1·2
1997

ISSN 0233–7673

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

Харьковскому Институту проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины - 25 лет

ИТОГИ НАУЧНОЙ И НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИНСТИТУТА ЗА 25 ЛЕТ *В.И.Грищенко, А.М.Белоус*

У ИСТОКОВ ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ *В.Г.Манжелий, М.И.Шраго*

НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СПОСОБОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ *Е.А.Гордиенко, А.И.Осецкий, Л.Ф.Розанов*

ТРИГГЕРНАЯ ФУНКЦИЯ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ГИБЕРНАЦИИ *Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко*

Материал защищен авторским правом

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief **V.I.Grishchenko**

EDITORIAL BOARD

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

EDITORIAL COUNCIL

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

Матеріал, захищений авторським правом

1:2

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1997

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

К 25-ЛЕТИЮ ИНСТИТУТА

Грищенко В.И., Белоус А.М. Итоги научной и научно-организационной деятельности института за 25 лет . . . 3
Манжелий В.Г., Шраго М.И. У истоков Института проблем криобиологии и криомедицины 14
Белоус А.М. Проблемы криобиохимии мембранных структур . . . 19
Цуцаева А.А. Проблемы глубокого холодового анабиоза и криоиммунологии . . . 23
Юрченко Т.Н. Основные достижения отдела криоморфологии . . . 26
Луговой В.И., Ханина Л.А. Современные аспекты проблемы поиска и создания криопротекторов . . . 30
Гольцев А.Н. Изучение патофизиологических механизмов проявления иммунореактивности гемопоэтической ткани . . . 37
Сандомирский Б.П. Современные возможности криомедицины . . . 41
Капрельянц А.С. Развитие электронной микроскопии в ИПКиК НАН Украины . . . 45
Суббота Н.П. Опыт приоритетных разработок института в области получения и криоконсервирования аллогепатоцитов . . . 48
Снурников А.С., Полончук А.М. Разработка технических средств для научных исследований и практического их применения в криобиологии и криомедицине . . . 54

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Грищенко В.И., Лучко Н.А. Новые подходы к проблеме низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток животных и человека . . . 61
Гордиенко Е.А., Осецкий А.И., Розанов Л.Ф. Научное обоснование способов низкотемпературного консервирования клеточных суспензий . . . 67
Бабийчук Г.А., Марченко В.С. Триггерная функция гематоэнцефалического барьера в нейротрансмиттерных механизмах терморегуляции при гипотермии и гибернации . . . 72
Зинченко А.В. Об электрической поляризации и оптическом излучении водных растворов полиэтиленгликолей при охлаждении-нагреве . . . 78
Сергиенко Н.Г., Ченчик Т.А. Специфичность механизмов внутриклеточной регуляции в сердце крыс при экстремальных воздействиях . . . 81
Малова Н.Г. Особенности деструктивно-дистрофических и репаративных изменений в костной ткани при локальном криовоздействии . . . 85
Нипот Е.Е. Роль температуры как фактора, определяющего чувствительность эритроцитов к гипертоническому и постгипертоническому лизису . . . 87
Ченчик Т.А. Состояние системы инозитолфосфатов в условиях стресса в структурах головного мозга крыс различных линий . . . 91

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Бабийчук Л.А. Конформационные изменения эритроцитов под влиянием криопротектора ПЭО-1500 . . . 95
Кирошка В.В. Лизис эритроцитов при гипотермическом и низкотемпературном хранении в присутствии витрифицирующих концентраций проникающих криопротекторов . . . 99

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1997

Матеріал, захищений авторським правом

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Моттерлини Р., Форести Р., Грин К.Дж. Повышенная экспрессия БТШ32 (гем-оксигеназы-1) в эндотелиальных клетках сосудов в условиях гипоксии 104
Междидов С.Х. К криоконсервированию клеточных суспензий 104

CONTENT

TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE INSTITUTE

Grischenko V.I., Belous A.M. Results of scientific and scientific-organizational activite of the Institute for 25 years 3
Mangelij V.G., Shrago M.I. The Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine creation 14
Belous A.M. The problems of Cryobiology of membrane structures 19
Tsutsaeva A.A. The problems of deep cold anabiosis and cryoimmunology 23
Yurchenko T.N. The basic achievements of ctyomorphology department 26
Lugovoy B.I., Khanina L.A. The problems of search and creation of cryoptotectants 30
Goltsev A.N. The study of pathophysiological mechanisms of immunoreactivity manifestation of homopoetic tissue 37
Sandomirsky B.P. The current possibilities of cryomedicine 41
Kaprelyants A.S. The development of electrone microscopy in the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine 45
Subbota N.P. The experience of priority developments of the Institute in the field of allohepatocyte obtaining and cryopreservation 48
Snurnikov A.S., Polonchuk A.M. The development of tecnical means for scientific research and their practical application in cryobiology and cryomedicine 54

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Grischenko V.I., Luchko N.A. The new approches to the problem of human and animal reproductive cell low temperature preservation 61
Gordienko E.A., Osetsky A.I., Rozanov L.F. Scientific substantiation of methods of low temperature preservation of cellular suspensions 67
Babijchak G.A., Marchenko V.S. Trigger function of blood brain barreir in neurotransmitter mechanisms of thermoregulation at hypothermia and hibernation 72
Zinchenko A.V. On Electrical Polarization and Optical Irradiation of polyethylene Glycol Aqueous Solutions under Cooling-heating 78
Sergienko N.G., Chenchik T.A. The specific character of gears of intracellular regulation in rat'st heart of at extreme influences 81
Malova N.V. The peculiarities of destructive — dostrophial and reparative changes in bone tissue at local cryoeffect 85
Nipot E.E. The role of temperature as a factor determining the erythrocytes sensitivity to the hypertonic and posthypertonic lysis 87
Chenchik T.A. The inositolphosphates system in brain structures of the stressed rats of different genetical lines 91

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Babijchuk L.A. Conformational changes in erythrocytes under the effect of PEO-1500 cryoprotectant 95
Kiroshka V.V. Erythrocytes lysis at hypothermic and low temperature storage in the presence of vetrifying concentrations of penetrating cryoprotectants 99

BRIEF COMMUNICATIONS

Mottorlini P., Foresti R., and Green C.J. Increased expression of HSP32 (heme oxygenase-1) in vascular endothelial cells by hypoxia 104
Mezhidov S.H. On cell suspension cryopreservation 104

Свидетельство о государственной регистрации: Серия КВ, №98 от 23.09.93
Адрес редакции: 310015, Харьков, ул. Переяславская, 23, тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Е.Л.Назыч*
Компьютерный набор и верстка: *О.П.Лупина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 27.03.97. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 9,4. Тираж 350 экз. Цена договорная. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

Матеріал, захищений авторським правом

К 25-ЛЕТИЮ ИНСТИТУТА

УДК 061.6:57.043

В.И.Грищенко, А.М.Белоус

ИТОГИ НАУЧНОЙ И НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ИНСТИТУТА ЗА 25 ЛЕТ

Институт проблем криобиологии и криомедицины в составе Национальной Академии наук Украины был создан 1 марта 1972 года как единственное комплексное научное учреждение, призванное проводить фундаментальные исследования влияния холода на биологические объекты и на этой основе осуществлять прикладные разработки в области биотехнологии, медицины, ветеринарии, сельского хозяйства, пищевой и микробиологической промышленности. Значительные научные достижения в области теорстической и прикладной физики низких температур (академики НАН Украины Б.Г.Лазарев, В.Г.Манжелий, Б.И.Веркин, И.М.Дмитренко, профессор Б.Н.Есельсон и др.), технической криогеники и низкотемпературного приборостроения позволили создать в Харькове институт такого профиля.

Институт был создан на базе двух подразделений: проблемной лаборатории криоконсервации крови и костного мозга Минздрава СССР, которой руководил член-корреспондент НАН Украины Н.С.Пушкарь, и биологического отдела Физико-технического института низких температур НАН Украины, руководимого проф. В.Г.Шахбазовым. Непосредственными инициаторами создания института были академик НАН Украины Б.И.Веркин и член-корреспондент НАН Украины Н.С.Пушкарь. С самого начала в тесном сотрудничестве с физиками, химиками, математиками и инженерами в институте работают биологи и медики. Научные направления развивались в нескольких основных аспектах. Планировалось вести широкие исследования механизмов криоповреждений, криозащиты и репарации биологических систем различного уровня организации (молекулярного, клеточного, тканевого), особенностей холодовых разрушений и самосборки клеток на молекулярном уровне, что позволило научно обосновать создание новых видов защитных соединений для улучшения технологии низкотемпературного замораживания и длительного хранения биологических объектов различного происхождения, т.е. организовать высокоэффективные криобанки клеток, семян, растений, штаммов микроорганизмов, различных тканей и органов, используемых в медицинской практике, биологии и сельском хозяйстве.

Второй важной задачей исследований являлось изучение механизмов устойчивости организмов при их холодовой адаптации в естественных (пойкилотермные, гибернирующие животные) и искусственных условиях (гомойотермные, человек), что позволяло выяснить механизмы обратимой перестройки системы генетической информации и путей метаболизма холодоустойчивых организмов, способных переживать длительное время в экстремальных климатических условиях с температурой тела, близкой к 0 °С, и состоянии гипометаболизма. Изучение подобного рода механизмов перестройки метаболизма и физиологических функций в организме пойкилотермных и гибернирующих животных давало возможность раскрыть функции “триггеров спячки” — нового класса биорегуляторов, способных индуцировать состояние гибернации у человека, что открывало пути использования биомолекул адаптогенов в медицине. Ставилась задача научно обосновать применение гипотермии и криотерапии в медицинской практике на основе изучения патофизиологических, биохимических, морфологических и иммунологических процессов на клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях, а также создать соответствующие технические средства для реализации указанного хо-

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1997. №1-2

This One
L4BE-959-3G0L
Матеріал, захищений авторським правом

лодового воздействия в биологии и медицине. Решение этих фундаментальных проблем имело большое практическое значение для медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной практики, поскольку позволяло более эффективно проводить лечение патологических процессов, в том числе не поддающихся традиционным методам терапии. В процессе постановки, реализации и углубления исследований в области физико-химической криобиологии, иммунологии и патофизиологии в институте сформировалось несколько ведущих научных школ, которые получили широкое отечественное и международное признание.

Так, научная школа, созданная и руководимая членом-корреспондентом НАН Украины А.М.Белоусом, проводила исследования по изучению физико-химических свойств мембранных структур клеток и белков цитоскелета в процессе их охлаждения, замораживания и репарации. Исследования показали важную роль липидов, холестерина и ионных насосов в развитии холодового шока и низкотемпературных повреждений клеток. В 1977 году А.М.Белоус, В.А.Бондаренко и Т.П.Бондаренко обосновали структурную гипотезу криоповреждений, которая предусматривала важное значение термодинамических, физико-химических и биохимических уровней перестройки плазматических мембран клеток как первичной мишени криовоздействия. Существенную роль в углублении криобиохимических исследований имели изданные в этот период монографии "Структурные изменения биомембран при охлаждении" (А.М.Белоус, В.А.Бондаренко, 1986 г.) и "Барьерные свойства мембран при низких температурах" (А.К.Гулевский, В.А.Бондаренко, А.М.Белоус, 1988 г.), в которых было изложено современное состояние теории и методологии физико-химической криобиологии мембранных структур.

Достаточно весомым научным вкладом этого коллектива явилась также расшифровка механизмов криоповреждения и криозащиты лизосомальных гидролаз (Л.П.Кравченко, В.И.Луговой) и белоксинтезирующего аппарата клеток (хроматин, рибосомы, ферменты и факторы белкового синтеза на уровне генерации и трансляции генетической информации), поскольку их структурно-функциональное состояние во многом определяет репаративные возможности клеток в период отогрева. Было установлено, что криопротекторы (глицерин, ДМСО, ПЭО, сахароза) приводят к обратимому ингибированию биосинтеза белков и функции ДНК (А.Б.Митряев). Изучение механизма этого явления с использованием системы бесклеточного синтеза белка показало, что основной причиной наблюдаемых метаболических сдвигов является угнетение клеточного транспорта катионов, аминокислот, нуклеозитов, а также непосредственное нарушение ферментных систем синтеза нуклеиновых кислот и белка. Было установлено, что на уровне трансляции генетической информации механизм обратимого ингибирования биосинтеза белков обусловлен тормозящим влиянием на этот процесс фактора белковой природы, выделяющегося из митохондрий в результате их криоповреждения (В.И.Загнойко, А.К.Гулевский).

Важное значение в расшифровке механизмов клеточных повреждений придавалось изучению поведения интранспортных систем плазматических мембран и мембран внутриклеточных органелл для ионов. На основании полученных данных была выдвинута (Г.Ф.Жегунов), а затем экспериментально подтверждена гипотеза, раскрывающая механизм разобщения ферментативного гидролиза АТФ с процессом транспорта иона во внутрь мембранных везикул после низкотемпературного воздействия. Было доказано, что нарушение барьерной функции плазматических мембран клеток при замораживании-отогреве характеризуется формированием в них микро- или макродефектов (О.А.Семенченко), размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембране. Важным выводом явилось обнаружение, что некоторые типы вне-

Матеріал, захищений авторським правом

клеточных белков, криопротекторов проникающего типа и растворы солей, замерзающих в виде гидратов, особенно с увеличением скорости замораживания, способствуют сохранению барьерной функции плазматических мембран деконсервированных клеток (А.К.Гулевский). Исследованиями в области развития и течения осмо. ческого и температурного шока клеток было установлено (В.А.Бондаренко, Т.П.Бондаренко), что факторами, контролирующими чувствительность клеток к холодовому шоку, являются исходный объем и разница осмотического давления между внутриклеточной и наружной средой, а их повреждение связано с деформацией упругих элементов мембранного цитоскелета при его осмотической дегидратации и нарушении метастабильности клетки (Н.Г.Земляных). На основе проведенных исследований создан новый метод криоконсервации клеток крови. В частности, использование непроникающих криопротекторов в комбинации с предварительной холодовой "адаптацией" клеток при 0 °С, которая сопровождается изменением структурного состояния белков цитоскелета, позволило разработать безотмывочный способ криоконсервации эритроцитов человека (Л.А.Бабийчук).

Дальнейший прогресс в области криобиологии неразрывно связан с углублением разработок по проблеме естественного анабиоза простых и сложных организмов (Г.Ф.Жегунов, А.К.Гулевский). Исследование механизмов естественного гипо- и анабиоза является источником раскрытия глубинных закономерностей структуры и функции живых систем, переживающих в экстремальных ситуациях, управляемых гипометаболических и гипотермических состояний организма с помощью биологически активных веществ из тканей зимнеспящих животных, с выделением низко- и высокомолекулярных антифризов и нуклеаторов льда из насекомых, способствующих их адаптации к умеренно низким (0 °С), а также отрицательным температурам. Исследования по изучению белоксинтезирующей активности бесклеточных экстрактов из печени гибернирующих животных, находящихся в различном функциональном состоянии, показали, что при глубокой спячке сохраняется пул информационных РНК, обеспечивающий при пробуждении повышение температуры до нормотермии, сопровождающейся очень быстрым восстановлением уровня интенсивности биосинтеза белков (В.И.Загнойко, А.К.Гулевский). Расшифровка механизмов выявленного феномена с помощью методов ультрацентрифугирования (А.Ю.Семенченко) и электронной микроскопии показала, что при впадении в спячку происходит диссоциация полирибосом до моносом и, по-видимому, "консервация" информационных РНК в виде особых внутриклеточных частиц-информосом. Поиск механизмов активации ионного транспорта в весенне-летний период у гибернирующих животных позволил установить, что это связано с модификацией белков цитоскелета и липидного слоя мембран, в котором активируются процессы перекисного окисления липидов и увеличивается активность ферментов. Остается актуальным поиск факторов, обладающих способностью инициировать холодоустойчивость и другие необычные свойства клеток гибернирующих животных. Установлено, например, что некоторые фракции мозга гибернирующих животных имеют выраженную противовоспалительную активность, а также способны снижать пассивную проницаемость мембран для ионов Ca^{2+}, что приводит к понижению внутриклеточного содержания этого катиона, являющегося одним из важных регуляторов метаболической и структурной активности клеток.

Таким образом, дальнейшие исследования в области естественного гипобиоза могут открыть механизмы длительного гипометаболического и гипотермического состояния гибернантов, что имеет большое значение для медицинской практики и, возможно, космической медицины.

Изучение механизмов устойчивости организмов в условиях искусственного охлаждения нашло отражение в работах школы профессора Г.А.Бабийчука по нейрофизиологии процессов, контролирующих терморегуляцию и холо-

Матеріал, захищений авторським правом

довую адаптацию животных и человека. Проведенные комплексные исследования по изучению механизмов действия охлаждения на метаболические и физиологические процессы, протекающие в тканях головного мозга и сердечно-сосудистой системе, позволили выявить новые закономерности в реализации первичных механизмов ответной нейрогуморальной реакции организмов на охлаждение. К их числу, прежде всего, следует отнести индуцируемый выброс норадреналина из преоптической области гипоталамуса и подавление секреции серотонина. Впервые установлено, что охлаждение головного мозга животного влияет на степень сродства β-адренорецептора к нейромедиатору при изменении его количества в мембранах нейросекреторных клеток. Такая структурная перестройка ведет к снижению активности системы центральной внутриклеточной регуляции метаболизма и, в частности, активности аденилатциклазы и уровня циклических нуклеотидов. При этом происходит волнообразная перестройка пространственной синхронизации биоэлектрической активности головного мозга, которая коррелирует с изменениями процессов секреции, рецепции и проницаемости гематоэнцефалического барьера для норадреналина. Выдвинута гипотеза о важном вкладе нейротрансмиттерных механизмов в изменение биоэлектрической активности коры и гипоталамуса головного мозга при охлаждении тела, а также о роли проницаемости гематоэнцефалического барьера для биорегуляторов и гормонов. Согласно выдвинутой гипотезе уровень пространственной синхронизации секундного ритма биоэлектрической активности коры и гипоталамуса может отражать функциональное состояние терморегуляционных центров при охлаждении, что позволит в перспективе прогнозировать и управлять программой снижения температуры тела животных и человека в условиях применения искусственной краниоцеребральной гипотермии, которая оказалась эффективным способом лечения черепно-мозговых травм, психозов, алкогольного абстинентного синдрома, маниакально-депрессивного состояния, бесплодия, токсикозов беременности, вегетососудистых расстройств.

Существенное место в научной деятельности института занимает комплекс биофизических исследований, проводимых под руководством члена-корреспондента НАН Украины Н.С.Пушкаря и профессора В.А.Моисеева. Используя современные методы (ЭПР, ЯМР высокого разрешения, микрокалориметрия, СВЧ-диэлектрометрия, криомикроскопия и др.), научные коллективы этой школы проводят глубокие исследования по изучению поведения замороженных растворов криоконсервантов макромолекул и клеток. В частности, обнаружена способность молекул некоторых типов криопротекторов формировать комплексы с биокатионами, а также стабилизировать структуру биомолекул в растворах (О.А.Нардид). При этом в результате взаимодействия криопротекторов (глицерина, полиэтиленоксидов и др.) с биомакромолекулами и мембранами вокруг белков и клеточных мембран формируется сольватная оболочка, в которую входят и молекулы криопротекторов, что препятствует их стерическому сближению и резкому структурному переходу при фазовом переходе вода-лед. Исследования молекулярной динамики замороженных водных растворов показали (А.В.Зинченко), что, начиная с температуры порядка −100 °С, в системе происходит изменение подвижности молекул, которое приводит к стеклопереходу, дополнительной кристаллизации и плавлению и свидетельствует о существовании жидкой и твердой фаз в системе до температур “линии солидуса” (А.М.Воротилин).

Получены данные о характере процессов кристаллообразования в клеточных суспензиях в зависимости от условий и режимов охлаждения-отогрева. Изучены кинетика деформации и изменение объема клеток в процессе замораживания, а также характер их взаимодействия с растущими кристаллами льда (Л.Ф.Розанов). Установлено, что механическое взаимодействие растущих кристаллов льда с клетками обусловлено расклинивающим давлением,

Матеріал, захищений авторським правом

возникающем в тонкой пленке жидкости между кристаллами и клетками. Построены и экспериментально подтверждены физико-математические модели, описывающие процессы осмотического лизиса и температурного шока, обезвоживания клеток и внутриклеточной кристаллизации (Е.А.Гордиенко). На модельных системах — эмульсиях типа вода-масло — показано, что процесс инициирования внутриклеточной кристаллизации зависит от состава плазматических мембран и применяемых криозащитных сред. Отмечена перспективность использования ультразвуковой обработки клеток как модификатора кристаллообразования при их подготовке и в процессе криоконсервирования (В.И.Вишневский).

Дальнейшие исследования физико-химических свойств растворов криопротекторов и клеточных суспензий в зоне низких температур (–196 °С до значения температуры расстеклования) (позволили выявить новый механизм криоповреждений клеток — механоэлектрический, суть которого состоит в том, что при изменении температуры образца на границе раздела кристалл-стекло наблюдается растрескивание кристаллической массы и появляется заряд на вновь образованных поверхностях кристаллов. Возникающая при этом разность потенциалов способна вызвать ионизацию вещества и электростатическое излучение (феномен криолюминесценции), которое необратимо нарушает структуру и функции клетки в зоне ультранизких температур (В.Д.Зинченко, А.В.Зинченко). Широкое использование ЯМР высокого разрешения позволило доказать эффективность этого неразрушающего клетку метода как индикатора динамики распада макроэргических метаболитов на различных этапах криоконсервирования клеток, а также при реализации криотехнологий замораживания клеток и тканей, а возможно, и органов (В.Д.Зинченко). На основе проведенных исследований разработано ряд дополнительных рекомендаций по повышению эффективности низкотемпературного консервирования биологических объектов, предусматривающих применение инициаторов кристаллизации, стабилизаторов мембранных структур, а также быстрый отогрев, ультразвуковую обработку консервируемой клеточной суспензии (А.М.Воротилин, Л.Г.Кулешова).

