-3^\circ\text{C}/\text{мин}$); в — замораживание ($85-100^\circ\text{C}/\text{мин}$); 1 — базальная активность; 2 — NaF (40 мМ); 3 — синактен (10^{-8}M)

сокой криоустойчивостью: замораживание без криопротектора хотя и сопровождается изменениями активности определенных этапов образования тиреоидных гормонов в ней, но эти изменения носят функциональный характер и полностью обратимы. Данное воздействие не нарушает чувствительности биохимических процессов в щитовидной железе к специфическим стимуляторам и ингибиторам (ТСГ, адреналин, мерказолил, KI).

Исследовано влияние медленного (1 — 3 °C/мин) и быстрого (85—100 °C/мин) замораживания до —196 °C на активность аденилатциклазы клеток коры надпочечника свиньи (рис. 5).

Медленное замораживание срезов коры надпочечника приводит к достоверному увеличению чувствительности исследуемого фермента к используемым стимуляторам NaF и синактену), а также его базальной активности. При быстром замораживании коры надпочечников были обнаружены аналогичные изменения. Однако чувствительность фермента к NaF была менее выражена. Снижалась также активность аденилатциклазы, стимулируемой синактеном. После медленного замораживания (1—3 °C/мин) отмечено уменьшение включения ³H—уридина в клетки при сохранении чувствительности к инсулину и преднизолону.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины АН СССР
г. Харьков

Поступила 1.08.9

ХРОНИКА

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ КРИО-90

В Бингемптоне (США) 17—24 июня 1990 г. состоялись совместное заседание Общества криобиологов (США), Криогенного общества Америки и Симпозиум по холодоустойчивости беспозвоночных и растений (КРИО-90). В заседаниях приняло участие около 300 человек. Были заслушаны доклады криобиологов из разных стран мира. На 15 сессиях обсуждались проблемы состояния белков при низких температурах, криоповреждения, криоконсервации органов, гамет, тканей, воздействия низких температур на липиды и мембраны, способы защиты от криоповреждения, вопросы экофизиологии низкотемпературной адаптации, витрификации, криогенного оборудования, физиологии и биохимии при низких температурах, проблемы использования низких температур в медицине. Было представлено 56 стендовых сообщений о влиянии низких температур на биологические объекты разных уровней организации. От Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР был заслушан доклад директора академика АН УССР В. И. Грищенко «Влияние некоторых криопротекторов на морфологические и функциональные свойства ооцитов человека».

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР защищена диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук А. В. Козлова «Гемоциркуляция и водно-электролитный баланс при пролонгированной краниocereбральной гипотермии». В работе получены новые данные о влиянии различных температурных режимов на гемоциркуляцию, водно-электролитный баланс и кислотно-основное состояние крови при пролонгированной краниocereбральной гипотермии (КЦГ). Проведены комплексные исследования по изучению функционального состояния внутренней среды организма. Показано, что умеренная КЦГ, сохраняемая в течение шести часов, обуславливает сложную перестройку фазовой структуры сердечного цикла, показателей системной гемодинамики и сопровождается созданием оптимальных резервных возможностей работы сердца. Проведение КЦГ в течение шести часов в температурном диапазоне 32 ± 30 °C характеризуется активацией лимфотока, повышением концентрационного и трансмембранного градиентов K⁺ и Na⁺ крови при сохранении водного равновесия в тканях и кислотно-основного равновесия.

ВТОРАЯ МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ КРИОБИОЛОГИИ»

Уважаемые коллеги!

21—25 апреля 1992 года в г. Харькове состоится 2-я Международная конференция «Успехи современной криобиологии», проводимая под эгидой Международного института холода и ЮНЕСКО.

Научная программа конференции будет формироваться из докладов приглашенных лекторов, устных и стендовых докладов участников.

Предлагаемая для обсуждения тематика:

1. Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов.
2. Криобиохимия мембран и макромолекул.
3. Физикохимия водных растворов криопротекторов и криоконсервантов во время охлаждения и при низких температурах.
4. Криобиология репродуктивных клеток, тканей и эмбрионов.
5. Гипотермия. Механизмы адаптации к искусственному и естественному охлаждению. Проблемы гипобриоза.
6. Консервация биологических объектов при низких температурах.
7. Медико-биологические проблемы холодовой адаптации.
8. Криоаппаратура для биологических исследований и клинического использования.

Во время конференции предполагается проведение выставки научного криобиологического оборудования.

Рабочие языки конференции — русский и английский.

Для участия в конференции необходимо до 20 мая 1991 представить в Оргкомитет тезисы Вашего доклада на русском и английском языках.

Обязательное условие публикации — предъявление квитанции об уплате регистрационного взноса, который дает право на участие в работе конференции (один взнос на одно лицо). Регистрационный взнос составляет 150 рублей. Для аспирантов, соискателей и стажеров — 50 рублей. При отсутствии квитанции об уплате Оргкомитет будет лишен возможности принять тезисы к публикации.

Деньги переводить на счет ИПКиК АН УССР, расчетный счет 000609226 МФО 351339 в Ленинском отделении Жилсоцбанка г. Харькова с пометкой «Конференция».

Тезисы представляются в одном экземпляре на английском языке и в двух экземплярах на русском языке; второй экземпляр тезисов должен иметь визу дирекции учреждения с гербовой печатью и быть подписан внизу авторами. К тезисам необходимо приложить экспертное заключение по установленной форме. Тезисы с экспертным заключением и сопроводительным письмом следует направлять по адресу:

310015 г. Харьков, ул. Переяславская, 23, ИПКиК АН УССР, Оргкомитет Международной конференции.

Образец оформления тезисов:

ФАКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА ПРИ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Петренко П. Г., Иванов В. Д.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, г. Харьков 310015 СССР

Далее следует текст тезисов, отпечатанный через 1.5 интервала на пишущей машинке со стандартным шрифтом. Полный объем тезисов не должен превышать 38 строк, в каждой из которых должно быть не более 63 знаков.

Проводится подписка на всесоюзный научно-теоретический журнал «Проблемы криобиологии». В журнале публикуются научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

Журнал рассчитан на научных работников в области биологии и медицины, преподавателей и студентов вузов соответствующего профиля, практиков, использующих методы воздействия холода на биологические объекты.

Периодичность — 4 номера в год. Подписная цена: на 3 мес. — 1 р. 20 к., на 6 мес. — 2 р. 40 к., на 12 мес. — 4 р. 80 к.

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союзпечати», отделениях связи и общественными распространителями печати.

Our journal Problemy Kriobiologii (PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY), formerly KRIOBIOLOGIYA (CRYOBIOLOGY) is published by Naukova Dumka Publ. Co. in Russian with abstracts in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment.

ISSN 0233-7673. Проблемы криобиологии, 1991. № 1. 1—56