Построена математическая модель, устанавливающая взаимосвязь между формой и распределением отдельных компонентов в клетке, объясняющая физическую причину явления сепарации белков и липидов в латеральной плоскости мембраны при ее деформации. Экспериментально доказано, что подобного рода структурные перестройки плазматической мембраны клеток сопровождаются формированием в ней микро- и макродефектов и нарушением водного и электролитного обмена (О.И.Гордиенко). На основании проведенных биофизических исследований и физико-математических обобщений сделаны важные выводы о развитии повреждения мембранных структур в твердофазной матрице. В частности, одной из причин повреждения биообъектов может быть развитие электрических полей или механических напряжений на границах между мембранной и твердой матрицей в замороженных растворах.

Научная школа, выясняющая механизмы криоповреждений и криозащиты репродуктивных клеток (гамет, эмбрионов, гонад, эмбриональных клеток и тканей), возглавляемая академиком НАН Украины В.И.Грищенко, работает в направлении изучения особенностей действия сверхбыстрого замораживания половых клеток животных и человека, а также выясняет роль низких температур как фактора "селекции" при замораживании клеточной суспензии. Выдвинутая гипотеза (В.И.Грищенко, Е.Я.Панков, Э.И.Обозная-Печенежская) постулирует, что в процессе действия на клетки ультранизких температур (–196 °С) выживает, очевидно, их определенная доля, обладающая исходно повышенной холодоустойчивостью связанной с пока еще не выясненными причинами. Авторы данной концепции полагают, что в этом случае в популяции замораживаемых клеток существуют отдельные или группы кле-

Матеріал, захищений авторським правом

ток, молекулярная структура которых равно как и их регуляторные системы обладает определенной устойчивостью к действию кристаллов льда и других факторов криоконсервации. Разработан способ сверхбыстрого замораживания спермы и эмбрионов человека, который запатентован в США, Англии, Франции, ФРГ, Японии. Выяснилось, что ультрабыстрое замораживание (10–12000 град/мин) репродуктивных клеток достаточно эффективно сохраняет их функциональную полноценность и, в частности, состояние генома, плазматических мембран, внутриклеточных органелл и их акросомального аппарата, что позволяет успешно решать проблемы бесплодия в браке. В настоящее время на базе Харьковского акушерско-гинекологического центра функционирует криобанк донорской спермы, в котором содержится свыше 20 тыс. спермодоз криоконсервированного биоматериала. В условиях криобанка сохраняется также овариальная ткань, аллотрансплантация которой является эффективным методом коррекции генеративной функции женщин при эндокринном бесплодии. Так, после проведенных пересадок у 36,7 % женщин с недостаточностью лютеиновой фазы наступала беременность, причем это не сопровождалось существенной стимуляцией иммунной системы организма реципиенток.

Для освоения, внедрения и совершенствования программы экстракорпорального оплодотворения человека потребовалось провести исследования на экспериментальных животных, в частности, разработку композиционных сред и изучение механизма их влияния на эквилибрационный период, режимный параметр охлаждения, замораживания и отогрева. Установлено, что наиболее устойчивыми к криовоздействию являются яйцеклетки, полученные у женщин с нормальным гормональным преовуляторным фондом, а при повышении концентрации в крови эстрадиола изолированные яйцеклетки после замораживания-отогрева характеризуются низкой жизнеспособностью. Результаты разработок были изложены в монографиях “Криоконсервация репродуктивных клеток” (А.М.Белоус, В.И.Грищенко, Ю.С.Паращук, 1986) и “Криобиология и проблема бесплодия” (В.И.Грищенко, 1990).

Научно-исследовательские работы, проведенные совместно с Харьковским медуниверситетом, по освоению и внедрению в клиническую практику метода экстракорпорального оплодотворения позволили разработать критерии отбора супружеских пар для этой программы, подобрать оптимальные схемы суперовуляции с использованием импортных препаратов хугемона, профазы, неопергонала, простогландина, а также отечественного препарата грифалан, обладающего ФСГ-активностью. Только на протяжении 1990-1996 гг. было осуществлено свыше 650 эмбриотрансплантаций, получено 322 беременности, 156 из которых завершились рождением нормальных детей “из пробирки”.

Традиционным направлением исследований в криобиологии репродуктивных систем является изучение механизмов криоповреждений и криозащиты спермы редких, исчезающих и промысловых видов рыб. Так, например, получены важные в теоретическом и прикладном плане данные о природе факторов, влияющих на исходную криоустойчивость спермиев. В частности, выявлен более высокий уровень молекулярного отношения холестерин/фосфолипиды в спермиях морских видов рыб по сравнению с таковыми пресноводных особей, что свидетельствует о существенной значимости этой системы в развитии устойчивости спермиев рыб к осмотическим градиентам среды. Создан первый в нашей стране коллекционный криобанк спермы рыб, в котором при −196 °С хранится более 3000 образцов, что позволяет проводить широкие селекционные работы.

Важное место занимают исследования по изучению патогенеза криоразрушений и криозащиты эмбриональных, гемопоэтических и плодовых клеток печени человека (Г.С.Лобынцева, Н.П.Суббота, И.А.Вотякова). В частности, детально исследованы функция генетического аппарата и системы энергопро-

Матеріал, захищений авторським правом

дукции клеток, их иммунологические и биологические свойства. Выяснилось, что эмбриональные клетки-предшественники эритроидного ростка после криоконсервирования способны восстанавливать гемопоэз у летально облученных животных, т.е. могут приживаться и функционировать в организме реципиента. Клинические испытания, проведенные в 5 клиниках Украины, свидетельствуют, что после трансфузии криоконсервированных клеток эмбриональной печени человека у больных с анемическими и апластическими состояниями различного генеза достаточно полно восстанавливается гемопоэз. Различные по своей природе эмбриональные ткани (поджелудочная и другие эндокринные железы, эмбрионы, плацента) могут быть источником получения биологически активных веществ и поэтому они являются предметом исследований для установления их клинической эффективности. Накапливаются данные, что эмбриональные ткани с низкой иммунологической активностью содержат в своем составе биорегуляторы пептидной природы, которые обладают высокой активностью в ничтожно низких концентрациях, в связи с чем они могут оказаться новыми, высокоэффективными фармакологическими препаратами для лечения различного рода патологических процессов, включая неопластический рост.

Дальнейшее развитие эта медицинская проблема получила после широкого использования ряда биологически активных тканей в лечебной практике. В частности, был разработан способ криоконсервирования и трансплантации размороженной щитовидной железы (А.М.Утевский, Н.С.Пушкарь, В.А.Чуйко). Практической реализации этих методов в клинических условиях предшествовали всесторонние экспериментальные исследования особенностей криоповреждения и криозащиты клеток желез внутренней секреции, в результате которых были получены доказательства почти полного сохранения важнейших функциональных процессов в щитовидной железе после замораживания в присутствии димексида. Это связано с тем, что действие низких температур на щитовидную железу носит характер модуляции, т.е. приводит к увеличению активности катепсина Д, нестимулируемой и фторидчувствительной активности аденилатциклазы и связывания норадреналина.

На базе исследований (В.В.Лемешко, А.Ю.Петренко, С.П.Мазур) разработан технологический процесс криоконсервирования ксеногепатоцитов, включающий подготовку донорского органа и получение изолированных ксеногепатоцитов, транспортирование криоконсервированного материала в лечебное учреждение и его трансплантацию при лечении различных эндотоксических синдромов и других видов патологии (Н.П.Суббота).

Консервированные клетки и ткани поджелудочной железы используются для лечения диабета и его осложнений (Б.П.Сандомирский, Н.А.Волкова). Создан низкотемпературный банк ксеногенной инсулинпродуцирующей ткани, пригодной для клинического использования.

Исследования глубокого анабиоза и ангидробиоза в иммунологии и микробиологии проводятся на базе научной школы профессора А.А.Цуцаевой. Установлено, что в биологических объектах независимо от уровня организации (иммунные глобулины, вирусы, фаги, микробные клетки и клетки культуры ткани, гибридомы, кроветворные клетки и др.) после выхода из состояния глубокого анабиоза возникают главным образом нелетальные повреждения различных по своей природе компонентов, которые могут сопровождаться обратимым ингибированием или стимуляцией функциональной активности. В частности, было установлено, что после замораживания у некоторых штаммов актиномицет и дрожжей стимулируется продукция антибиотиков и ферментов на фоне ингибирования их пролиферативной активности, в результате чего удлиняется lag-период, изменяются топография и свойства рецепторов мембран, а также нуклепротеидов частиц. Причиной указанных изменений клеток является нарушение активности процессов метаболизма нуклеиновых

Матеріал, захищений авторським правом

кислот и белков, структуры биомакромолекул, которые участвуют в регуляции этих процессов (Ю.Е.Микулинский).

В результате индукции нелетальных повреждений клетки становятся менее стабильными к действию факторов, к которым они исходно были устойчивы. Для устранения указанных клеточных повреждений было научно обосновано использование некоторых биологически активных препаратов (РНК, ДНК, усиленная аэрация, АТФ) и растворов, обогащенных ростовыми факторами.

Важным фактором явилось установление синтеза стресс-белков клетками прокариотов на этапе перехода и выхода из состояния глубокого холодового анабиоза. Выяснилось, что синтез этих белков индуцируется не только под влиянием охлаждения, но и после воздействия на биологические объекты гиперконцентрированных растворов солей в условиях нормотермии.

Показано, что обратимые изменения свойств биологических объектов, сопровождающиеся рядом структурно-функциональных нарушений, могут оказаться полезными при их практическом использовании. Так, стимуляция антибиотика и ферментопродукции криоконсервированными микроорганизмами позволяет создать запасы посевного материала, исключить стадию подращивания и восстановления свойств при сохранении их традиционными методами. В результате ингибирования продукции интерферона в криоконсервированных клетках культуры ткани они становятся более чувствительными к вирусной инфекции, что приводит к их быстрому размножению и накоплению внутри клетки. Использование таких клеток позволяет повысить эффективность выделения ценных штаммов вирусов из исходного материала для производства вакцины и сыворотки.

В настоящее время разработаны эффективные технологические процессы криоконсервирования кроветворных, иммунокомпетентных клеток, гибридом, различных штаммов микроорганизмов на основе криоконсервантов, не требующих удаления перед введением в организм.

Актуальной проблемой является изучение искусственного ангидробиоза, что связано с созданием эффективных установок, которые позволят выполнять все этапы лиофилизации прокариот в заданном режиме.

Проводятся исследования в области иммунологии. Было, например, установлено, что индукция иммунных реакций на криоконсервированные аллогенные трансплантаты кожи у реципиента выявляется в более поздние сроки и меньшей интенсивности, чем на нативные. Причиной этого является снижение иммунных свойств кожных лоскутов под влиянием криоконсервирования. Выяснилось, что на трансплантаты в виде суспензий клеток (миэлотрансплантаты) характер иммунного ответа отличается по своей интенсивности (А.Н.Гольцев, Н.Н.Попов). Были изучены особенности процессов пролиферации, дифференцировки и образования зрелых потомков из криоконсервированных кроветворных клеток. Установлено, что одной из причин задержки восстановления процессов иммуногенеза и гемопоэза является нарушение систем регуляции, в том числе нейроэндокринной. Выявлено, что под влиянием замораживания свойства сайтов мембран кроветворных клеток и лимфоцитов, ответственных за восприятие регуляторных сигналов, обратимо нарушаются. Установленные факты явились обоснованием развития нового направления в криобиологии — нейроиммунологии, — предусматривающего изучение механизмов нейрорегуляции процессов гемо- и иммуногенеза и поиска способов репарации и коррекции свойств регуляторных систем у летально облученных реципиентов, а также разработки эффективных методов лечения иммуно- и гемодепрессивных состояний лучевого и нелучевого генеза.

Успешное развитие криобиологии во многом связано с интенсификацией криоморфологических исследований, которые нашли широкое применение при изучении характера ультраструктурных криоповреждений и репарации

Матеріал, захищений авторським правом

изолированных клеток и тканей (школа профессора Т.Н.Юрченко). В качестве модельного объекта используется в основном ткань роговицы, что позволяет проводить корреляцию между изменяющимися структурно-функциональными показателями и жизнеспособностью ткани в прямом тесте — при трансплантации. В частности, было обнаружено, что чувствительность клеток роговицы к воздействию криопротекторов и низких температур может быть сопоставима с реактивными изменениями в клетках костного мозга и крови, что находит отражение в различиях активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов, определяемых цитохимическими методами.

Разработана концепция, в которой изложены последовательность микроскопических процессов, развивающихся при действии предварительного охлаждения на клетку, и роль охлаждения в механизме гомеостатической перестройки метаболизма. Эта гипотеза в результате углубленного изучения динамики активности окислительно-восстановительных ферментов, ультраструктуры клеток и внутриклеточных органелл (А.С.Капрельянц) после гипотермического воздействия получила дальнейшее развитие в аспекте постулирования зависимости уровня адаптированности биообъекта к изменившимся условиям окружающей среды.

Морфологические исследования, проведенные при изучении реакции организма на холодовое воздействие как целостной системы, показали, что быстрое охлаждение до 20 °С по сравнению с медленным оказывает более выраженный кардиопатогенный эффект, часто сопровождающийся необратимыми контрактурными изменениями (В.Ф.Козлова).

Создание и развитие технологических процессов криоконсервирования различных по своей природе биоматериалов невозможны без эффективной разработки, синтеза и апробации криопротекторов и криоконсервантов (В.И.Луговой). Благодаря обширному скринингу было установлено, что активные химические криопротекторы сосредоточены в основном лишь в нескольких классах органических веществ — полиолах, амидах оксидах. Для создания и прогнозирования новых криозащитных веществ разработан и используется метод систематического исследования зависимости криозащитной активности, цитотоксичности и общей токсичности соединений в гомологических рядах полиолов и амидов от их химической структуры и физико-химических свойств. Оказалось, что наиболее перспективные соединения для использования их в качестве криопротекторов находятся в начале ряда диолов: для эритроцитов человека — моно, ди-(метил- или метилен-) производные этиленгликоля, а для спермы карпа — монометилпроизводные. С целью описания структуры криопротекторных веществ изучаются и теоретически рассчитываются топографические, физические и физико-химические показатели: размер молекул, число водородных связей, молекулярная рефракция, число гидратации и другие, численное выражение которых используют для получения математической модели. Предложены перспективные криопротекторы в ряде амидов для спермы птиц (метилформамид, метилацетамид) и их смеси. При создании новых криопротекторов используется также метод их химической направленной модификации. Так, в частности, осуществлено оксиалкилирование соединений в рядах полиолов и амидов, которое влияет на гидрофильно-гидрофобный баланс молекулы и ее основность. В ряду полиэтиленоксидов олигомер со степенью полимеризации 9 и средней молекулярной массой 400 оказался малотоксичным и достаточно эффективным, не требующим удаления криопротектором для костного мозга, кожи, клеток крови.

При изучении влияния степени гидрофобности на криопротекторную активность замещенных полиэтиленоксидов могут быть получены их алкиловые сферы с радикалами различной длины, а также производные полиэтиленоксидов, содержащие в цепи гидрофобные метильные группы, изменяющие конфигурации оксиалкильной цепи. В настоящее время некоторые виды алкило-

Матеріал, захищений авторським правом

вых эфиров полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 синтезированы оксиэтилированием соответствующих эфиров гликолей: метилового, этилового, бутилового, фенилового. Оказалось, что присоединение более тяжелых радикалов (бутил, фенил) к производным полиэтиленоксида полностью устраняет их криозащитную активность, а замена конечной ОН-группы в полимерной цепи на метильный радикал, наоборот, повышает криопротекторные свойства при более низких его концентрациях.

Заменой гидроксильных групп алкильными радикалами были модифицированы молекулы глицерина. Так, например, монометиловый эфир глицерина оказался эффективным защитным веществом при криоконсервации тромбоконцентрата, клеток перевиваемой культуры (М.И.Шраго).

При оксиэтилировании глицерина на щелочном катализаторе получены криопротекторы, токсичность которых снижается по мере увеличения степени полимеризации, а биологическое действие зависит от молекулярной массы олигомера. Так, полимергомолог оксиэтилированного глицерина со степенью полимеризации n=3 или 5 оказался эффективным криопротектором при замораживании некоторых видов культур клеток, миэлокариоцитов и лейкоцитов.

Совместно с отделом криобиофизики (А.М.Воротилин) завершены с положительными результатами клинические испытания криоконсерванта пропандиосахароля, используемого для замораживания эритроцитов.

Теоретические и практические задачи использования низких температур как для разрушения патологически измененных тканей, так и в качестве фактора, стимулирующего процессы заживления криораны, решает научная школа профессора Б.П.Сандомирского. Это направление в криомедицине нашло практическую проверку в камбустиологии, когда для пластики у обожженных больных использовали криоконсервированную кожу. Экспериментально была обоснована методика криотерапии ожоговых ран. Такие возможности в клинике открывались после всестороннего изучения патофизиологических механизмов острого воспаления в результате высоко- и низкотемпературных воздействий, установления закономерностей морфологических, биохимических и сосудистых реакций в зоне повреждения. Было обнаружено, что дозированное охлаждение может оказывать стимулирующее влияние на процессы регенерации в очаге острого и хронического воспаления. Такой подход позволил создать и научно обосновать способы холодового лечения ожоговых и гнойных ран, трофических язв, пептических язв 12-перстной кишки, хронического тонзиллита.

Изучение возможностей сочетания низких температур с другими физическими факторами (ультразвук, лазер, плазменный скальпель) позволило создать новые методы атипической резекции печени ультразвуковым скальпелем после предварительного замораживания части органа, криокоагуляции полипов и кровоточащих сосудов в просвете желудка и 12-перстной кишки. Реализация этих методов лечения стала возможной после создания специального эндоскопического криоинструмента — криоэлектрокоагулятора КЭК-1, а также других эндоскопических криоинструментов для холодового лечения заболеваний печени, опухолей мочевого пузыря и других органов.

В специальном конструкторско-технологическом бюро с опытным производством института разрабатывается конструкторская документация для изготовления действующих макетов и опытных образцов комплектов криооборудования, отдельных приборов и криоинструментов. При этом осуществляется изготовление опытных и промышленных образцов для реализации технологических процессов криоконсервирования и сублимационной сушки различных биоматериалов, создания технических средств гипотермии и криотерапии, а также приборов для научных медицинских и биологических исследований в условиях единичного и мелкосерийного производства (А.С.Снурников). Созданы лабораторные и полупромышленные установки для сублимаци-

Матеріал, захищений авторським правом

онного и низкотемпературного консервирования различных биоматериалов малых объемов с использованием жидкого азота, элементов Пельтье и безазотных холодильных агрегатов. Разработан, испытан и совершенствуется аппарат универсальной гипотермии для охлаждения организма и отдельных участков тела животных и человека, включая краниоцеребральную и локальную гипотермию, а также новый тип криокоагулятора и эндоскопов, позволяющих осуществлять локальные холодовые воздействия методом распыления и
13 непосредственного контакта.

Подводя итоги пройденного пути, хотелось бы отметить, что, начав свою деятельность в составе 47 человек, за 25 лет коллектив вырос до 345. В настоящее время институт располагает лабораторным корпусом, в котором работают 12 отделов, изотопная лаборатория, научная библиотека, вычислительный центр, редакция научно-теоретического журнала "Проблемы криобиологии".

Институт имеет сложившуюся репутацию и широкие контакты с учеными СНГ, Украины и зарубежных криобиологических центров США, Великобритании, ФРГ, Индии, Чехии, Словакии, Болгарии, Бельгии, Нидерландов, Израиля, что позволяет осуществлять комплексные программы по криобиологии репродуктивных клеток (сперма, яйцеклетки, зиготы), консервированию клеток, тканей, органов, а также проводить взаимные стажировки сотрудников.

Признание приоритета фундаментальных исследований в области криобиологии и криомедицины со стороны ведущих зарубежных криобиологических центров выразилось в избрании академика НАН Украины В.И.Грищенко, членов-корреспондентов НАН Украины А.М.Белоуса и Н.С.Пушкаря членами Международного общества криобиологов и первых двух — членами редакции зарубежных журналов "Cryobiology" и "Cryo-Letters".

Институт занимает одно из ведущих мест в области фундаментальной и прикладной криобиологии и криомедицины. Комплексные исследования по раскрытию механизмов криоповреждений, репарации и криозащиты на молекулярном и клеточном уровнях, по синтезу и созданию новых криоконсервантов снискали ему признание в нашей стране, СНГ и за рубежом.

Важными достижениями института явились разработка и координация крупной комплексной программы по криобиологии. Деятельность института в различных областях криобиологии и криомедицины нашла отражение в широких связях с вузами г. Харькова и организации встреч ученых. Начиная с 1972 года, институтом самостоятельно и совместно с другими учреждениями проведены две конференции в рамках СНГ (1977, 1984 гг.), учредительный съезд криобиологов Украины (1995 г.), 3 школы для молодых ученых, 3 международные конференции по криобиологии (1983, 1988, 1995 гг.), а также ряд узких научных встреч с учеными ФРГ, Японии, Великобритании, Бельгии. В 1995 году создано научное общество криобиологии и криомедицины Украины, а с 1981 года при институте создан и функционирует специализированный Совет (по защите докторских диссертаций), в котором 28 научным сотрудникам присвоена степень доктора наук и 151 — кандидата наук (председатель Совета — академик НАН Украины В.И.Грищенко, ученый секретарь — доктор мед. наук А.Н.Гольцев).

Научные результаты института отражены в 75 монографиях и сборниках трудов, свыше чем в двух тысячах статей. Сотрудники института получили 63 патента и свыше 200 авторских свидетельств, за научные достижения и внедрение результатов в практику — Государственные премии СССР и УССР (В.И.Грищенко, Н.С.Пушкарь, М.И.Шраго, Т.Н.Юрченко, Т.М.Шарлай, А.М.Белоус, А.М.Воротилин, В.А.Моисеев, Г.С.Лобынцева, А.Н.Гольцев, В.И.Луговой). Именными премиями Национальной академии наук Украины награждены 12 работников института (А.М.Утевский, А.М.Белоус, Н.С.Пушкарь, Ю.А.Иткин, Б.П.Сандомирский, Н.А.Волкова, Ю.И.Исаев, В.А.Чуйко,

Матеріал, захищений авторським правом

А.К.Гулевский, В.А.Бондаренко, В.И.Грищенко, Г.А.Бабийчук). Премии для молодых ученых получили А.Ю.Петренко, В.А.Коптелов, О.В.Кудокоцева, О.С.Прокопюк, В.И.Мусатов, М.И.Щетинский.

Оценивая пройденный 25-летний путь научной и научно-организационной деятельности института, можно с полной уверенностью утверждать о его большом вкладе в становление и развитие криобиологии как науки, которая по праву заняла подобающее место среди таких фундаментальных дисциплин, как биология, биофизика, радиобиология, биохимия. Создан теоретический, экспериментальный и прикладной базис для дальнейшего изучения действия холода на сложные биологические объекты, включая организменный уровень, что открывает большие перспективы для практики биологии и особенно медицины.

УДК 061.6:57.043

В.Г.Манжелий, М.И.Шраго

У ИСТОКОВ ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Удивительно, что одновременно во всем мире в 50–70-е годы произошел всплеск во взаимодействии между точными науками и науками о человеке. Это привело к буквально революционным изменениям в биологии и медицине — от фундаментальных открытий на молекулярном и клеточном уровнях до создания принципиально новых методов диагностики и лечения. Организационные формы упомянутого взаимодействия были весьма разнообразны и определялись как местными условиями, так и характером и возможностями энтузиастов. Однако существенные достижения на этом пути требовали от их организаторов и участников чрезвычайных усилий, инициативы, изобретательности и самоотверженности.

Создание в 1972 году Института проблем криобиологии и криомедицины в Харькове было результатом научных и организационных усилий многих людей. Важно отметить решающую роль двух лидеров Бориса Иеремиевича Веркина и Николая Сидоровича Пушкаря, людей своеобразных, ярких и фантастически энергичных. Академик АН УССР Б.И.Веркин (в 1972 году член-корреспондент АН УССР) — организатор и директор Физико-технического института низких температур — был легко увлекающимся человеком с широчайшим кругом интересов и с непреодолимой тягой к новому. Член-корреспондент АН УССР Н.С.Пушкарь (в 1972 году профессор), занимая должности от ординатора хирургического отделения до заведующего Областным отделом здравоохранения, в науке сохранял верность одной идее — консервированию глубоким охлаждением биологических тканей и их использованию в клинической практике. Встреча этих двух людей и их дальнейшее сотрудничество позволили обобщить многолетний труд ученых (в том числе и их собственный) по применению низких температур в биологии и медицине.

Ниже приведена копия наиболее важной, по нашему мнению, части Постановления Совета Министров Украинской ССР об организации института.

Конечно, место и время создания единственного в СССР института, полностью специализирующегося в области криобиологии и криомедицины, были выбраны не случайно. Во-первых, Харьков — крупнейший промышленный и научный центр Украины — располагал всемирно известными школами физиков, математиков, биологов, медиков, химиков и первоклассными инженерными и конструкторскими кадрами. Именно в Харькове в составе УФТИ была открыта первая в СССР криогенная лаборатория, возглавляемая с 1931 года профессором Львом Васильевичем Шубниковым, а с 1938 года — академиком АН УССР Борисом Георгиевичем Лазаревым. В 1960 году в Харькове был создан самый крупный в стране криогенный научный центр — Физико-техниче-

Матеріал, захищений авторським правом

РАДА МІНІСТРІВ УКРАЇНСЬКОЇ РСР

ПОСТАНОВА

від 7 лютого 1972 р. № 57

Київ

Про організацію в м.Харкові Інституту проблем кріогенної біології і медицини Академії наук УРСР

Рада Міністрів Української РСР ПОСТАНОВЛЯЄ:

1. Організувати в м.Харкові Інститут проблем кріогенної біології і медицини Академії наук УРСР на базі відділу біофізики і відділу виробництва кріогенної апаратури Фізико-технічного інституту низьких температур Академії наук УРСР та Проблемної науково-дослідної лабораторії низькотемпературної консервації хістового матеріалу і крові Українського інституту удосконалення лікарів.

Організацію інституту здійснити в межах загальних асигнувань, фонду заробітної плати і граничних асигнувань на утримання апарату управління, затверджених Академії наук УРСР на 1972 рік.

2. Покласти на Інститут проблем кріогенної біології і медицини проведення наукових досліджень в таких основних напрямах:

– фундаментальні дослідження процесів, що відбуваються в біологічних середовищах, клітинах, тканинах, органах та організмах при різних режимах охолодження і під дією екстремальних факторів;

– вивчення біологічних властивостей і антигенної перебудови тканин, консервованих при низьких температурах. Пошуки засобів її спрямованої зміненості в метою подолання тканинної несумісності і зниження вторинних імунологічних реакцій;

– вивчення впливу кріофізичних факторів;

– створення апаратури і вивчення оптимальних температурних режимів для консервації різних тканин.

3. Погодитися з пропозицією Академії наук УРСР про проведення у 1972 році додаткових науково-дослідних робіт по розробці методів низькотемпературної консервації органів згідно з додатком № 1.

Для забезпечення виконання зазначених науково-дослідних робіт виділити Академії наук УРСР 60 тис.крб., в тому числі на вироб. устаткування 30 тис.крб., в розрахунку по кварталах згідно з додатком № 2.

Міністерству фінансів УРСР профінансувати зазначені витрати за рахунок резерву Ради Міністрів УРСР по бюджетних асигнуваннях на науково-дослідні роботи на 1972 рік.

Держплану УРСР внести відповідні зміни в державний план науково-дослідних робіт і використання досягнень науки і техніки в народному господарстві УРСР на 1972 рік.

4. Дозволити Академії наук УРСР здійснити будівництво в м.Харкові лабораторного корпусу Інституту проблем кріогенної біології і медицини робочою площею до 5 тис.кв.м за типовим проектом.

5. Академії наук УРСР в місячний строк:

– затвердити плани науково-дослідних робіт Інституту проблем кріогенної біології і медицини на 1971–1975 рр. і на 1972 рік;

– вирішити питання про розміщення, матеріально-технічне забезпечення і наукове керівництво Інституту проблем кріогенної біології і медицини;

– розглянути питання про забезпечення спецбудівництва Інституту проблем кріогенної біології і медицини та Фізико-технічного інституту низьких температур по створенню кріогенного устаткування.

Голова Ради Міністрів УРСР В. ЩЕРБИЦЬКИЙ

Керуючий Справами Ради Міністрів УРСР К. БОЙКО

ский институт низких температур АН УССР. Инициатором создания института и его директором был Борис Иеремиевич Веркин. Располагая современными физическими лабораториями, крупным конструкторским бюро и опытным производством, ФТИНТ АН УССР не только проводил совместные с биологами и медиками исследования, но и создавал новую аппаратуру для исследования, диагностики, лечения больных и консервации биологических тканей холодом.

Во-вторых, это был период становления криобиологии и криомедицины как науки, и в многочисленных харьковских учебных и лечебных учреждениях появились энтузиасты, воспринявшие возможность использовать низкие температуры для решения фундаментальных проблем биологии. Чтобы оценить, насколько распространились новые веяния, достаточно перечислить специальности медиков, активно взаимодействующих со ФТИНТом АН УССР: хирурги, иммунологи, стоматологи, офтальмологи, невропатологи, урологи, гинекологи, дерматологи, травматологи. С институтом активно взаимодействовали такие известные харьковские ученые-медики, как Л.Т.Малая, В.И.Грищенко, В.Т.Зайцев, В.А.Никитин, А.А.Шалимов, В.И.Шаповал, Н.Л.Володось, В.С.Проскурнина, В.Ф.Клепиков, В.И.Кононенко и др. В дальнейшем мы ограничимся упоминанием только тех исследований, которые имели прямое отношение к открытию ИПКиК АН УССР. Объединенные усилия таких незаурядных организаторов, какими были Б.И.Веркин и Н.С.Пушкарь, сыграли в этом важнейшую роль. Предпосылки для создания института такого профиля были и в Москве, и в Ленинграде, и в Киеве. Однако там не нашлось признанных лидеров, сумевших эти предпосылки реализовать. Б.И.Веркин неоднократно признавался в частных беседах, что его интерес и даже пристрастие к проблемам биологии, биофизики и медицины возникли еще в молодые годы и не покидали его всю жизнь. Взаимодействие с медиками началось в первый год существования ФТИНТа АН УССР (1960 г.). В Харьковском институте переливания крови и неотложной хирургии вопросами длительного хранения донорской крови и ее препаратов занимались М.И.Шраго и А.А.Шинкаренко, и их предложение использовать с этой целью низкие температуры было сразу же поддержано Б.И.Веркиным. Умело соче-

Матеріал, захищений авторським правом

тая методы убеждения и принуждения, он создал группу сотрудников ФТИНТа АН УССР (В.Г.Манжелий, А.М.Воротилин, В.Г.Данилина, В.М.Гасан), которая в течение ряда лет занималась этой проблемой. Этими исследованиями Борис Иеремиевич постоянно интересовался и фактически принимал в них личное участие. В изготовленном во ФТИНТе альбоме, посвященном 60-летию Б.И.Веркина (1979 г.), содержится любопытная информация об этой деятельности. Ниже приводится фрагмент этого текста. И хотя он написан с некоторыми отклонениями от общепринятого стиля научных статей, организационные и психологические аспекты изложены в нем верно.

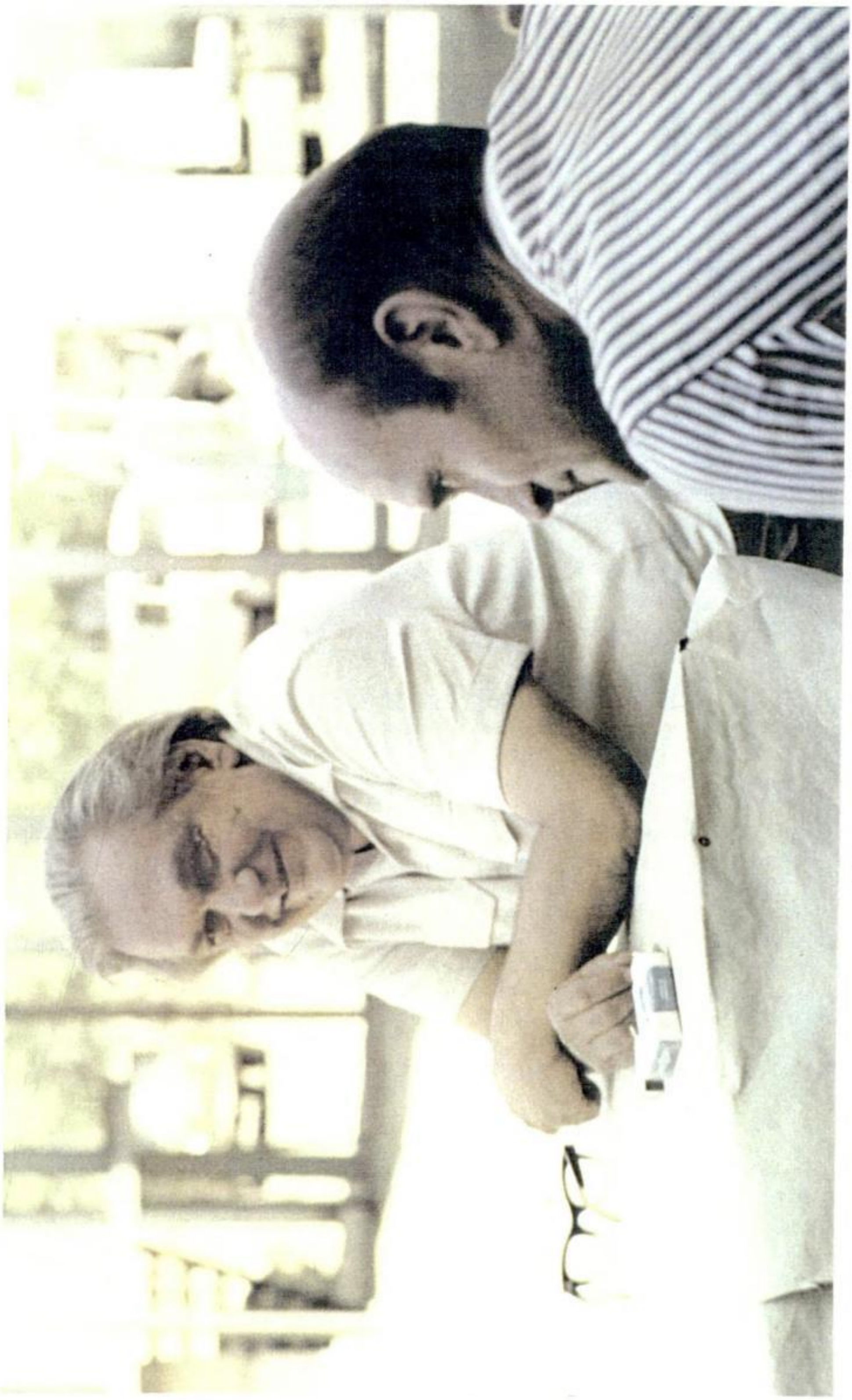
"Долгосрочным направлением было низкотемпературное консервирование крови. История его возникновения — драматическая история любви, коварства и наивности. Любовь к медицине, медикам и страждущему от болезней человечеству терзала Б.И. еще до рождения ФТИНТа. Коварный план — подсунуть своим подчиненным многотрудную задачу замораживания крови в качестве легкого упражнения был разработан Б.И. в соавторстве со Шрого М.И. Наивные сотрудники отдела 9, не слыхавшие до тех пор об анабиозе, согласились после легкого сопротивления, обусловленного исконным недоверием подчиненных к любому заявлению начальства. И многие годы потом замораживали, хранили, отогревали, анализировали."

Проблема низкотемпературной консервации эритроцитов, как и клеток костного мозга (см. ниже), не могла быть успешно решена без применения эффективных криопротекторов, существенно снижающих повреждающий эффект низких температур. После испытания большого количества веществ в качестве криопротекторов были выбраны синтезированные в Харьковском химико-фармацевтическом институте (М.Х.Глузман и Б.И.Дашевская) водорастворимые полимеры окиси этилена, обладающие низкой токсичностью. Эти полимеры различной молекулярной массы и по сей день широко используются для консервирования биологических тканей в условиях глубокого охлаждения.

Научная карьера Николая Сидоровича Пушкаря началась в 1959 году, когда он, врач-хирург с 5-летним стажем, поступил в аспирантуру Украинского института усовершенствования врачей (научные руководители проф. М.М.Ляховицкий и канд. мед. наук В.С.Генес). Не нужно объяснять, почему была чрезвычайно актуальной поставленная перед Н.С.Пушкарем задача — изыскать надежный способ нормализации кроветворения после воздействия на организм ионизирующей радиации. Кандидатская диссертация "Влияние низкой температуры (−183÷−196 °С) на приживаемость костного мозга у облученных животных", защищенная Н.С.Пушкарем в 1963 году, была во многих отношениях пионерским исследованием. Использование консервирования холодом потребовало от диссертанта и научной смелости и средств. Смелости Николаю Сидоровичу было не занимать, а что касается средств, то первый сосуд Дьюара был изготовлен на деньги, подаренные его жене на свадьбе. Вскоре началось взаимодействие с физиками. Существенную помощь оказал академик АН УССР Б.Г.Лазарев, в лаборатории которого (ХФТИ АН УССР) Н.С Пушкарь и Ю.А.Иткин совместно с физиками (Р.Ф.Булатова, И.А.Гинодин, Я.Д.Стародубов) разработали аппаратуру для микроскопического исследования биологических объектов в диапазоне температур 4,2 – 300 К и провели необходимые исследования костного мозга человека.

Широкий размах фундаментальные и прикладные исследования, связанные с консервированием биологических объектов при глубоком охлаждении, приобрели вследствие двух обстоятельств. Первым было объединение усилий харьковских медиков, которых возглавил Н.С.Пушкарь, будучи заведующим Харьковским облздравотделом (1963–1968 гг.), и возможностей крупнейшего криогенного центра страны ФТИНТа АН УССР, директором которого был Б.И.Веркин. Именно во ФТИНТе, Николай Сидорович и его коллеги получи-

Матеріал, захищений авторським правом



Б.И.Веркин и Н.С.Пушкарь

Матеріал, захищений авторським правом

ли научную, техническую, организационную да и моральную поддержку. Благодаря инициативе и усилиям Б.И.Веркина во ФТИНТе было изготовлено многочисленное и разнообразное оборудование для нужд медицины и, в частности, аппаратура для низкотемпературной консервации. Были разработаны, изготовлены и переданы Харьковскому облздравотделу 10 азотных хранилищ для консервированных крови и костного мозга объемом 200 л (В.Ф.Козырев, С.И.Ващук), а в онкологическую поликлинику в Померках — комплект аппаратуры для программного замораживания костного мозга и крови: камера замораживания, камера отогрева, блок управления и контроля. В разработке аппаратуры участвовали: В.Ф.Козырев, С.И.Ващук, А.С.Лысенко, С.А.Раина и др. Блок управления и контроля был разработан в отделе, руководимом Б.Н.Мараховым. Активно участвовали в разработке В.М.Глушач, В.И.Еременко и др. Позже на базе указанного комплекса была разработана документация и изготовлен комплект действующей аппаратуры для демонстрации на Международной выставке в Москве. Некоторые теплофизические расчеты были выполнены И.С.Житомирским.

Понимая ограниченность штатных и технических возможностей медицинских учреждений, Б.И.Веркин принимал на работу во ФТИНТ перспективных ученых-медиков и биологов, создавая им возможности для плодотворной научной работы. Так, офтальмолог В.М.Чередниченко во ФТИНТе занимался вопросами длительной низкотемпературной консервации роговой оболочки глаза с целью ее последующей трансплантации больным с ожогами и помутнениями роговицы. Биологи проф. В.Г.Шахбазов и канд. мед. наук В.В.Глущенко исследовали люминесценцию костного мозга в процессе замораживания, используя разработанную ими совместно с В.И.Церковным аппаратуру с программным управлением.

В 1968 году Н.С.Пушкарь защитил докторскую диссертацию "Консервирование глубоким охлаждением (–196 °С) костного мозга и его использование в клинических целях". Среди учреждений, в стенах которых была выполнена работа, назван ФТИНТ АН УССР, а среди научных консультантов — Б.И.Веркин. Совсем не лишне отметить ту поддержку, которую оказывала Николаю Сидоровичу его супруга и единомышленница в науке Лариса Ивановна Симонова (Научно-исследовательский институт медицинской радиологии). Ее кандидатская диссертация (1969 г.) была посвящена проблемам низкотемпературного консервирования эмбриональной кроветворной ткани.

В сентябре 1968 года при Украинском институте усовершенствования врачей МЗ СССР была создана Проблемная научно-исследовательская лаборатория низкотемпературной консервации костного мозга и крови. Инициатором создания и руководителем лаборатории был Н.С.Пушкарь. Лаборатория была хорошо оснащена, а ее штат, первоначально состоявший из 6 сотрудников, в дальнейшем увеличился до 30. Лаборатория находилась на территории Харьковского областного онкологического диспансера (Померки), что способствовало ее участию в комплексном лечении онкологических больных. По тематике и составу сотрудников лаборатория была фактически зародышем нового института. Различными научными направлениями лаборатории руководили старшие научные сотрудники М.Г.Шенберг, А.А.Цуцаева, А.А.Наконечный. Здесь начали свою научную карьеру нынешние доктора биологических наук Л.Ф.Розанов и Е.А.Гордиенко. В организационном и научном плане с лабораторией активно взаимодействовал сотрудник онкологического диспансера доктор мед. наук Б.М.Даценко. Им совместно с Н.С.Пушкарем была произведена трансплантация консервированного аутологичного костного мозга нескольким десяткам больных. В то же время в Харьковском научно-исследовательском центре медрадиологии осуществлялась трансплантация гомологического костного мозга (от доноров и трупов) и кроветворных клеток крови (Л.И.Симонова и И.М.Вусик). Очень важную роль в решении научно-органи-

Матеріал, захищений авторським правом

зационных вопросов и во взаимодействии с физиками и инженерами играл ближайший помощник Н.С.Пушкаря канд. мед. наук Ю.А.Иткин. Все упомянутые ведущие сотрудники лаборатории и доктор мед. наук Б.М.Даценко активно участвовали в создании ИПКиК АН УССР. Решающей в организации института была помощь Б.И.Веркина. Используя свой авторитет, добрые отношения с руководителями и сотрудниками многих ведомств и директивных органов, привлекая своих заместителей (И.М.Дмитренко, В.Г.Манжелий, В.А.Ашукин) и административный аппарат ФТИНТа, Б.И.Веркин обеспечивал или существенно ускорял принятие многих решений об организации ИПКиК АН УССР. Вскоре после создания ИПКиК вхождение Проблемной научно-исследовательской лаборатории низкотемпературной консервации костного мозга и крови в состав института было узаконено Распоряжением Совета Министров СССР от 20 апреля 1972 года № 834р.

Авторы признательны Л.И.Симоновой, М.Г.Шенберг, В.М.Чередниченко, В.В.Глущенко и В.Ф.Козыреву, любезно предоставившим информацию о событиях, предшествовавших созданию ИПКиК.

УДК 57.043:577.352

А.М.Белоус

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОХИМИИ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР

Биохимические аспекты влияния низких температур на структурно-функциональные свойства мембран нашли отражение в ряде работ лаборатории энзимологии, которая была сформирована в отделе биохимии и в которой нашло широкое и всестороннее развитие научное направление по исследованию механизмов криоповреждения растворимых (изолированных) и мембраносвязанных ферментов. Необходимость решения указанной проблемы обусловлена тем, что изучение механизмов повреждающего действия замораживания на белки и, в частности ферменты, является существенной предпосылкой для установления природы неустойчивости в этих условиях более сложных биологических структур и понимания роли ферментных нарушений в процессе дестабилизации клеток после замораживания-оттаивания. Кроме того, выяснение характера изменения активности ферментов при замораживании клеток, тканей и органов может служить экспериментальной и теоретической основой для использования энзиматических показателей в качестве диагностических тестов структурно-функциональной полноценности криоконсервированного биологического материала перед его использованием в медицинских и других практических целях. Сотрудники лаборатории, начиная с 1972 года, под руководством профессора В.И.Лугового выполнили оригинальные исследования по выяснению роли факторов криоповреждения, которые возникают в цикле замораживания-оттаивания, в нарушении активности и молекулярной структуры изолированных ферментов с олигомерной (Е.Л.Воловельская) и мономерной структурой (Л.В.Карева), а также мембраносвязанных ферментов — лизосомальных гидролаз (Л.П.Кравченко), аденилатциклазы (В.А.Коптелов), митохондриальных дегидрогеназ (Л.И.Золочевская), Na^+, K^+–АТФазы плазматических мембран клеток (А.М.Грек, Н.Р.Гусева). В ряде работ изучалась криочувствительность ключевых ферментов гликолиза в составе различных клеток и тканевых препаратов, выяснилось влияние выявленных ферментных нарушений на интегральный уровень клеточного гликолиза (А.Н.Андриенко), а также роль криоповреждения митохондрий и лизосом в механизмах ингибирования белоксинтезирующей активности клетки в условиях замораживания-оттаивания (В.И.Загнойко). Кроме того, исследовалась эффективность некоторых мембранотропных веществ и регуляторов метаболизма для стабилизации плазматических и лизосомальных мембран клеток при замораживании-оттаивании с целью использования

Матеріал, захищений авторським правом

этих веществ в практике низкотемпературного консервирования клеточных суспензий (Л.П.Кравченко, Н.Р.Гусева).

Структурная гипотеза холодовой деструкции клеток, постулирующая решающую роль плазматической мембраны как первичной мишени действия кристаллов льда и осмотических факторов, изложенная в статье "Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран" (1976 г.), сыграла важную роль в инициировании и развитии дальнейших исследований в области криобиохимии мембранных структур клеток.

Первые эксперименты в этом направлении были проведены В.В.Лемешко (1972 г.) на митохондриях — органеллах с хорошо развитой мембранной системой и тонкой регуляцией метаболизма. Была показана высокая чувствительность системы окислительного фосфорилирования митохондрий к действию замораживания-отогрева, проведен сравнительный анализ скоростей охлаждения и эффективности криопротекторов. Установлены закономерности криоповреждений митохондриального аппарата клеток и разработаны рекомендации по их криозащите. В частности, обнаружено, что система генерации энергии и окислительного фосфорилирования отличается высокой чувствительностью к процессу замораживания-отогрева, которая обусловлена быстрым разрушением α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса, интенсификацией перекисного окисления липидов и нарушением протонной проводимости мембран митохондрий. Выяснилось, что изолированная из клеток микросомальная система окисления отличается высокой устойчивостью к действию быстрого замораживания и в меньшей степени к "эффекту раствора" после медленного замораживания и отогрева. На основе исследований эффективности криопротектора ряда полиолов установлено, что полиэтиленоксид с молекулярной массой 400 оказывает хорошо выраженное криозащитное действие при замораживании митохондрий и микросом. По совокупности проведенных исследований защищена кандидатская диссертация (В.В.Лемешко, 1974 г.), посвященная механизмам криоповреждения и криозащиты митохондриальной системы трансформации энергии при ее замораживании и отогреве.

Развивая исследования по криоустойчивости митохондрий и систем микросомального окисления, впервые на изолированных микросомах и в составе гепатоцитов Е.В.Кудокоцева (1982 г.) показала, что при замораживании клеток вначале повреждается функциональное состояние митохондрий, а затем система микросомального окисления. Выяснилось, что изолированные из клетки микросомы по сравнению с другими системами клеток весьма устойчивы к действию замораживания. На указанных выше модельных системах были выяснены детали криоповреждений цитохромов, локализованных на внутренней мембране митохондрий (докторская диссертация Н.П.Субботы), а также особенности функции митохондрий в условиях модификации систем ионного транспорта (А.Ю.Петренко). В процессе исследований показана возможность частичного восстановления функциональной активности митохондрий после действия низких температур, а также установлен механизм их "латентных" криоповреждений. В докторской диссертации А.Ю.Петренко "Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток" (1993 г.) было установлено, что основной причиной разобщения митохондрий под влиянием низкотемпературных факторов является возникновение протонной проводимости через АТФазный канал, которая обусловлена диссоциацией факторов F_1 и F_0 фермента и подавляется ингибиторами АТФазы и АДФ. В условиях высокой ионной проницаемости в мембранах замороженно-отогретых митохондрий развивается цепь Ca^{2+}-зависимых биохимических реакций, включающих окисление пиридиновых нуклеотидов, индукцию перекисного окисления и гидролиза липидов. Подавление возникших криоповреждений с помощью криопротекторов и мембранных стабилизаторов обеспечивает значи-

Матеріал, захищений авторським правом

тельное восстановление структурно-функциональной целостности мембран митохондрий, которое обусловлено их спонтанным замыканием вследствие реассоциации субъединиц АТФазы.

Изучение поглощения и биотрансформации ксенобиотиков бифенила (А.Н.Сукач) и *p*-нитроанизола (С.П.Мазур) показало, что этот процесс зависит от исходного состояния животного, условий выделения и инкубации клеток. Максимальный уровень детоксикационной функции выявлен на гепатоцитах сытых самцов крыс, получавших фенобарбитал. В случае, когда скорость — лимитирующим фактором биотрансформации ксенобиотиков является низкий уровень восстановления пиридиновых нуклеотидов, введение цитрата в среду перфузии печени увеличивает детоксикационную активность изолированных клеток. Выяснилось, что введение крысам фенобарбитала увеличивает общее содержание цитохрома Р-450 в клетках печени, а также возможность НАДН-генерирующих систем восстанавливать пиридиновые нуклеотиды и, как следствие этого, повышать скорость О-метелирования Р-нитроанизола. При повреждении плазматической мембраны гепатоцитов в условиях замораживания скорость деметилирования ксенобиотиков снижается, что связано с потерей клеткой нуклеотидов и других низкомолекулярных соединений, контролирующих процессы окисления.

В кандидатской диссертации А.Д.Рослякова "Исследования причин гибели свежевыделенных и криоконсервированных гепатоцитов сытых и голодных крыс в процессе инкубации" (1995 г.) было выявлено, что криоконсервированные клетки сытых животных характеризуются повышенным содержанием "тритоновой" фракции белков цитоскелета, в то время как гепатоциты голодных крыс содержат меньшее количество этого белка и с меньшей скоростью накапливают АТФ, обладая повышенной чувствительностью к инкубации в минимальной солевой воде. Деструкция таких деконсервированных клеток сопровождается накоплением ТБК-активных продуктов без окисления глютатиона и тиоловых групп белков. Введение в среду консервации антиоксиданта хотя и подавляет процессы липопероксидации, однако не предотвращает криодеструкцию клеток.

Условия выделения и инкубации изолированных гепатоцитов оказывают также существенное влияние на величины потенциалов митохондриальных и плазматических мембран, внутриклеточное распределение и кинетику транспорта K^+, а также дыхательную активность гепатоцитов (В.П.Грищук). Установлено, что сохранение функциональной активности митохондрий и концентрации K^+ является необходимым условием жизнеспособности клеток после криоконсервирования.

Проблемам ионного транспорта в условиях действия факторов замораживания были посвящены и другие научные исследования. Так, проблеме влияния замораживания-отогрева и криопротекторов на структурно-функциональное состояние Ca^{2+} транспортирующей системы мембран саркоплазматического ретикулума была посвящена кандидатская диссертация Г.Ф.Жегунова (1978 г.), в которой впервые был экспериментально обоснован механизм разобщения гидролиза АТФ ионпереносящим ферментом с процессом транспорта иона во внутрь везикул саркоплазматического ретикулума после низкотемпературного воздействия. Эти данные имели важное значение для понимания феномена кажущегося низкотемпературного "активирования" мембранного фермента-переносчика в деконсервированных системах.

В кандидатской диссертации Л.Н.Кузьминой установлено, что снижение криочувствительности системы транспорта Ca^{2+} мембран саркоплазматического ретикулума мышц кролика в процессе развития определяется изменением липидного и белкового состава мембран, увеличением жидкостности липидного матрикса, ростом удельного содержания Ca^{2+}–АТФазы.

Исследованиями, проведенными на изолированных эритроцитарных мембранах и мембранах целостных клеток в условиях их охлаждения и замо-

Матеріал, захищений авторським правом

раживания-отогрева под защитой различных криопротекторов, выявлено, что медленное замораживание эритроцитов вызывает конформационные изменения белков и потерю основных классов липидов в мембране (А.М.Грек), сопровождаемые нарушением активного и пассивного транспорта ионов K^+ и Na^+ в клетках (А.П.Осипенко). Дальнейшее развитие этих исследований показало, что низкотемпературная консервация эритроцитов под защитой 1,2-пропандиола и глицерина характеризуется снижением уровня АТФ, а также 2,3-ДФГ, K^+ и повышением содержания Na^+ в клетках (М.М.Лоевский), что объяснялось формированием в мембране клеток трансмембранных дефектов, обусловленное изменением вязкости и фазово-структурного состояния фослипидного бислоя мембран.

В докторской диссертации А.К.Гулевского (1986 г.) решены проблемы закономерностей нарушения системы транспорта катионов и метаболитов через плазматическую мембрану на различных этапах криоконсервирования. В частности, доказано, что нарушение барьерной функции плазматических мембран эритроцитов при замораживании-отогреве происходит в широком диапазоне субнулевых температур и характеризуется формированием в них микро- и макродефектов, размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембранах. Вторым важным выводом данной работы явилось обнаружение, что внеклеточные белки, криопротекторы проникающего типа и растворы солей, замерзающие в виде гидратов, особенно в сочетании с увеличением скорости замораживания, способствуют сохранению барьерных функций плазматических мембран деконсервированных клеток. Формирование микродефектов в мембране эритроцитов в результате постгипертонического гемолиза показано также в кандидатской диссертации Н.М.Перссецкой (1996 г.). В частности, установлено, что дегидратация-регидратация не приводит к повреждению Ca^{2+} зависимых калиевых каналов Гардоша в эритроцитах человека. Вместе с тем в регидратированных клетках в условиях стимуляции селективной K^+ проводимости с помощью валиномицина или Ca^{2+}-ионофора А 23187 активируется новый транспортный путь для моновалентных ионов, который частично или полностью компенсирует поток K^+, направленный в межклеточное пространство.

Важное значение для дальнейшего развития криобиохимических исследований, направленных на выяснение структурно-функциональных изменений мембран клеток в процессе замораживания-отогрева, имели публикация "Молекулярно-клеточная концепция криоповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов" (А.М.Белоус, В.А.Бондаренко, А.К.Гулевский, 1987 г.) в журнале "Криобиология" и монография "Барьерные свойства мембран при низких температурах" (А.К.Гулевский , В.А.Бондаренко, А.М.Белоус, 1988 г.).

Научные исследования, возглавляемые доктором биологических наук В.А.Бондаренко, были направлены на выяснение механизмов холодового шока клеток. Важное значение имели диссертационные работы Т.П.Бондаренко "Роль липидов в повреждении мембран митохондрий и эритроцитов при охлаждении" (1981 г.) и "Осмолярность и температура среды как факторы, регулирующие чувствительность эритроцитов к охлаждению и осмотическому стрессу" (1994 г.), а также А.Ю.Семенченко "Изучение структуры и проницаемости мембран эритроцитов человека и митохондрий печени крыс при охлаждении до субнулевых температур" (1985 г.), в которых были подведены итоги изучения механизмов температурного шока и криоповреждений митохондрий и эритроцитов. В процессе исследований по указанной выше тематике В.А.Бондаренко и Л.А.Бабийчук, а в дальнейшем В.В.Поздняков и А.В.Дегтярев выявили феномен холодовой "адаптации" клеток, который имел важное теоретическое и практическое значения для совершенствования методов их

Матеріал, захищений авторським правом

низкотемпературного консервирования. Не меньшее значение для развития дальнейших исследований по холодовому шоку имели такие фундаментальные публикации, как "Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе" (А.М.Белоус, В.А.Бондаренко, Л.А.Бабийчук и др.) и "Холодовой шок фосфолипидных везикул: влияние охлаждения на барьерные свойства мембран" (А.В.Дегтярев, В.А.Бондаренко, А.М.Белоус). Суммарные данные по температурному шоку были обобщены в докторской диссертации В.А.Бондаренко "Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов" (1988 г.), в которой постулировалось, что факторами, контролирующими чувствительность эритроцитов к холодовому шоку, являются исходный объем и разница осмотического давления между внутриклеточной и наружной средой, а повреждение эритроцитов связано с деформацией упругих элементов мембранного белкового цитоскелета в условиях осмотической дегидратации и нарушения метастабильности клетки. Важным экспериментальным фактором явилось также установление, что при частичной дегидратации происходит концентрация белков в примембранном слое, стабилизирующая мембрану в условиях осмотического и температурного шока и замораживания-отогрева.

В последнее время интенсифицировались фундаментальные исследования, направленные на выяснение роли белков цитоскелета мембран в холодовой устойчивости клеток (А.М.Белоус, А.К.Гулевский, Л.А.Бабийчук, В.В.Рязанцев, Н.Г.Землянских, 1990 г.). В.В.Рязанцев установил, что низкие температуры нарушают пространственное расположение мембранных белков и их частичную агрегацию, сопровождающееся снижением уровня фосфорилирования спектрин-актинового комплекса мембран эритроцитов. При замораживании белков этого комплекса нарушается их взаимодействие с липидным бислоем, что ведет к повышению проницаемости мембран клеток и протеополисом. Л.А.Бабийчук и Н.Г.Землянских (1989 г.) сделали вывод, что повышение устойчивости эритроцитов, экспонированных с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С, к действию низких температур зависит от двух фундаментальных процессов: направленности структурной модификации белков цитоскелета эритроцитов и характера связывания криопротекторов поверхностью мембраны клеток. Эти экспериментальные факты позволили разработать безотмывочный способ криоконсервации эритроцитов.

В настоящее время планируется дальнейшее развитие исследований в области криомембранологии, посвященных изучению регуляторных факторов, контролирующих структурно-функциональное состояние плазматических мембран и цитоскелетных белков клеток.

УДК 591.543.42+57.043:612.017

А.А.Цуцаева

ПРОБЛЕМЫ ГЛУБОКОГО ХОЛОДОВОГО АНАБИОЗА И КРИОИММУНОЛОГИИ

Основные научные направления школы (Ю.А.Иткин, Г.Г.Юрченко, И.П.Высеканцев, Ю.Е.Микулинский, Н.П.Лобасенко, Л.В.Останкова, Н.Н.Попов, А.Н.Гольцев, А.Д.Гордиенко, О.В.Кудокоцева, Т.Н.Дубрава, В.И.Гарбуз, Т.Ф.Петренко, Г.Г.Шурда), возглавляемой проф. А.А.Цуцаевой, посвящены решению фундаментальных и прикладных задач проблем глубокого холодового анабиоза, ангидробиоза и криоиммунологии.

Было установлено, что на этапах перевода биологических систем в состояние глубокого холодового анабиоза с помощью оптимальных способов (криоконсервирование) в них независимо от уровня организации развиваются нелетальные обратимые повреждения, степень выраженности которых зависит от исходных свойств биологических объектов. Так, под влиянием криоконсерви-

Матеріал, захищений авторським правом

рования выраженные изменения свойств развиваются только в бактериофаге T_4; бактериофаг ∅ ×174 занимает промежуточное положение, у бактериофага T_3 свойства не изменяются.После криоконсервирования нелетальные повреждения развиваются в вирусе ринотрахеита, а свойства вируса парагриппа и вируса гриппа не изменяются. Нелетальные повреждения вирусов проявляются в удлинении времени их внутриклеточного развития и запаздывании времени выхода зрелых вирусных частиц, обратимой ингибиции процессов биосинтез вирусных НК и белка. Под влиянием криоконсервирования обратимо ингибируется пролиферативная активность микроорганизмов, клеток культур ткани и гибридом, асцитной и солидной опухоли Эрлиха; у криоконсервированных микроорганизмов интенсифицируются ферментативная активность и процессы синтеза антибиотиков. После криоконсервирования наблюдается разрыв цепей стрептококков и стрептобацилл, в результате чего увеличивается количество единиц роста. У криоконсервированных клеток культур тканей достоверно снижается интенсивность синтеза интерферона, уровень которого восстанавливается в клетках третьего пассажа. По этой причине криоконсервированные клетки более предпочтительно использовать на этапах диагностики вирусных инфекций.

Ингибиция функциональной и пролиферативной активности сопровождалась обратимой ингибицией процессов синтеза белка и НК. Впервые было показано, что в криоконсервированных клетках *E. coli* на фоне выраженной ингибиции процессов синтеза основных белков индуцировался синтез стресс-белков, ведущим из которых был белок с молекулярной массой 24 КДа. Уровень синтеза этих белков был максимален на 30-й мин культивирования клеток, исходного уровня достигал спустя 60 мин, когда завершались процессы репарации и клетки начинали делиться. Наиболее криолабильной оказалась фаза транскрипции, фаза трансляции не изменялась. Стресс-белки, синтезируемые в криоконсервируемых клетках, были не родственны белкам теплового шока, гены, регулирующие их синтезы, были различны. Синтез стресс-белков в криоконсервированных клетках индуцировался только под воздействием гиперконцентрированных растворов солей как ведущего повреждающего фактора, реализуемого на этапах криоконсервирования, но не под влиянием снижения температуры. После лиофилизации (перевод биологических объектов в состояние ангидробиоза) стресс-белки в клетках *E. coli* синтезируются более активно и продолжительно, чем в криоконсервированных клетках. Это объясняется тем, что клетки в процессе лиофилизации более, чем в процессе криоконсервирования, подвергаются выраженному обезвоживанию и воздействию гиперконцентрированных растворов солей. Нелетальные повреждения в криоконсервированных клетках проявлялись обратимой ингибицией процессов биоэнергетики. Максимально ингибируются процессы дыхания, уровень гликолиза (преимущественно анаэробного) изменяется меньше, в этой связи на ранних этапах процессы репарации в криоконсервированных клетках энергетически обеспечиваются за счет процессов анаэробного гликолиза. Полученные результаты позволили дать научное определение понятиям "глубокий холодовой анабиоз" и "ангидробиоз". Так, глубокий холодовой анабиоз — это состояние жизнеспособной биологической системы в экстремальных условиях умеренно низких и сверхнизких температур. Ангидробиоз — это состояние экстремально обезвоженных жизнеспособных биологических систем, которое достигается с помощью сушки их из замороженного состояния (лиофилизация).

Результаты фундаментальных исследований позволили разработать научные организационные основы низкотемпературных банков биологических объектов, эффективные технологии долгосрочного хранения и методы лиофилизации промышленных штаммов микроорганизмов, клеток культур тканей, гибридом, мицелия высших грибов; создать в СССР дублирующий низкотем-

Матеріал, захищений авторським правом

пературный банк указанных биологических объектов; провести успешные апробации разработанных способов криоконсервирования в производственных условиях. Совместно с СКТБ с ОП института были разработаны современная эффективная конкурентноспособная криоаппаратура и аппаратура для лиофилизации, а также сервисное оборудование, с помощью которых реализуются все этапы процессов криоконсервирования, лиофилизации и долгосрочного хранения.

Криоиммунология — это новое направление криобиологии и один из разделов проблемы глубокого холодового анабиоза. Целью фундаментальных исследований является изучение механизмов индукции и характера нелетальных обратимых изменений иммунобиологических свойств биологических объектов (молекулы иммуноглобулинов, клетки, ткани) под влиянием криоконсервирования и при воздействии низких температур на здоровые и опухолевые ткани в составе организма. Было установлено, что различные популяции лимфоцитов обладают разной криоустойчивостью. Под влиянием криоконсервирования не изменяются свойства FC, C_3, рецепторов на мембранах лимфоцитов, отмечается их сепарация, обратимо ингибируется активность кооперативных клеточных взаимодействий на этапе индукции иммунных процессов, синтез антител лимфоцитами и клетками гибридом, ингибируются синтез НК, белка и процессы биоэнергетики в лимфоцитах. При криоконсервировании кроветворных клеток-предшественников всех классов клеток крови и лимфоцитов изменяется направленность акцепции ими регуляторных сигналов от клеток микроокружения и гормональных сигналов. Не исключено, что это происходит в результате селекции после криоконсервирования определенных популяций кроветворных клеток, рецепторы мембран которых акцептируют определенные регуляторные сигналы. После криоконсервирования обратимо ингибируются пролиферативная активность кроветворных клеток и скорость их дифференцировки, снижается активность и в более отдаленные сроки развивается реакция "трансплантат против хозяина". Защитный потенциал криоконсервированных кроветворных клеток не снижается, в этой связи их предпочтительнее использовать, чем нативные криоконсервированные клетки, при купировании иммуно- и гемодепрессии различного генеза. Впервые было проведено системное изучение динамики восстановления морфофункциональных свойств не только органов лимфомиелоидного комплекса, но и регуляторных систем микроокружения (моноцитарно-макрофагальной и клеток стромы), органов нейроэндокринной системы, обеспечивающих гормональную регуляцию процессов гемопоэза и иммуногенеза, после трансплантации нативных и криоконсервированных кроветворных клеток для лечения гемо- и иммунодепрессии лучевого генеза. Начаты работы по изучению механизмов акцепции и характера воздействия регуляторных монокинов и гормонов на нативные и криоконсервированные кроветворные клетки. Технологии криоконсервирования кроветворных клеток и лимфоцитов защищены авторскими свидетельствами и патентами и успешно использовались в Институте онкологии АМН СССР при лечении лейкозных больных и для купирования вторичных гемодепрессий у онкологических больных, лечения вторичных анемий у рожениц, септических осложнений у хирургических больных.

Впервые было установлено, что под влиянием криоконсервирования снижается иммуногенность кожных лоскутов в результате временного частичного изменения спектра трансплантационных антигенов, разрушения клеточных компонентов крови донора, в том числе лимфоцитов, дополнительно сенсибилизирующих организм реципиента при трансплантации нативной ткани. При трансплантации криоконсервированных аллогенных лоскутов они отторгаются на 7 дней позже нативных и заживление кожных дефектов происходит первичным натяжением. Полученные результаты обосновывают предпочтительность использования криоконсервированных кожных лоскутов по сравнению

Матеріал, захищений авторським правом

с нативными для закрытия кожных дефектов. Разработанный метод был успешно использован в клинике. Остается актуальным раздел криоиммунологии, посвященный изучению механизмов криодеструкции опухолей и роли этого процесса в комплексной терапии злокачественных новообразований.

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости углубленных исследований в различных областях фундаментальной и прикладной криоиммунологии.

УДК 57.043:576.31

Т.Н.Юрченко

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ОТДЕЛА КРИОМОРФОЛОГИИ

В начальный период создания отдела криоморфологии основное внимание было уделено разработке методов идентификации структурных повреждений (М.Г.Шенберг, Э.И.Обозная). Как ясно из полученных результатов, альтерация структур сопровождается не специфическими, но имеющими некоторые особенности изменениями. Поскольку повреждающий фактор не вызывает моментальной смерти или гибели биологических структур (например, высокие температуры), то и проявляется его влияние не сразу. Использованный методический подход, позволяющий цитохимически (топически) локализовать активность ферментов, обеспечил возможность сочетания структурного анализа с функциональным состоянием внутриклеточных органелл. Полученные данные позволили прийти к заключению, что системность подхода в изучении жизнеспособности биологических объектов является основополагающим фактором разработки методов криоконсервирования (М.Г.Шенберг).

В течение ряда лет разрабатывались методы низкотемпературного хранения клеток крови и костного мозга, изучалось состояние мислокариоцитов на этапах криоконсервирования, велся поиск новых эффективных криопротекторов. В итоге определены сроки забора костного мозга у скоропостижно умерших, разработаны методы замораживания клеток с учетом особенностей каждой клеточной популяции, изучен качественный и количественный состав клеток костного мозга до и после криоконсервирования (О.П.Маркова, В.И.Строна).

Методом трансмиссионной микроскопии были проведены исследования повреждений внутриклеточных структур в зависимости от этапов криоконсервирования. Существенный научный и практический интерес имеют результаты работ по изучению деструктивных и восстановительных процессов после действия низких температур на нормальную кожу и после ожоговой травмы (В.В.Волина). Деструктивные изменения после ожоговой травмы в результате лечения криовоздействием характеризуются менее выраженными проявлениями дистрофических процессов в эпидермисе, межклеточном веществе собственно кожи, особенно ее волокнистых структур.

Обобщение и анализ результатов научных исследований способствовали выделению криоморфологии в самостоятельный раздел науки (Е.Я.Панков, Т.Н.Юрченко). В настоящее время в криоморфологии можно выделить следующие направления:

изучение структурно-функциональных изменений в биологических системах различного уровня организации при действии охлаждения в широком диапазоне температур (от 37 до −196 °С). Необходимо исследовать объекты, находящиеся в различных биологических циклах, на разных уровнях дифференцировки, этапах онтогенеза. Непосредственное отношение к такой постановке задач имеет определение морфологических показателей при действии холода *in vitro*, т.е. при низкотемпературном консервировании, а также в условиях *in vivo* при использовании его в качестве лечебного или модифицирующего фактора;

Матеріал, захищений авторським правом

определение достаточного и необходимого набора тестов, характеризующих жизнеспособность объекта, степень его повреждения и обратимости развивающихся повреждений;

выяснение дальнейшего функционального и структурного состояния клеток и тканей после отогрева и имплантации/трансплантации. Правильная методическая постановка эксперимента с исключением влияния иммунологических факторов трансплантации может дать информацию о репаративных свойствах криоконсервированного материала, позволит определить морфогенез восстановительного процесса;

изучение влияния имплантанта/трансплантанта на структурно-функциональное состояние других органов и систем, гомеостатическое состояние организма в ответ на вмешательство.

Естественно, что такое деление в определенной степени условно, поскольку приходится сталкиваться с проблемами, имеющими сопричастность к нескольким из перечисленных выше направлений.

Ряд исследований был посвящен изучению не только изолированных клеток, но и клеток, формирующих ткань со сложными межтканевыми взаимоотношениями. В качестве модельного объекта была использована ткань роговицы, что позволило провести корреляцию между изменяющимися структурно-функциональными показателями и жизнеспособностью ткани в прямом тесте — в трансплантации. Обнаружено, что чувствительность клеток роговицы к воздействию криопротекторов и низких температур может быть сопоставима с изменениями в клетках крови и костного мозга, о чем свидетельствуют показатели активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов (Т.М.Шарлай, Т.Н.Юрченко). Показано, что такие структурные перестройки носят обратимый характер и обеспечивают сохранение и функционирование трансплантата в организме реципиента достаточно длительный временной интервал (З.Ф.Веселовская, Т.Н.Юрченко). При этом обнаружены различия в топографии распределения иммуноглобулинов в ткани, что наблюдается и после криоконсервирования. В результате действия фактора холодовой консервации происходит снижение иммунногенности, что имеет не только теоретическое, но и практическое значение (О.В.Репко).

За цикл исследований по определению оптимальных условий криоконсервирования ткани и применению ее при поражениях органа зрения было присвоено звание Лауреата Государственной премии СССР в области науки и техники Т.Н.Юрченко и Т.М.Шарлай.

На основании собственных данных, анализа соответствующей литературы о влиянии экзогенных факторов на биологические объекты была предложена схема, в которой последовательно представлены явления и процессы, развивающиеся при действии охлаждения на клетку, и их морфологический эквивалент (Т.Н.Юрченко). Особое внимание было обращено на структурно-функциональные перестройки в клетках и тканях при их охлаждении до умеренно низких температур.

Так, выявлено, что хранение печени при температуре 4 °С вызывает динамичное изменение активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов (Е.П.Жуликова, А.П.Белоножко) при незначительной перестройке ультраструктуры клеток в виде нерезкого отека митохондрий и расширения перикарионного пространства на ранних этапах хранения (Т.П.Говоруха). Аналогичные изменения структурного комплекса были выявлены и на клетках роговицы (Т.Н.Юрченко), что позволило выдвинуть гипотезу о развитии компенсаторно-приспособительных реакций в охлаждаемых и сохраняемых объектах. Происходящие при этом морфологические перестройки повышают адаптированность объекта к изменившимся условиям окружающей среды за счет внутриклеточного гомеостаза.

Матеріал, захищений авторським правом

Одним из важных подходов к раскрытию механизмов криоповреждения является выяснение морфологии изменений в биологической системе различного уровня организации, вида и степени дифференцировки. Так, обнаружено, что процесс формирования внутриклеточных структур гепатоцитов сопровождается повышением их резистентности к гипотермическому хранению и замораживанию-отогреву. Наиболее криолабильными структурами являются митохондрии и эндоплазматический ретикулум (Т.П.Говоруха, А.П.Белоножко).

В последние годы большое внимание уделяется изучению реакции организма на экзогенные, в том числе и холодовые воздействия, которые вызывают однотипные изменения структуры миокарда при медленном и быстром охлаждении животных с выключенной и сохраненной терморегуляцией. При глубокой гипотермии происходит нарастание вне- и внутриклеточного отека. Быстрое охлаждение до 20 °С по сравнению с медленным оказывает более выраженный кардиопатогенный эффект, проявляющийся в возрастании количества кардиомиоцитов с необратимыми контрактурными изменениями (С.И.Ткаченко, Б.А.Скорняков).

Важное значение имеет выявленный эффект положительного действия холодовой тренировки на структуру кардиомиоцитов, что подтверждается данными электрокардиограмм и позволяет сделать заключение о развитии адаптационного синдрома.

Завершен цикл исследований, посвященный взаимодействию криозащитных веществ с биологическими объектами. Так, выявлено, что криопротекторы в своем комплексном физико-химическом действии на биообъекты пластифицируют мембранные структуры и стабилизируют их проницаемость для воды, что способствует повышению криоустойчивости. По данным растровой и трансмиссионной микроскопии альтерация клеток после охлаждения-отогрева проявляется прежде всего в отеке компартментов. Этим обусловливается дискоординация в клетках различных фермент-ингибиторных систем и сопряженного с ними аутолиза. Спектрофотометрическими исследованиями показано, что криопротекторы стабилизируют молекулярную структуру некоторых протеолитических ферментов при охлаждении и блокируют рост их активности (Б.А.Скорняков).

Реактивные изменения в организме в ответ на введение криопротекторов до настоящего времени были изучены недостаточно. В ходе экспериментальных исследований установлено, что в зависимости от дозы и концентрации криопротектора в организме развиваются неспецифические процессы адаптации — от тренировки и активации до стресс-реакции. Впервые раскрыт морфогенез патологического процесса при экстремальном воздействии веществ, выявлены органы-мишени. Полученные результаты позволили сформулировать научную концепцию взаимодействия изучаемых веществ с клетками и тканями организма (В.Ф.Козлова), внести определенный вклад в развитие представлений о неспецифических механизмах защиты в химической патологии.

Не меньший научный интерес представляют вопросы специфичности действия изучаемых веществ и механизмов защиты в системах организма. Установлено, что под влиянием криопротекторов происходят дегидратация тканей и их сложная метаболическая перестройка в виде переключения энергетического обмена с углеводного на липидный, а также усиление ДНК-синтезирующей способности клеток и формирование в органах структурного следа адаптации, обеспечивающих перевод систем на новый уровень гомеостаза с повышенной устойчивостью организма теплокровных животных к охлаждению.

Полученные с помощью радиоавтографии оригинальные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии веществ, обладающих криопротектор-

Матеріал, захищений авторським правом

ными свойствами, более экономичных внутриклеточных процессах репарации структур, что может найти воплощение в разработке способов направленной стимуляции регенерации тканей. Репаративная регенерация изучена и после воздействия разнообразных факторов криоконсервирования.

Можно сделать заключение, что репаративный процесс в криоконсервированных объектах имеет несколько четко очерченных этапов, которые характеризуются определенными структурно-функциональными изменениями (Ю.А.Демин, Т.Н.Юрченко).

Были проведены исследования по изучению структурно-функционального состояния хроматина при гипотермическом хранении клеток и в период их реабилитации. Обнаружено, что структурные переходы хроматина реализуются в температурном интервале 4±10 °С. Однако резкая конденсация хроматина не сопровождается полным ингибированием биосинтетических процессов при температуре 4 °С. С удлинением срока гипотермического хранения в клетках усиливается синтез РНК и ядерных белков, ассоциированных с хроматином и ядерным матриксом. При возвращении клеток в условия нормотермии деконденсация хроматина не приводит к нормализации процессов биосинтеза, однако в этой ситуации скорость синтеза ядерных белков опережает скорость синтеза суммарных клеточных белков.

Обнаружено снижение количества ДНК в ядрах интерфазных клеток в процессе охлаждения и реабилитации, что может быть следствием релаксации ДНК при существенных информационных изменениях хроматина, а также элиминацией ДНК из ядер. Снижение количества жизнеспособных клеток в популяции после охлаждения приводит к значительному снижению числа клеток, вступающих в пролиферацию, и к увеличению числа нормальных митозов.

Сравнительное исследование действия гипер- и гипотермии на клетки свидетельствует о наличии некоторых общих закономерностей течения репаративных процессов в восстановительном периоде (индукция синтеза ядерных белков, изменение структуры ДНК). В то же время цикличность процессов синтеза и распада нуклеиновых кислот и белков у охлажденных и прогретых клеток различна (В.И.Строна).

Электронно-микроскопически исследованы состояния ультраструктуры клеток суспензий (спермии, эритроциты, лейкоциты, лимфоциты, миелокариоциты) и плотных тканей (гипофиза, надпочечников, щитовидной железы) при замораживании-отогреве, действии ультразвука, термального и осмотического шока. Установлена корреляционная взаимосвязь эффектов криоповреждения и криопротекции клеточных структур с протекающими в них гидрокинетическими процессами. Показано, что криоповреждения охлаждаемых клеток целесообразно оценивать по глубине нарушения ультраструктуры, а не по характеру ее изменения, так как последний не проявляет криогенной специфичности (Б.А.Скорняков).

Наряду с комплексностью углубляется и уровень проводимых научных разработок. Особые возможности открываются при изучении мембранных образований клетки с применением низкотемпературных методов, базирующихся на криофиксации. С их помощью были получены данные о состоянии ультраструктуры клеток в зависимости от условий гипотермического и низкотемпературного хранения. Основными формами повреждений являются набухание клеток и органелл, изменение их геометрических характеристик, разрыхление внутриклеточного матрикса и др. (Н.В.Репин, Т.П.Говоруха).

Поскольку одним из инициирующих факторов повреждения является кристаллообразование, были проведены специальные исследования по выявлению корреляции со структурными изменениями. Обнаружено, что при быстром замораживании в присутствии криопротектора наблюдается сильная неоднородная деформация клеток кристаллами внеклеточного льда. Впервые

Матеріал, захищений авторським правом

изучена морфология эритроцитов и ядросодержащих клеток при различных режимах охлаждения и обнаружено, что при двухступенчатом замораживании на этапе температурной остановки происходят процессы рекристаллизации вне- и внутриклеточного льда, приводящие к расплавлению внутриклеточных кристаллов и обезвоживанию клеток, а время завершения этого процесса определяется коэффициентом проницаемости мембран исследованных клеток для воды (Н.В.Репин).

Исследования, направленные на изучение состояния мембраны клеток показали, что их температурно-зависимые изменения определяются нарушением белок-липидных взаимодействий, проявляющихся в перестройке самой мембраны, плотности в распределении трансмембранных белков (ВМЧ), компактизации и конденсации внутриклеточного содержимого. Такие структурные перестройки наиболее выражены в эритроцитах гетеротермных организмов при различном физиологическом состоянии (Н.В.Репин).

В течение многих лет для обеспечения количественного учета гисто- и цитохимических реакций и повышения уровня достоверности данных выполняются исследования, направленные на разработку, совершенствование и математическое обеспечение автоматизированной системы обработки медико-биологической информации (А.П.Белоножко). Разработан комплекс алгоритмов и программ по реализации математических методов с использованием ЭВМ.

УДК 57.043:541.8

В.И.Луговой, Л.А.Ханина

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ ПОИСКА И СОЗДАНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Исследования по проблеме криопротекторов в качестве одного из основных направлений работы института были начаты в лаборатории криопротекторов (М.И.Шраго), преобразованной затем в отдел криопротекторов (В.И.Луговой). Уже к этому времени исследованиями, выполненными в лабораториях различных стран, был накоплен обширный объем информации, касающийся изучения криозащитных свойств большого числа веществ из различных классов химических соединений. Анализ и обобщение этого материала показали, что из более чем 200 испытанных веществ эффективными криозащитными свойствами обладали только 10–12 соединений. При этом оказалось, что активные криопротекторы сосредоточены в основном лишь в нескольких классах органических веществ — полиолах, амидах, оксидах. Общую группу в пределах указанных классов веществ составляли полимерные и олигомерные соединения, непроникающие в клетки (поливинилпирролидоны, полиэтиленгликоли, полиглюкин и др.). Признание факта существования проникающих (эндоцеллюлярных) и непроникающих в клетку (экзоцеллюлярных) криопротекторов позволило в общих чертах классифицировать криозащитные вещества с точки зрения механизма их взаимодействия с клеткой, а установление принадлежности этих веществ к конкретному кругу химических соединений дало возможность также определить направление поиска новых криопротекторов. В связи с этим для поиска, создания и прогнозирования новых криозащитных веществ в лаборатории, а затем в отделе криопротекторов был предложен и использован экспериментальный подход, который заключался в систематическом исследовании зависимости криозащитной активности, цитотоксичности и общей токсичности соединений в гомологических рядах полиолов, амидов и их производных от их химической структуры и физико-химических свойств. Впервые были изучены криозащитные свойства 15 соединений на сперме карпа и эритроцитах человека, причем исследуемые вещества были выбраны таким образом, чтобы количество гидроксильных

Матеріал, захищений авторським правом

групп одного типа оставалось постоянным, но при этом происходило монотонное увеличение числа и длины алкильных радикалов в их молекулах (Ю.И.Пичугин).

Оказалось, что при консервировании как эритроцитов человека, так и спермы карпа цитотоксичность диолов зависит от их гидрофобных взаимодействий, а криопротекторная активность — от гидрофильных. С усилением гидрофобных взаимодействий, начиная с определенного диапазона значений коэффициентов распределения (K_p) диолов, увеличивается их цитотоксическое действие на эритроциты человека (K_p=0,3–0,5) и сперму карпа (K_p=0,14–0,18). К цитотоксическому действию диолов спермии карпа более чувствительны, чем эритроциты человека. Сильные гидрофильные взаимодействия диолов, характеризующиеся низкой эвтектической температурой их водных растворов (ниже −10 °С), достаточны для проявления ими криопротекторной активности на одинаковом уровне при криоконсервировании как эритроцитов человека, так и спермы карпа. Наиболее перспективные соединения для использования их в качестве криопротекторов находятся в начале ряда диолов: для эритроцитов человека — моно-, ди- (метил- или метилен-) производные этиленгликоля, а для спермы карпа — монометилпроизводные.

Для прогнозирования криопротекторной активности химических соединений впервые были предложены способы их первичного скрининга, основанные на исследовании и математическом моделировании зависимости "криопротекторная активность — структура вещества" с применением регрессивного и корреляционного методов анализа (Т.П.Линник). В расчетах уравнений регрессии использовались результаты исследований криопротекторной активности веществ двух гомологических рядов — алифатических амидов и диолов (10–16 соединений) — при криоконсервировании спермы птиц, карпа и эритроцитов человека. Для описания структуры веществ изучены и теоретически рассчитаны ряд "топографических" физических и физико-химических показателей: размер молекул, число водородных связей, молекулярная рефракция, число гидратации и другие показатели, численное выражение которых использовали для получения математической модели. Рассчитаны многофакторные и однофакторные нелинейные уравнения регрессии, описывающие зависимость криопротекторной активности амидов и диолов от их физико-химических свойств. Последние позволили найти диапазон значений свойств, которыми должен обладать "идеальный" криопротектор при криоконсервировании спермы птиц и эритроцитов человека. На основе уравнений указанной зависимости и проведенных исследований предложены перспективные криопротекторы в ряду амидов для спермы птиц (метилформамид, метилацетамид, N-метил-β,β'-оксиэтилацетамид), а также их смеси. Работоспособность полученных моделей и результаты прогноза проверены в условиях биологического эксперимента, подтверждена перспективность предложенного приема для первичного скрининга эффективных криопротекторов.

Как уже отмечалось, известные к настоящему времени криопротекторы — мономеры (индивидуальные химические соединения) — оказывают определенный ограждающий эффект при замораживании многих биологических объектов и обладают токсичностью на клеточном и организменном уровнях. Кроме того, эти вещества, являясь эндоцеллюлярными криопротекторами, отличаются высокой осмотической активностью при переводе клеток в изоосмотическую среду, в связи с чем возникает необходимость удаления их из биологического материала после его деконсервации.

Полимерные, непроникающие в клетку вещества лишены последнего недостатка криопротекторов-мономеров, однако при поиске новых экзоцеллюлярных криопротекторов в такой же мере остается главное требование к ним — оптимальное сочетание в их свойствах высокой криозащитной активности и низкой токсичности. Поэтому и в данном случае целесообразно исследовать

Матеріал, захищений авторським правом

зависимость между криозащитными свойствами, токсичностью новых экзоцеллюлярных веществ, их химической структурой и физико-химическими свойствами. Как и для индивидуальных веществ-криопротекторов одним из экспериментальных подходов создания новых криопротекторов среди полимерных соединений может быть их химическая модификация. В качестве основного метода направленного синтеза полимерных веществ с предполагаемой криозащитной активностью применено оксиалкилирование соединений в рядах полиолов и амидов, которое, как известно, влияет на гидрофильно-гидрофобный баланс молекулы и ее основность (Л.А.Ханина). Исходными мономерами для оксиэтилирования служили известные криопротекторы этиленгликоль и глицерин, представляющие класс полиолов. Молекулы криопротекторов-полиолов (амино-, имино-, нитро-, галоид-, алкилпроизводные), модифицированные различной природы заместителями, при выборе надлежащих условий оксиалкилирования дают возможность получать замещенные аналоги рядов полиэтиленоксида и оксиэтилированного глицерина.

В ряду полиэтиленоксидов, как и среди других защитных веществ, отсутствует универсальный криопротектор, хотя, как показали многочисленные исследования, выполненные в отделе криопротекторов и других отделах института, олигомер со степенью полимеризации 9 и средней молекулярной массой 400 (ПЭО-400) оказался малотоксичным (М.М.Гучок) и достаточно эффективным, не требующим удаления, криопротектором для костного мозга (Н.С.Пушкарь), роговицы (Т.Н.Юрченко), кожи (Б.П.Сандомирский), лейкоцитов (Г.С.Лобынцева). Исследование фракционного состава образцов ПЭО-400 методом газо-жидкостной хроматографии показало, что содержание полимергомологов в образце может колебаться в довольно широких пределах. И хотя криопротекторным действием в той или иной мере обладают все входящие в состав компонента ПЭО-400, которые по характеру взаимодействия с клетками (за исключением низкомолекулярных компонентов) могут быть отнесены к экзоцеллюлярным криопротекторам, максимальная криопротекторная активность определяется характерным молекулярно-массовым распределением компонентов в образце (Л.А.Ханина, В.К.Мазалов).

Вместе с тем для эритроцитов ПЭО-400 оказался неподходящим криопротектором, поскольку вызывал значительный гемолиз при переводе клеток в изоосмотическую среду. Наиболее выраженные защитные свойства в отношении эритроцитов были выявлены у другого полимергомолога — полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500). Оптимальная криозащитная концентрация этого криопротектора в одном растворе в зависимости от объема замораживаемой взвеси колеблется от 20 до 40 %. Однако повышение концентрации ПЭО-1500 в криозащитном растворе усиливает агрегационные свойства эритроцитов, снижает осмотическую устойчивость обезвоженных клеток.

Одним из путей предупреждения образования агрегатов эритроцитов при низкотемпературном консервировании в среде ПЭО-1500 является включение в состав криоконсерванта дезагрегантов и мембраностабилизирующих веществ — ЭДТА-натрия, маннита, хлорида натрия, гепарина, натрия цитрата, холин-хлорида (Л.П.Бредихина).

При изучении влияния степени гидрофобности на криопротекторную активность замещенных полиэтиленоксидов были получены их алкиловые эфиры с радикалами различной длины, а также производные полиэтиленоксида, содержащие в цепи гидрофобные метильные группы, которые изменяют конфигурации оксиалкильной цепи.

Алкиловые эфиры ПЭО-400 получены оксиэтилированием соответствующих эфиров гликолей: метилового, этилового, бутилового, фенилового. Замещение конечной гидроксильной группы ОН в молекуле ПЭО-400 метильной группой не снижает эффект криозащиты в отношении клеточных культур,

Матеріал, захищений авторським правом

этильная группа приводит к небольшому его снижению (Ю.В.Калугин). Присоединение более тяжелых радикалов того же гомологического ряда (бутил-, фенил- и другие) полностью лишает производные ПЭО-400 криозащитных свойств. Замена конечной гидроксильной группы метильным радикалом в молекуле ПЭО-1500 при оксиэтилировании метилового эфира этиленгликоля позволяет получить более высокие показатели сохранности эритроцитов при снижении концентрации криопротектора (Л.П.Бредихина, О.В.Липина, Л.А.Ханина).

Введение гидрофобного радикала (метильной группы) в полиоксиэтиленовую цепь проведено путем синтеза блок-сополимеров окиси этилена и пропилена. Блок-сополимеры молекулярной массы 1500 в 20%-й концентрации не оказывали повреждающего действия на эритроциты до замораживания, не вызывали гемолиза и не снижали осмотической хрупкости эритроцитов. Однако в условиях замораживания-оттаивания криозащитная активность этих соединений оказалась низкой, гемолиз намного превышал допустимый уровень, а после переноса в изоосмотическую среду клетки почти полностью разрушались.

Модификация молекулы глицерина проведена аналогичным, как и при исследовании диолов, методом: заменой гидроксильных групп алкильными радикалами для изучения влияния повышения гидрофобных свойств производных данного полиола на криопротекторную активность и оксиалкилирование их (Л.А.Ханина). Алкиловые эфиры, замещенные в различных положениях молекулы глицерина, а также дизамещенные производные 1,2- либо 1,3- обладают различными физическими и криопротекторными свойствами в зависимости от положения заместителя и длины алкильного радикала (С.В.Кощий). Испытания на тромбоцитах алкиловых эфиров глицерина (А.М.Компаниец, А.В.Николенко) показали, что растворы этил- и диэтилзамещенных необратимо угнетают ретрактильную и агрегационную активность клеток, способность к реакции на гипертонический шок. В то же время выявлен высокий криозащитный эффект у 1-монометилового эфира глицерина (1-ММЭГ). При использовании растворов 1-ММЭГ в концентрации 5–10 % в тромбоконцентратах после замораживания-оттаивания не наблюдается образования агрегатов кровяных пластинок, формирующихся вследствие так называемой "спонтанной агрегации тромбоцитов", что является характерным недостатком криопротектора глицерина. Данное соединение является также эффективным криопротектором для клеток перевиваемой культуры ПТ, обеспечивая их сохранность 5%-ми растворами (Л.З.Верховская).

Состав продуктов оксиэтилирования глицерина менее однороден по химической структуре по сравнению с олигомерами полиэтиленоксида. Так, глицерин, в отличие от этиленгликоля, наряду с первичными гидроксильными группами содержит и вторичный радикал, и структура конечных продуктов синтеза определяется природой применяемого катализатора.

При исследовании этоксилатов глицерина оказалось, что криопротекторными свойствами обладают только продукты присоединения оксида этилена по первичным гидроксильным группам, которые были получены с применением щелочного катализатора. Наличие же в смеси изомеров продукта присоединения окиси этилена по вторичному радикалу, полученного при использовании кислотного катализатора, делает его более токсичным (М.М.Гучок, Ю.В.Калугин), что проявлялось в значительном повреждающем влиянии их на клетки костного мозга крыс и эритроциты человека в период непродолжительной эквилибрации с клеточными суспензиями. Вследствие неоднородности продуктов оксиэтилирования, в частности возможного образования изомеров, расшифровка их состава представляет большие трудности. Для исследования молекулярно-массового распределения этоксилатов глицерина были синтезированы индивидуальные олигоэфиры глицерина: 1-моноэтоксиглице-

Матеріал, захищений авторським правом

рин (1-МЭЭГ); 1,3-диэтоксиглицерин (1,3-ДЭГ); 1,1-диэтоксиглицерин (1,1-ДЭГ) (Л.А.Ханина, С.В.Кощий). Для синтеза данных соединений применялась реакция взаимодействия натриевых солей соответствующих гликолей с моно- и дигалоидпроизводными глицерина (реакция Вильямсона). Строение полученных веществ подтверждено молекулярной рефракцией, ИК-спектроскопией, а чистота — методом жидкостной хроматографии на сирогелевых колонках в тетрагидрофуране, в качестве стандартов при расшифровке этоксалатов глицерина использованы индивидуальные вещества. При исследовании состава этоксилатов глицерина, полученных в различных условиях оксиэтилирования исходных веществ, показано, что в присутствии как основного, так и кислого катализаторов оксиэтилирование глицерина возможно провести лишь при степени $n>1$, так как основная часть продукта оксиэтилирования при попытке получить моноэтоксиглицерин представлена не вступившим в реакцию глицерином. Процесс оксиэтилирования олигоэфиров с большей длиной цепи идет значительно легче. Олигомер с тремя оксиэтильными звеньями является почти индивидуальным соединением, олигоэфиры с 4 и 5 звеньями при варьировании температуры и количества катализатора содержат довольно широкий набор олигомергомологов со степенями полимеризации от 2 до 11. Величина $M_в/M_ч$ находится в пределах 1,03–1,07. При оксиэтилировании глицерина на щелочном катализаторе удалось получить ряд оригинальных криопротекторов (ОЭГ), токсичность которых снижается по мере увеличения степени полимеризации, а биологическое действие оказалось подобным действию олигомеров ПЭО и зависит от молекулярной массы олигомера (М.М.Гучок). Так, полимергомолог ОЭГ со степенью полимеризации $n=3$ оказался эффективным криопротектором при низкотемпературном консервировании клеток почки овцы ПО-2, а ОЭГ со степенью полимеризации $n=5$ проявил хороший ограждающий эффект при криоконсервировании миелокариоцитов и лейкоцитов.

Изучение криозащитной активности растворов ОЭГ со степенью полимеризации от 1 до 50 (молекулярные массы 130–2300) показало, что ОЭГ $n=20$–30 (молекулярные массы 1000–1400) в концентрациях 20–40 % обладают криозащитным действием в отношении эритроцитов человека. Однако 40%-е водные растворы ОЭГ $n=30$ и растворы ОЭГ $n=40$ подобно растворам ПЭО-1500 вызывают дегидратацию и агломерацию эритроцитов, что диктует необходимость коррекции криоконсервирующего раствора введением в него соответствующих компонентов.

Увеличить основность (протоно-акцепторную активность) веществ в ряду полиэтиленоксидов можно также при введении в молекулу группировок, содержащих атомы азота, серы, кислорода. При введении в молекулы полиэтиленоксида либо глицерина аминогруппы были получены соединения, растворы которых имеют высокие значения pH и токсичны на организменном и клеточном уровнях (В.М.Гучок, В.К.Мазалов). Снижение этих показателей наблюдается при значительном росте степени оксиэтилирования ($n>10$), но идентификация таких соединений затруднена.

Теоретический и практический интерес представляют азотсодержащие производные полиэтиленоксида, имеющие в своем составе также и второй возможный центр основности — карбонильную группу — оксиэтилированные амиды низкомолекулярных кислот. Оксиэтилированные алифатические амиды, как и сами амиды, являются эффективными криопротекторами при замораживании различных биологических объектов. Показано, что оксиэтилирование амидов сопровождается снижением токсичности на организменном уровне (В.М.Гучок, Ю.В.Калугин).

Взаимодействие амидов с оксидами этилена осложнено протеканием ряда побочных реакций, в результате которых возможно образование гаммы примесных соединений. Поэтому для проведения оксиэтилирования каждого ами-

Матеріал, захищений авторським правом

да необходимо экспериментально подбирать оптимальные условия реакции (соотношения реагентов, температуру, растворитель, давление, скорость подачи оксида этилена, катализатор), а также способы разделения и идентификации этоксилатов соответствующих амидов. Было проведено оксилирование амидов постепенно усложняющей структуры: формамид, ацетамид, метилацетамид, перфторацетамид, ацетилацетамид, ацетилдиэтаноламид (В.В.Чеканова). При исследовании аддуктов оксида этилена с перечисленными амидами оказалось, что наиболее эффективными из них как криопротекторы для миелокариоцитов и клеток культуры ткани являются олигомеры оксида этилена с ацетамидом со степенью оксиэтилирования 3–4 (В.К.Мазалов, В.В.Чеканова, Ю.В.Калугин).

При сопоставлении структуры исследованных оксиэтилированных амидов с их криопротекторной активностью правомерно было бы предположить определенную зависимость криопротекторных свойств от основности карбонильной группы. Наиболее выраженными криопротекторными свойствами обладают соединения с N-ацетильной группой. Введение в N-ацетильную группу алкилрадикалов, увеличивающих основность — оксиэтилированные (ОЭ) производные (N-метилацетамид, N-пропил-, N-бутилацетамиды), так же как и радикалов, понижающих основность (ОЭ-перфторацетамид, ОЭ-N-ацетамид), приводит к уменьшению их криопротекторной активности. Так, ОЭ-N-пропил- и ОЭ-N-бутиламид разрушают клетки костного мозга, эритроцитов еще на стадии эквилибрации, а ОЭ-производные N-ацетилацетамида и N-метилацетамида, являясь нетоксичными, защищают не более 45±5 % клеток при их консервировании под защитой этих соединений.

Следовательно, основность карбонильной группы не является единственным фактором, определяющим эффективность криопротектора из ряда оксиэтилированных амидов: замена метила более громоздкими неразветвленными активными радикалами приводит к исчезновению криопротекторных свойств амидов. Более существенное значение имеют наличие и длина оксиэтиленовой цепи. Так, ацетамид с 3–4 оксиэтильными звеньями проявляет криопротекторные свойства на клетках культуры тканей, клетках костного мозга, тромбоцитах, макрофагах, а удлинение цепи улучшает криопротекторные свойства ОЭ-ацетамида при криоконсервировании эритроцитов человека (Л.З.Верховская, А.В.Николенко, В.К.Мазалов), а также эритроцитов плацентарной крови (О.С.Прокопюк). Таким образом, определяющим фактором реализации криопротекторных свойств в ряду ОЭ-амидов является наличие оксиэтиленовой цепи и карбонильной группы, у которых, однако, не должно быть громоздких заместителей.

Значительное место в тематике отдела криопротекторов занимает направление, связанное с исследованиями особенностей фазовых превращений и способов их управления в сложных криобиологических системах, влияния на эти процессы криопротекторов, мембранотропных, биологически активных соединений, которые в целом представляют собой многокомпонентные криозащитные среды (криоконсерванты), позволяющие оптимизировать технологию низкотемпературного консервирования различных клеточных суспензий и тканей (А.Н.Новиков). В результате выполненных исследований в пределах этой тематики получены новые данные относительно механизма и метода управления рекристаллизационными процессами типа “кристалл–кристалл”, “стеклофаза–кристалл” (“витрификация–девитрификация”) в средах с различными криопротекторами, добавками углеводов, белков, поверхностно-активных веществ и других компонентов. В ряду полиолов выявлены особенности диаграмм фазовых и физических состояний их бинарных растворов, показана линейная зависимость скачка теплоемкости этих веществ при расстекловании от их молекулярной массы (С.Ю.Бидный). Отмечена важная роль в процессах кристаллообразования явлений начального переохлаждения био-

Матеріал, захищений авторським правом

ческих систем, отражающихся на эффективности криоконсервирования конкретных биообъектов. В связи с этим предложены способы инициации кристаллообразования и предупреждения переохлаждения многокомпонентных растворов микрочастицами льда, кристаллами химических веществ, теплоотводящим стержнем в контейнере (С.Т.Олейник). Разработанные способы и приемы управления началом фазового перехода вода–лед использованы при низкотемпературном консервировании спермы птиц, рыб, эмбрионов млекопитающих (А.Н.Новиков, Т.П.Линник, С.Т.Олейник, Ю.И.Пичугин), тромбоцитов человека (А.М.Компаниец, А.В.Николенко). Исходя из имеющихся экспериментальных данных,обоснован оптимальный состав многокомпонентных криозащитных сред для спермы петуха, эмбрионов кур, включающих комбинацию криопротекторов из класса гликолей и амидов, добавки солей, аминокислот, белков (А.Н.Новиков, Т.П.Линник), что дало возможность использовать эти разработки в специализированных производственных хозяйствах.

Разработана и успешно проведена апробация технологического регламента получения фармакопейного препарата ПЭО-400 "Криополиэтиленоксида" (Л.А.Ханина, Т.П.Линник). Проводились исследования, направленные на более глубокое изучение влияния криопротекторов на физиологические параметры организма животных и объекты растительного происхождения. Так, установлена способность олигомеров ряда полиэтиленоксидов различной молекулярной массы снижать динамическую вязкость плазмы и крови при нормотермии (П.А.Пустовойт) и гипотермии теплокровных (О.В.Липина), что в целом положительно отражается на системном и регионарном кровообращении организма. Показано нормализующее действие ПЭО-400 и ПЭО-1500 на водно-солевой баланс при отеке-набухании головного мозга, вызванном черепно-мозговой травмой травматического и холодового происхождения, изучается также возможность использования эффективных композиций, содержащих криопротекторы и биологически активные соединения,для повышения резистентности теплокровных животных к глубокому охлаждению (В.К.Мазалов). Показана (В.И.Луговой, В.В.Чижевский, С.Е.Овсянников) возможность положительного влияния ПЭО-400 и ПЭО-1500 на изменения показателей биоэлектрической активности головного мозга, а также перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментных систем в различных органах и тканях при глубоком охлаждении животных. На основании этих данных предложен оригинальный лечебный препарат "Криополиэтиленоксид-400, 15%-й раствор для инъекций", который успешно прошел клинические испытания в профильных клиниках страны и рекомендован для внедрения в медицинскую практику как эффективное осмо-диуретическое средство.

В ряде исследований выявлено свойство криопротекторов-полиэтиленоксидов оказывать стимулирующее действие на всхожесть и ростовые качества семян многих сельскохозяйственных культур, а также способствовать сохранению качества фруктов при длительном их хранении (М.И.Шраго, В.К.Мазалов, М.А.Соловьева). При этом показана эффективность применения криозащитных веществ из различных классов химических соединений при низкотемпературном консервировании семян (Т.Ф.Стрибуль, А.Н.Новиков) и меристемальной ткани (А.И.Григоращенко) различных сельскохозяйственных растений для сохранения их генофонда.

Результаты исследований, выполненных в отделе криопротекторов, нашли отражение во многих отечественных и зарубежных публикациях, в том числе 4-х монографиях, методических рекомендациях, 35 авторских свидетельствах на изобретения. В цикл работ, который был удостоен Государственной премии СССР в области медицины (1978 г.), вошли также результаты исследований по проблеме криопротекторов (М.И.Шраго).

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.018.46.014.41

А.Н.Гольцев

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРОЯВЛЕНИЯ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ТКАНИ

Использование гемопоэтической ткани в комплексной терапии патологий гемо- и иммунопоэза является одним из программных вопросов современной медицины. Во всем мире несколько десятков лет ведется постоянная работа по совершенствованию методов получения, хранения, трансплантации (трансфузии) кроветворных клеток. Стало очевидно, что, несмотря на возможность получения кроветворных предшественников из различных источников (кордовая кровь, клетки эмбриональной печени и др.), значительную долю в общем объеме пересадок гемопоэтической ткани занимает костный мозг, преимущественно аллогенный, трансплантация которого связана с развитием иммунного конфликта в системе "донор-реципиент". Преодоление или снижение выраженности такого рода конфликта является первостепенной задачей ученых-фундаменталистов и клиницистов, работающих в этой области медицины.

Серьезное внимание вопросам трансплантации гемопоэтической ткани уделяется в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Наряду с решением проблем оценки характера и степени влияния холодовых факторов на процессы метаболизма, структурной организации клеток кроветворных тканей, должное место занимали и вопросы оценки состояния криоконсервированных гемопоэтических клеток, их взаимодействия с организмом реципиента. В отделах криоиммунологии, низкотемпературного консервирования, криоморфологии были получены первые результаты, подтверждающие нарушение морфофункционального статуса кроветворной ткани после криоконсервирования, что позволило высказать предположение об изменении ее иммунореактивности при тех или иных условиях холодового воздействия. Для более глубокого изучения патофизиологических основ воздействия криоконсервирования на гемопоэтические ткани, инициации и развития иммунного конфликта при трансплантации гистонесовместимого нативного и криоконсервированного материала в 1993 году в ИПКиК НАН Украины был создан отдел криопатофизиологии, в состав которого вошли сотрудники лаборатории криобиологии кроветворных клеток отдела криоиммунологии и отдела криобиологии систем репродукции, занимающиеся вопросами криоконсервирования и использования эмбриональных кроветворных клеток.

Научные исследования отдела криопатофизиологии (КПФ) направлены на разработку эффективных методов криоконсервирования кроветворных предшественников различных кроветворных тканей, изучение патофизиологических механизмов взаимодействия трансплантата с организмом реципиента в иммуноконфликтной и бесконфликтной ситуациях, обоснование применения костного мозга в клинической практике при различных патологических состояниях организма. Одним из направлений работы, проводимой в отделе КПФ, является поиск путей стимуляции защитного потенциала трансплантата криоконсервированной кроветворной ткани, снижения развития иммунного конфликта при пересадке гистонесовместимого материала с использованием методов криоконсервирования и биологических модификаторов иммунокомпетентной сферы в виде клеточных популяций и тканевых экстрактов фетоплацентарного комплекса.

Теоретическую основу концепции возможности изменения иммунореактивности трансплантируемой гемопоэтической ткани должен составлять базисный тезис иммунотрансплантологии о роли компонентного клеточного состава трансплантата в проявлении его функциональной активности. Выпол-

Матеріал, захищений авторським правом

ненный в отделе цикл работ подтвердил предположение ряда исследователей о возможности изменения функционального состояния миелотрансплантата за счет модификации структурно-функциональных свойств не только непосредственно кроветворных предшественников, но и клеточных популяций, проявляющих в отношении предшественников регуляторно-акцессорную активность и обладающих "трансплантабельностью" (Е.Д.Луценко, А.Н.Гольцев, Т.Г.Дубрава, 1995). Детальное изучение данного вопроса показало, что активность присуща клеткам, входящим во фракцию адгезивных элементов костного мозга. Полученные нами данные расширили представления о значении компонентного состава миелотрансплантата в проявлении кроветворной функции, в которой основная роль регуляторного начала отводилась клеткам тимусного происхождения (А.С.Гусева, 1995; Р.В.Петров, 1970). Важно, что даже при сохранении в трансплантате Т-клеток проявление их активности может зависеть от изменения качественно-количественных параметров клеток иного гистогенеза, обладающих акцессорно-регуляторной активностью (А.Н.Гольцев, Л.В.Останкова, Т.Г.Дубрава, 1993). Другими словами, изменение "сбалансированного" клеточного состава в миелотрансплантате под действием тех или иных факторов является предпосылкой изменения его функционального статуса в целом. Криоконсервирование — один из факторов, изменяющих структурно-функциональное состояние различных биологических объектов, в том числе и клеток лимфогемопоэтического комплекса. Более того, на примере иммунокомпетентных клеток показано, что различные режимы криоконсервирования по-разному влияют на одни и те же свойства клеток, а одни и те же режимы могут в различной степени изменять свойства одних и тех же клеток (А.Н.Гольцев, 1988).

Проведенные экспериментальные исследования (Е.Д.Луценко, Т.Г.Дубрава, Л.В.Останкова, Е.В.Опанасенко) с использованием определенных режимов замораживания-отогрева показали, что различные режимы криоконсервирования подобно искусственным методам извлечения из костного мозга регуляторно-акцессорных клеток, в частности, адгезивных клеток (АК), могут выступать в роли "фактора селективной элиминации" этих элементов (А.Н.Гольцев, 1993). Так как подобная феноменология отмечалась в отношении кроветворных предшественников, вполне обосновано предположение возможности использования различных режимов криоконсервирования и как фактора модификации иммунореактивности миелотрансплантата, т. е. изменяя в костном мозге в процессе криоконсервирования соотношение цитокин-продуцирующих клеточных популяций, можно ожидать изменения функциональной активности клеток-эффекторов Т-ряда, инициирующих реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), а также процесса их формирования из клеток-предшественников. Такое предположение вполне обосновано: во-первых, установленным фактом элиминации из костного мозга в процессе криоконсервирования цитокин-продуцирующих клеток — фракции АК — и, во-вторых, данными по изучению патофизиологических основ проявления РТПХ, полученными в последнее время. Указывается на важную роль продуцируемых акцессорными клетками кроветворного микроокружения цитокинов воспаления в инициации и поддержании РТПХ, по крайней мере, ее острой формы (J.H.Antin et al., 1992).

Действительно в ситуации межлинейной трансплантации костный мозг, криоконсервированный в определенных режимах, проявлял сниженную РТПХ-активность. По всем выбранным критериям оценки интенсивность развития "вторичной болезни" определяется характером трансплантируемого костного мозга. Модификация его компонентного состава в процессе криоконсервирования в определенном режиме сопровождается изменением иммунореактивности миелотрансплантата, наблюдаемом при искусственной элиминации из костного мозга фракции АК. Эти результаты дают основание считать

Матеріал, захищений авторським правом

фракцию АК миелотрансплантата важным компонентом в обеспечении не только его гемопоэтической активности, но и аллореактивности при инициации хронической РТПХ. Следовательно, полученные данные имеют важное прикладное значение, открывая возможность применения криоконсервирования не только как способа длительного хранения гемопоэтической ткани, но и как инструмента модификации (снижения) ее иммунореактивности.

Вместе с тем необходимо учитывать, что режимы криоконсервирования, обеспечивающие снижение иммунореактивности миелотрансплантата, приводят и к снижению его гемопоэтической функции, т. е. защитного потенциала. Из этого следует, что поиск путей модификации состояния РТПХ-активности гистонесовместимого костного мозга не должен ограничиваться только разработкой соответствующих режимов криоконсервирования. Альтернативным криоконсервированию вариантом изменения РТПХ-активности может быть совместное с костным мозгом введение клеток, клеточных и тканевых экстрактов, проявляющих регуляторную активность в отношении иммунокомпетентной сферы реципиентов и трансплантата. Оценка иммунных взаимодействий в системе "материнский организм-плод" показывает, что в роли иммунорегуляторов можно использовать продукты фетоплацентарного комплекса (ПФПК), относящиеся к так называемым "белкам зоны беременности" (В.И.Говалло, 1987). Они определяются в тканях и клетках не только иммунокомпетентной сферы материнского организма, но и плодной ткани, реализующей лимфогемопоэтическую функцию (В.И.Грищенко, 1990). Так, после первого месяца беременности основным местом синтеза ведущего тригтерного фактора активации неспецифической иммуносупрессии — альфа-фетопротеина (АФП) — становится эмбриональная печень (Г.И.Абелев, 1994). В первом же триместре беременности, а именно 6–12 недель, эмбриональная печень обладает и максимальной гемопоэтической активностью (В.И.Грищенко и др., 1988). Существует мнение, что одной из причин низкой иммунореактивности аллогенных клеток эмбриональной печени (КЭП) является присутствие в ней продуцируемого *in situ* АФП (Г.И.Абелев, 1994). Однако, если характеризовать КЭП с позиций гемопоэтической и цитокин-продуцирующей активностей, необходимо учитывать и сопоставлять их временные параметры. Пик гемопоэтической активности приходится на начало периода синтеза АФП в организме, достигающего максимума к 15–16-й неделям и постепенно снижающегося в дальнейшем. Такого рода особенность функциональных параметров эмбриональной печени должна учитываться при использовании ее в качестве препарата так называемой "тканевой терапии".

Разработка и совершенствование методов получения, заготовки, длительного хранения КЭП является одним из направлений фундаментальных и прикладных исследований отдела КПФ. Сотрудники отдела (Г.С.Лобынцева, И.А.Вотякова) совместно с сотрудниками отдела КСР разработали эффективный метод криоконсервирования КЭП, что позволило создать при ИПКиК НАН Украины низкотемпературный банк КЭП для клинического их применения. Продолжаются дальнейшие исследования по раскрытию механизмов снижения функциональной активности разной степени дифференцировки кроветворных предшественников эмбриональной печени под действием факторов криоконсервирования. Выполненные в этом направлении работы позволили успешно использовать криоконсервированные КЭП в клинической практике при лечении самых различных патологических состояний организма человека, прежде всего, гемато- и иммунодефицитных.

Успешное с высокой степенью эффективности применение КЭП в клинической практике, отсутствие каких-либо побочных эффектов, свидетельствующих о развитии иммунных конфликтов, определяют необходимость расшифровки патофизиологических основ взаимодействия КЭП, как и других ПФПК, с организмом реципиента. Возможными модификаторами состояния

Матеріал, захищений авторським правом

иммунореактивности организма были взяты КЭП мышей и экстракт плаценты человека (ЭПЧ). Анализ результатов, полученных сотрудниками отдела Т.Г.Дубравой, Е.Д.Луценко, Л.В.Останковой, Е.В.Опанасенко, Т.А.Калиниченко, показал, что КЭП определенных сроков гестации проявляет не только гемопоэтическую, но и иммуномодулирующую активность. Иммунотропностью обладал и ЭПЧ. Тестирование с помощью моноклональных антител фенотипических характеристик иммунокомпетентных клеток (ИКК) "интактных" реципиентов после введения субстратов обоих типов показало выраженное перераспределение ИКК в сторону повышения концентрации клеток с характеристиками Т-супрессоров.

Изменение фенотипических параметров коррелировало с изменением функционального статуса ИКК, проявляющих в реакции бластной трансформации выраженную супрессорную активность, которая явилась основанием для выполнения исследований по изучению возможности проявления иммунотропной активности ПФПК не только в отношении эндогенных ИКК, но и вводимых в организм гистонесовместимого реципиента. В экспериментах с использованием острой и хронической РТПХ были получены результаты, подтверждающие способность КЭП и ЭПЧ ингибировать иммунореактивность экзогенных ИКК. При инициации острой РТПХ введением аллогенных лимфоидных клеток сублетально облученным реципиентам все выбранные критерии оценки синдрома были менее выражены в группе мышей, которым совместно с ИКК вводили ПФПК. Особого внимания заслуживают полученные нами данные о способности эмбриональных субстанций проявлять иммуномодулирующую активность при пересадке гистонесовместимого костного мозга. Как отмечалось выше, существует возможность подбора режимов криоконсервирования, обеспечивающих снижение РТПХ-активности миелотрансплантата с одновременным снижением его гемопоэтической активности, а также возникает необходимость использовать соответствующие экзогенные факторы, позволяющие при минимизации РТПХ-активности костного мозга одновременно повышать его кроветворную функцию. Оказалось, что совместное введение с криоконсервированным в режиме снижения РТПХ-активности аллогенным костным мозгом КЭП сопровождалось некоторым незначительным снижением иммунореактивности миелотрансплантата и более выраженным восстановлением гемопоэза реципиентов с повышением уровня их выживаемости.

Что касается ЭПЧ, то его участие в модуляции иммунореактивности аломиелотрансплантата также не вызывает сомнения. Однако его активность в большей степени проявлялась при трансплантации нативного костного мозга и четко не прослеживалась в отношении стимуляции гемопоэза реципиентов с трансплантатом аллогенного криоконсервированного костного мозга. Тем не менее, очевидно, что ПФПК, в частности, используемые в выполненных нами исследованиях КЭП и ЭПЧ, обладают выраженной иммуномодулирующей активностью в организме "интактных" реципиентов, а также экзогенными ИКК. Важно, что такая активность проявляется при взаимодействии с имеющимися в трансплантате клетками-эффекторами, а также формирующимися из предшественников костно-мозгового происхождения. Обобщение полученного нами материала дает основание считать, что в широком диапазоне иммуномодулирующих активностей ПФПК ведущей, очевидно, является стимуляция супрессорного звена иммунитета. В дальнейших исследованиях будет проанализирован спектр активных начал ПФПК, но уже сейчас ясно, что они могут быть отнесены к ранее описанным "белкам зоны беременности" (В.И.Говалло, 1987), а именно трофобластическим, ассоциированным с беременностью и фетальным (С.В.Ширшев, 1993). Активность КЭП может быть обусловлена продукцией ведущего активатора Т-супрессоров — АФП. Однако нельзя не учитывать присутствия среди КЭП и участия в реализации процесса

Матеріал, захищений авторським правом

"естественных супрессоров" (В.М.Фролов и др., 1992). Важно отметить, что почти по всем выбранным нами критериям оценки активность инициации Т-супрессорного звена была более выражена у ЭПЧ по сравнению с КЭП. Ранее было отмечено, что активность ЭПЧ в отношении субстратов иммунокомпетентной сферы связана с присутствием в нем широкого спектра глобулинов, субстанций с гормональной и ферментативной активностями. Такого рода белки осуществляют контроль почти всего обмена иммунных взаимодействий, включая контроль состояния иммунорегуляторного звена с индукцией и дальнейшей экспансией генерации клеток-супрессоров, продуцируемых ими факторов, выступающих в роли ингибиторов реактивности иммунной системы материнского организма и плода.

Известно, что ПФПК, обладающие иммунорегуляторной активностью, специфически взаимодействуют с ИКК в зависимости от условий культивирования, дозы вводимого материала и т.д. Однако более интересным, с нашей точки зрения, является постановочный вопрос возможности оценки инициации Т-супрессорной активности такого рода субстратами, полученными в различные сроки беременности. Факт активации Т-супрессорного звена иммунитета ПФПК заставляет обратить внимание на возможность их применения в тех ситуациях, когда патологический процесс в организме млекопитающих развивается именно на фоне дисбаланса иммунорегуляторных звеньев иммунной системы (ИС), в частности, снижения функции Т-супрессорного звена. К таким патологиям относятся, прежде всего, аутоиммунные заболевания (АИЗ). Решению проблем по выяснению этиологических факторов АИЗ, расшифровке патофизиологических основ их развития, возможности использования ПФПК различных сроков гестации как средств иммунокорригирующей терапии посвящены дальнейшие исследования отдела.

УДК 61:615.832.9

Б.П.Сандомирский

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ КРИОМЕДИЦИНЫ

Одной их характерных особенностей современного этапа развития биологических наук стало использование методологии, средств физики и математики в медико-биологических исследованиях. Применение в медицине достижений физики низких температур и криогенной техники привело к созданию новых перспективных методов консервирования клеток и тканей, а также способов лечения холодом некоторых опухолевых и воспалительных заболеваний. Чисто эмпирическое осуществление криоконсервирования и криотерапии опережает экспериментально-теоретическое обоснование использования низких температур в медицине. Для решения научных, технических и практических задач применения холода в биологии и медицине в развитых странах мира созданы и создаются новые криобиологические центры. В мире насчитывается больше ста научно-исследовательских коллективов, которые разрабатывают проблемы криобиологии и криомедицины.

Криомедицина как система научных знаний и практических действий, направленных на изучение влияния холода на организм человека с целью укрепления и сохранения здоровья, а также на лечение заболеваний, тесно взаимосвязана с криобиологией, криогенной техникой, физикой низких температур, экспериментальной, теоретической и клинической медициной и состоит из двух основных разделов: криотерапии и гипотермии. Криотерапия включает методы лечения, которые основываются на дозированном охлаждении тканей, органов или всего организма, обеспечивающих их лечебное действие. Одним из основных разделов криотерапии является криохирургия, связанная с методами локального замораживания тканей с целью их разрушения, удаления или стимуляции процессов заживления. Гипотермический уровень ох-

Матеріал, захищений авторським правом

лаждения всего организма человека применяется в кардиохирургических клиниках при операциях больных, преимущественно детей, с врожденными пороками сердца. Методы региональной, в том числе и краниоцеребральной гипотермии используются для снижения уровня обмена веществ в зоне патологического процесса (травмы, отек мозга, панкреатиты, перитониты).

Криобиология и криомедицина имеют специфическую взаимосвязь, обусловленную тем, что исследования молекулярных и субклеточных изменений, которые происходят в клетках и их органеллах в процессе замораживания–оттаивания без специальных предохранительных и защитных мер, лежат в основе холодовой деструкции — главном направлении криотерапии.

Клинический результат, связанный с действием холодового фактора, зависит от температурных параметров влияния, вида ткани, ее состояния и обусловлен разрушением клеточных структур, стимуляцией процессов заживления или снижения уровня обмена веществ биологического объекта.

Технология охлаждения ткани специальными инструментами при использовании хладоагентов основывается на двух принципах: контакте биологического объекта с зондом, температура которого может снижаться до –196 °С при охлаждении и повышаться до 50 °С при его нагревании, и распылении хладоагента по поверхности патологического очага.

В большинстве криоинструментов используется жидкий азот или газы под давлением (закись азота, углекислый газ), что обеспечивает снижение температуры рабочей части инструмента от –50 до – 80 °С. В этих случаях рабочая часть криозонда охлаждается вследствие быстрого расширения сжатого газа (эффект Джоуля-Томпсона). Закись азота (N_2O) — относительно дешевое вещество, которое сохраняется в баллонах под давлением. Во время испарения жидкости, превращения ее в газ, происходит отведение тепла от рабочей части инструмента и одновременно от ткани, с которой он контактирует.

Жидкий азот (N_2) — самый эффективный хладоагент, который применяется в хирургии. Действие холода на патологически измененные, например опухолевым процессом, ткани заключается в том, что они гибнут. Причина таких изменений — в снижении температуры ткани, а следовательно и клеток, которые входят в ее состав, а также в самой скорости снижения и последующего отогрева. Состояние изолированных клеток под действием охлаждения-замораживания-отогрева описано в исследованиях криобиологов, которые установили гибель клеток в результате процессов, сопровождающих быстрое снижение температуры (так называемый температурный шок), формирование кристаллов льда, повышение концентрации электролитов в растворе при вымораживании воды (растворителя) и ряда других факторов.

Вследствие действия замораживания-оттаивания на клетки тканей живого организма в капиллярах и венулах возникают изменения в виде замедления кровотечения, образования тромбов, которые закрывают отверстие сосуда и выключают его из системы активной циркуляции крови. Причем изменения происходят прежде всего в венулярном звене, потом в капиллярах. Артериолы проявляют большую стойкость к действию холодового повреждения. Таким образом, при охлаждении ниже определенного температурного уровня клетки, которые не погибли от непосредственного охлаждения, отмирают из-за нарушения кровообращения в тканях. Если время криовоздействия, а в результате и изменений в клетках под его действием продолжается несколько минут, то формирование окончательных изменений местного кровообращения длится до шести часов. Иначе говоря, окончательно прогнозировать разрушительное действие процедуры замораживания–отогрева можно не раньше, чем через 3–6 ч. Для расчета распределения температурных полей и прогнозирования зоны оледенения при криодеструкции печени была применена математическая модель А. А. Березовского: прекращение криоаппликации не сопровождается стабилизацией охлаждения ткани, нулевая изотерма перемещается от центра

Матеріал, захищений авторським правом

воздействия, увеличивая область низкотемпературных повреждений, формирование ишемического некроза в печени при локальном криовоздействии происходит в области, ограниченной изотермой –5 °С. Ранние микроциркуляторные нарушения в участках печени после снижения температуры от 0 до –5 °С соответствуют острой фазе воспалительного процесса.

Интересные аспекты изменений в организме больного после криохирургических операций связаны с иммунологическими реакциями. Так, на основании экспериментальных и клинических исследований можно говорить о формировании аутоиммунных антител против поражения тканей при некоторых видах злокачественных опухолей. Интенсивность таких изменений отражается на уменьшении размеров опухоли, улучшении общего состояния больных. И хотя нельзя считать, что криохирургические вмешательства радикально влияют на результат лечения больных со злокачественными новообразованиями за счет изменения их иммунологического статуса, все же этот аспект исследований остается достаточно обнадеживающим в решении проблемы.

Другим направлением в медицинском аспекте применения низких температур является криоэкстракция. Принцип криоадгезии (холодового прилипания) может быть использован при взятии проб ткани для последующего изучения под микроскопом. Таким же образом прилипает хрусталик при его контакте со специальным криозондом во время операции катаракты глаза. Такое прилипание происходит в температурном диапазоне отрицательных температур до –40–70 °С. При удалении катаракты этот метод применяется во многих клиниках мира.

Стимуляция процессов заживления с помощью дозированных криовоздействий наиболее ярко проявляется при лечении ожоговых и гнойных ран, трофических язв, эрозивных (язвенных) конъюнктивитов и др. Как было показано на примере ожоговых и гнойных ран, реализация терапевтического эффекта после местного криовоздействия связана со снятием гипертермии ткани, с нормализацией сосудисто-тканевой циркуляции и синхронизацией репаративных процессов в клеточных и соединительно-тканных структурах ткани. При этом была подтверждена правомочность для криомедицины "правила исходного состояния" тканей: действие одних и тех же параметров охлаждения нормальных и патологически измененных тканей приводит к различным патофизиологическим изменениям в них. Так, криовоздействие в пределах –2 ±–5 °С на ожоговые и гнойные раны приводит к лечебному действию, тогда как нормальные ткани на такое охлаждение практически не реагируют. Данное положение нашло свое подтверждение и в реализации криотерапии дуоденальных пептических язв: эндоскопическое охлаждение способствовало снятию болевого синдрома, нормализации секреторной и эвакуаторной функции желудка, ликвидации патологических микроорганизмов, а также ускоренному заживлению язвенного дефекта. Криотерапия дуоденальных язв стала возможной при создании специального устройства криоэлектрокоагулятора (КЭК-1).

Создание специальных криоинструментов для холодового лечения ожоговых и гнойных ран расширило сферу применения данных аппаратов в сторону артрологии. Охлаждение зоны патологически измененных суставов существенно улучшило лечение больных за счет снятия болевого синдрома, увеличения амплитуды движений и усиления действия других терапевтических средств.

Криохирургические вмешательства очень хорошо зарекомендовали себя в отоларингологии при лечении воспалительных процессов лимфоидной ткани глотки (хронические тонзиллиты), при носовых кровотечениях, хронических ринитах. Отоларингологи, как и специалисты других профилей, осуществляют криовоздействия на такие доброкачественные опухоли, как лимфангиомы, лейкоплакии, полипы. При этом нет необходимости использовать криоинст-

Матеріал, захищений авторським правом

рументы с большой производительностью, поэтому наиболее часто применяются охлаждающие приспособления, работающие на углекислоте, закиси азота, фреоне (хладоне), или портативные автономные зонды и аппликаторы на жидком азоте.

Опухоли головы и шеи часто подвергаются криохирургическому лечению, что обусловлено их доступностью для холодового влияния, которое может быть выполнено в амбулаторных условиях без специального обезболивания, но с высоким радикализмом.

Широко применяются криовоздействия в нейрохирургии. Цель первых криохирургических операций с использованием стационарных криоинструментов с регулируемой температурой наконечников разной формы и диаметра — разрушить определенные структуры головного мозга, с которыми связаны дрожание и некоординированные движения, сопровождающие болезнь Паркинсона. При стереотаксическом, то есть направленном по трем осям, введении тонкого криозонда в точно определенное место в головном мозге и замораживании ткани мозга (точнее определенного ее ядра) у больных исчезали признаки болезни прямо на операционном столе. Используются низкие температуры в нейрохирургии при разрушении тех участков опухолевой ткани головного мозга, которые не удается удалить иным способом.

Эффективно используется холод также в лечении урологических заболеваний. И хотя тут криометод не смог заменить традиционные оперативные вмешательства, а только в конкретных клинических ситуациях может применяться как дополнительный, все же его фундаментальное изучение имеет большое значение для понимания процессов влияния криодеструкции ткани на иммунную систему. Криохирургические вмешательства в урологии требовали создания специальных инструментов с высокой хладопроизводительностью, чего можно достичь лишь с помощью жидкого азота. Такие технические приспособления созданы и применяются во многих урологических клиниках.

Перед общей хирургией открывается широкое поле для использования холодовых методов лечения. Большинство распространенных заболеваний успешно лечится с помощью криовоздействий инструментами с применением жидкого азота и закиси азота. Контакт охлажденного криозонда с патологическим очагом на протяжении 2–3 мин с повторением после оттаивания обеспечивает гибель измененных тканей. Такие вмешательства могут в ряде случаев выполняться амбулаторно, а в стационаре продолжительность лечения резко сокращается.

Новые аспекты открывает использование низких температур при операциях на органах брюшной полости, где они могут быть успешно применены в комплексе с другими приемами традиционной хирургии. Это в значительной мере касается операций на печени, где с помощью низкотемпературного замораживания паразитарной кисты печени можно добиться ее уничтожения без резекции части органа. Следует заметить, что резекция печени сопровождается большой потерей крови, поскольку этот орган обильно снабжается кровью как со стороны артериальной, так и венозной систем. Для борьбы с кровотечением печени очень эффективны способы промораживания предполагаемой линии резекции до −30 °С. После такого криовоздействия кровотечения из сосудов диаметром до 1 мм не бывает, а большие сосуды блокируются одним из традиционных способов — перевязыванием нитками, электрокоагуляцией и др. Значительные успехи достигнуты благодаря криохирургии не только при лечении опухолей печени, но и опухолевых поражений поджелудочной железы.

Криомедицина делает первые шаги в направлении замещения утраченных функций органов брюшной полости. Мы имеем в виду возможности использования криоконсервированных островков пакреас для лечения больных с инсулинзависимым сахарным диабетом. Как показали результаты экспери-

Матеріал, захищений авторським правом

ментальных и клинических исследований, имплантация ксеногенного материала позволяет стабилизировать состояние больных с латентными формами сахарного диабета, уменьшить до 20 % дозу экзогенного инсулина, существенно снизить частоту сосудистых осложнений. Для этого необходимо создавать банк островковой ткани поджелудочной железы и тщательно отбирать больных для имплантации.

Низкие температуры используются также для уменьшения возможности поступления во время хирургической операции опухолевых клеток из больного органа в кровеносную или лимфатическую сосудистую систему с дальнейшим развитием метастазов. Для этого во время хирургической операции ткани, которые подлежат удалению, подвергаются замораживанию, что прекращает кровоснабжение в них, а в результате и выход через сосудистую систему в общий кровоток клеток опухоли.

Значительные успехи диагностики и лечения многих заболеваний желудочно-кишечного тракта, прежде всего желудка и двенадцатиперстной кишки, связаны с использованием современной эндоскопической техники, которая дает возможность без лишней травматизации больного тщательно осмотреть внутреннюю поверхность органа, взять с нее ткани и клетки для исследования, а при необходимости прицельно подвести медикаментозные средства, которые, например при кровотечении, обеспечивают усиление свертываемости крови. Таким же образом можно выполнить и электрокоагуляцию. Развитие специализированных криомедицинских способов дает возможность через специальный канал в эндоскопическом приспособлении диаметром около 3 мм подвести к патологическому очагу приспособление, которое охладит, например, язвенный дефект, стимулирует процессы заживления или даст возможность заморозить и разрушить полипозные образования.

Преимущества криохирургии особенно рельефно проявляются в лечении опухолей кожи. Криодеструкция патологических образований кожного покрова производится, как правило, без дополнительной анестезии, и процесс заживления проходит без формирования грубых рубцов. Это особенно важно при устранении опухоли на лице. Заживление достигается тем полнее, чем раньше с момента заболевания начинается лечение. Так, при раннем выявлении рака кожи полное излечение наблюдается у 95–98 % больных. Если к сказанному добавить, что лечение происходит амбулаторно, не требует госпитализации, то значимость криометодов увеличивается. Кроме сосудистых опухолей (гемангиом), базалиом, фибром и других образований кожи, криометодами могут быть излечены бородавки и пигментные пятна. Холод как лечебный фактор также давно и эффективно применяется в акушерстве и гинекологии.

Как видно из приведенного, современная криомедицина прочно вошла в арсенал лечебных методов, направленных на восстановление здоровья людей.

УДК 57.086.3:537.533.35

А.С.Капрельянц

РАЗВИТИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИПКиК НАН УКРАИНЫ

Развитие электронной микроскопии как научного направления в ИПКиК НАН Украины началось в 1972 г. Первые разработки были осуществлены в проблемной лаборатории низкотемпературной консервации костного мозга и крови Украинского института усовершенствования врачей МЗ УССР, которая составной частью вошла в созданный институт. Этой лабораторией в 1970 г. по инициативе ее руководителя проф. Н.С.Пушкаря были приобретены электронный микроскоп производства Сумского завода электронных микроскопов

Матеріал, захищений авторським правом

и ультрамикротом шведской фирмы LKB, а мне было поручено освоение этого метода на курсах операторов при Сумском заводе электронных микроскопов. Наши первые электронно-микроскопические снимки клеток крови, препарированных с помощью глютаральдегидной фиксации и залитых в метилметокрилат, были получены в 1971 г. в группе канд. мед. наук А.А.Цуцаевой. Дальнейшие исследования проводились в отделе криоморфологии под руководством проф. В.М.Чередниченко и были направлены на изучение влияния низких температур на ультраструктуру клеток асцитной карциномы Эрлиха. В результате сотрудничества с Сумским заводом электронных микроскопов (П.П.Барзилович — директор, Э.А.Шуляк — зав. лабораторией СКТБ, Т.П.Гладких и В.А.Кобыляков — инженеры) с целью автоматизации электронно-микроскопических исследований были разработаны новые технические средства и методические подходы, которые позволили в автоматическом режиме выводить информацию из электронного микроскопа для последующей автоматизированной обработки (А.С.Капрельянц и др., 1972–1977).

В этот период в отечественной науке интенсивно формировалось научное направление по автоматизации анализа микроскопических изображений, во главе которого стоял член-корреспондент АН СССР Г.Р.Иваницкий. На базе Института биологической физики АН СССР в Пущино регулярно проводились всесоюзные конференции, в которых сотрудники нашего института принимали участие и были практически первыми отечественными исследователями, обеспечившими возможность вывода из электронного микроскопа информации об объекте в цифровой форме в реальном режиме времени. В 1982 г. была издана монография "Теоретические вопросы автоматизации медико-биологических исследований" (А.С.Капрельянц и др.). В течение многих лет это научное направление оставалось для нас приоритетным и продолжает развиваться до сих пор.

В 1975 г. в отделе криоморфологии, которым руководил проф. Е.Я.Панков, мною была выполнена диссертационная работа, полностью посвященная электронно-микроскопическому изучению клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях криобиологического эксперимента. К этому времени отдел криоморфологии представлял собой крупное научное подразделение института, в котором по инициативе Е.Я.Панкова были выделены четыре научные группы: электронной микроскопии (руководитель канд. мед. наук А.С.Капрельянц), цитологии (руководитель канд. биол. наук О.П.Маркова) гистологии (руководитель канд. мед. наук М.Г.Шенберг), офтальмологии (руководитель канд. мед. наук Т.Н.Юрченко). Дальнейшие электронно-микроскопические исследования были направлены на совершенствование методических подходов и расширение спектра исследуемых объектов. В частности, учитывая большую роль биомембран в развитии холодовых повреждений, нами были систематизированы виды (типы) повреждений плазматической клетки при действии низких температур (А.С.Капрельянц, 1977, 1979).

В 1978 г. была опубликована монография "Ультраструктура клетки при низких температурах", которая является первой и до сих пор единственной монографией в криобиологии, в которой систематизированы и обобщены результаты электронно-микроскопических исследований, выполненных различными отечественными и зарубежными учеными (Н.С.Пушкарь, А.С.Капрельянц, Е.Я.Панков, 1978). Эта работа была отмечена Премией Ленинского комсомола Украины для молодых ученых в области науки и техники (А.С.Капрельянц, 1979).

Семидесятые годы в мировой биологической науке характеризуются появлением нового морфологического метода "замораживание-скалывание", а также развитием методов препарирования клеток с использованием низких температур, которые получили название криогенных методов препарирования. Нами были установлены научные контакты со специалистами в этой об-

Матеріал, захищений авторським правом

ласти Э.И.Заичкиным, Я.Ю.Комиссарчиком, Д.А.Мошковым и Е.Н.Ратнером. Ведущим научным центром по этой проблеме была лаборатория электронной микроскопии Института биологической физики АН СССР (руководитель Б.Л.Аллахвердов), на базе которой проводились тематические симпозиумы (1974–1977). В 1984 г. в нашей группе была подготовлена и успешно защищена диссертационная работа по использованию метода замораживания-скалывания для исследования процессов кристаллизации при замораживании криопротектора ПЭО (Н.В.Репин, 1984). При активном участии научного сотрудника В.С.Журавлева в группе был разработан новый метод приготовления ультратонких замороженных срезов для трансмиссионной электронной микроскопии, который был защищен авторским свидетельством. Большое внимание было уделено методу замораживания-замещения биологических объектов при проведении электронно-микроскопических исследований. С этой целью было разработано оригинальное устройство для реализации этого метода (А.С.Капрельянц, 1984). Впервые исследовались локализация и характер распределения кристаллов льда в ткани печени при замораживании (А.С.Капрельянц, Р.К.Мигунова и др., 1985–1989). Наш практический опыт работы с техникой и методиками в области электронной микроскопии был обобщен в монографии "Электронно-микроскопическая техника для медико-биологических исследований" (А.С.Капрельянц и др., 1982).

В середине 80-х годов основное внимание было сосредоточено на изучении механизмов криодеструкции и восстановления ультраструктурных элементов клетки, при этом в качестве модели клетки животного происхождения были использованы клетки печени (А.С.Капрельянц, 1980–1983). Эта модель позднее была использована и другими исследователями-морфологами. Гепатоцит как единый объект исследования при различных видах воздействия (замораживание изолированных клеток в суспензии, и фрагментов ткани печени *in vitro* и локальное замораживание ткани *in vivo*) позволил выявить закономерности реакции различных субклеточных, клеточных и тканевых структур и получить новую информацию о механизмах действия низких температур (А.С.Капрельянц и др., 1984–1990). Были также разработаны новые технические средства для проведения научных исследований, в том числе и оригинальное автоматическое устройство препарирования тканей (фиксация, обезвоживание, заливка) для последующего электронно-микроскопического исследования (А.С.Капрельянц, М.П.Певцов, 1986). Эти результаты были обобщены мной в докторской диссертационной работе (Харьков, 1989). Тогда же была организована лаборатория ультраструктурных аспектов клеточной реакции на охлаждение в составе отдела криоморфологии.

В 1990 г. основным научным направлением нового подразделения института — отдела криоцитологии и количественной морфологии (руководитель проф. А.С.Капрельянц) — было электронно-микроскопическое изучение механизмов действия низких температур на клетку. Одним из значительных результатов работы явилось создание компьютерной системы морфометрического анализа MORPHO-TOOLS (А.С.Капрельянц, А.Н.Рейлян). Новые данные о структурно-функциональной характеристике гематоэнцефалического барьера при ритмическом локальном охлаждении были получены в кандидатской диссертации Л.Н.Марченко (научный руководитель проф. А.С.Капрельянц). Проблема общего охлаждения организма исследовалась с помощью электронно-микроскопических и морфометрических методов, которые позволили получить новые сведения о состоянии ультраструктуры клеток печени крысы в условиях общего охлаждения различной степени (А.С.Капрельянц, Н.Н.Космина, 1994–1996).

Таким образом, проводимые в течение многих лет электронно-микроскопические исследования позволили получить новую информацию о состоянии тонкой структуры клеток и тканей, связанную с механизмами действия низ-

Матеріал, захищений авторським правом

ких температур, что способствовало решению ряда теоретических и практических проблем криобиологии.

УДК 512.015 (088.8):57.043

Н.П.Суббота

ОПЫТ ПРИОРИТЕТНЫХ РАЗРАБОТОК ИНСТИТУТА В ОБЛАСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ АЛЛОГЕПАТОЦИТОВ

Изолированные из печени человека или животных гепатоциты *in vitro* сохраняют органоспецифические свойства, в частности, способность метаболизировать ксенобиотики (В.Г.Бруслик, 1979). Это свойство открывает широкие возможности для использования их в качестве биосорбента при лечении больных с эндотоксикозами различной этиологии (В.Ю.Берелавичус, 1975; L.Makowka, 1980; A.A.Demetriou, 1986).

Изолированные гепатоциты могут также явиться удобной моделью для изучения молекулярных механизмов биотрансформации ксенобиотиков новыми лекарственными препаратами, для проведения научно-исследовательских работ по выяснению особенностей криоповреждений ядросодержащих клеток (Е.В.Кудокоцева, 1982; B.J.Fulleret et al., 1983).

Особый интерес представляют клетки и фрагменты, полученные из печени плодов человека или животных ранних сроков развития, обладающие такими уникальными свойствами, как иммунологическая толерантность, высокий уровень содержания биологически активных соединений и белков – факторов роста (La Brecque, 1979; R.Grundman, 1986).

Вместе с тем следует отметить, что использование изолированных гепатоцитов как в научно-исследовательских лабораториях, так и в практическом здравоохранении долгое время лимитировалось отсутствием надежных и простых методов их выделения и длительного хранения, позволяющих сохранить жизнеспособность на высоком уровне.

Цель данного сообщения — анализ собственного 13-летнего опыта работы, начало которого в свое время было первым в СССР, по разработке методов криоконсервирования (–196 °С) гепатоцитов, изолированных из печени человека разного возрастного периода (кадаверы, плоды).

На начальном этапе планируемых разработок были проведены эксперименты на модельных системах печени крыс, щенков, собак, свиней. В качестве донорского материала были использованы плоды человека 16–26 недель внутриутробного развития, полученные в результате искусственных родов по медицинским показаниям, а также кадаверная печень людей, скоропостижно скончавшихся от острой сердечно-сосудистой патологии. Срок ишемии органа не превышал 1,5–2,0 ч.

Гепатоциты из печени крыс, щенят, собак, плодов и кадаверов получали собственными разработанными методами, используя вибрацию или перфузионные разделительные среды в качестве дезагрегирующих факторов (А.М.Белоус и др., 1987; Н.П.Суббота и др., 1991), а также ферментативный метод И.Л.Канаевой и др. (1975). Уровень эндогенного дыхания и проницаемость плазматических мембран для сукцината определяли полярографически (Е.Н.Мохова, 1973), мембранный потенциал — по интенсивности флуоресценции потенциалзависимого зонда-катиона 4-(п-диметиламиностирол)-1-метилпиридиния -(ДСМ) (Г.Я.Дубур, 1976), белоксинтезирующую активность — по включению С-14 гидролизата белков хлореллы в суммарные белки (Д.Кеннел, 1970), способность к захвату ксенобиотика бифенила, как описано в работе (J.W.Bridgts et al., 1965). Концентрацию АТФ в гепатоцитах измеряли по Д.Кеннелу , выход ионов калия — как в работе V.Eilam, W.D.Stein (1974), активность ферментов кислой фосфатазы и РНК-азы — по А.Дж.Бар-

Матеріал, захищений авторським правом

рет, М.Ф.Хит (1980). Жизнеспособность клеток оценивали по исключению суправитального красителя трипанового синего (ТС), гистологические и гистохимические исследования проводили, как описано в работе Н.А.Мануиловой (1973), а ультраструктуру гепатоцитов контролировали по методу Гайера (1972). Содержание белка в пробах измеряли по O.H.Lowry et al. (1951).

Для разработки оптимальных режимов криоконсервирования гепатоцитов замораживание осуществляли с использованием нескольких режимов: одноэтапно медленно со скоростью 1 °С/мин, быстро: при погружении контейнеров в жидкий азот или сверхбыстро, как описано в работе (В.Ф.Тарасов и др., 1986); двухэтапно: на первом этапе со скоростью 1 °С/мин до –60 °С, остановка 3–5 мин, на втором — быстрое погружение в жидкий азот (B.Fuller, 1990); трехэтапно, как описано в работе (А.М.Белоус, Н.П.Суббота, 1979). Пробы отогревали на водяной бане 37 °С. При замораживании суспензии гепатоцитов использовали криопротекторы глицерин, димексид, ДМСО и 1,2-пропандиол (ПД) в концентрациях 3, 5, 10 %. Гепатоциты инкубировали с криопротекторами при 2÷4 °С в течение 5...15 и 30 мин в зависимости от поставленных задач. Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась по методу Фишера-Стьюдента.

Анализ проведенных нами ранее разработок (Н.П.Суббота и др., 1992) по изучению возрастных особенностей функционирования гепатоцитов, а также данных о состоянии межклеточных контактов в печени животных разного срока развития (Ж.Браже, 1961) позволил определить основные методические подходы при выделении и криоконсервировании аллогепатоцитов. Важным, как оказалось, является в первую очередь разница в размерах печени человека и, например, крыс, щенков, новорожденных поросят. Существенное значение имеют также состояние структуры печени в момент забора органа и получения клеток, время тепловой ишемии и выбор условий перфузии на первом этапе — этапе забора печени.

Особое значение следует придать композиционному составу сред, оказывающих на ткань протекторный эффект (пролонгирование времени "умирания" органа, В.И.Шумаков и др., 1981). Среды, используемые на аналогичном (отмывочном) этапе при работе с лабораторными животными (Хенкса, Локка и др.), мало пригодны для проведения отмывочной перфузии трупного органа, поскольку не оказывают достаточного защитного эффекта на ишемизированные клетки. Они позволяют поддерживать клетки в функциональном состоянии без снижения их жизнеспособности не более 2–3-х часов. Именно поэтому на данном этапе необходимо введение дополнительного этапа — гипотермического хранения печени. Это позволяет также увеличить выход получаемых клеток, учитывая то, что печень взрослых людей — орган с выраженным развитием стромальной ткани.

Анализируя опыт экспериментальных разработок при выделении клеток из органа небольших размеров (А.М.Белоус и др., 1987), мы определили возможные модификации и приемы, позволяющие получить суспензию клеток с жизнеспособностью 60–65 % (Н.П.Суббота и др., 1991).

Разработанный метод включает несколько этапов. На первом этапе проводится отмывочная и протекторная рециркуляторная перфузия охлажденным (4 °С) раствором Евро-Коллинза под давлением 100–150 мм вод. ст. в течение 10 мин. Замена среды Евро-Коллинза на среду Хенкса при гипотермическом хранении печени кадаверов сопровождается более грубыми нарушениями структурной организации. После этого печень помещают в полиэтиленовый пакет со средой, по своему составу соответствующий перфузионному, и хранят в холодильнике при 4 °С необходимое время. Такая перфузия, предшествующая этапу получения клеток, обеспечивает снижение всех метаболических процессов в умирающем органе, низкую скорость протекания ферментативных процессов, производит постепенное охлаждение донорского органа и

Матеріал, захищений авторським правом

удаление форменных элементов крови и продуктов распада. Она же определяет качество заполнения сосудистого русла и межклеточного пространства консервирующим раствором.

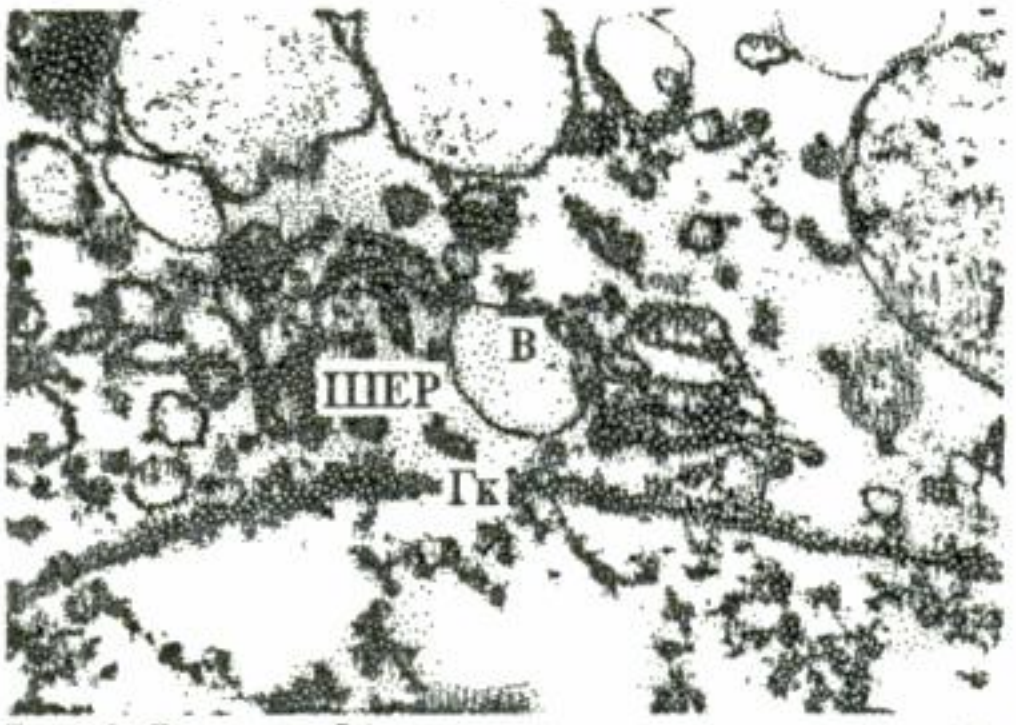


Рис. 1. Влияние 24-часового гипотермического хранения в растворе Коллинза на морфологическую сохранность печени донора. X55800. Уменьшение при репродуцировании 2/3

Нами показано, что время гипотермического хранения печени не должно превышать 16 ч (рис. 1). При ультраструктурном анализе печени в этот временной период видно, что ее структура сохранена, митохондрии несколько набухшие, хотя имеют четко выраженные кристы. Увеличение сроков гипотермического хранения сопровождается изменением структурного состояния органа и выраженной дезинтеграцией структуры через 24 ч и практически полным разрушением межклеточных связей. Именно поэтому при удлинении сроков гипотермического хранения печени повышается выход клеток, но уменьшается их жизнеспособность (В.С.Уманский, Л.Н.Зимина, 1982).

Второй этап получения клеток включает проведение перфузии раствором Хенкса без кальция в течение 10 мин при температуре перфузата в момент начала перфузии 37 °С и постоянной оксигенации. После этого печень помещают в термостатированный раствор Хенкса и продолжают рециркуляторную перфузию при постоянной оксигенации смесью O_2 (95 %) и CO_2 (5%). В среду перфузии вводят 1 мМ ЭДТА. Время перфузии составляет 30 мин, скорость перфузии — 250–300 мл/мин.

После окончания перфузии печень освобождают от капсулы, измельчают ножницами на холоде в охлажденной сахарозной среде и проводят дезагрегацию с помощью вибрации при частоте 50 Гц в течение 90 с в несколько приемов. Полученную суспензию фильтруют, промывают стандартным раствором Хенкса, центрифугируют 3–5 мин при 1 000 об/мин. Полученный осадок клеток разводят средой для криоконсервирования из соотношения 20 млн кл/мл.

Сравнение жизнеспособности гепатоцитов, полученных с использованием описанных методических приемов и ферментативного метода (коллагеназный метод), позволило доказать, что морфологическая сохранность их не различается.

Таблица 1

Функциональные параметры свежевыделенных и криоконсервированных в среде без криопротекторов гепатоцитов плодов и трупной печени человека (n=7)*

Измеряемый параметр	Свежевыделенные гепатоциты		Замороженно-отогретые гепатоциты	
	плодов	кадаверов	плодов	кадаверов
Жизнеспособность по исключению ТС, %	65,0±2,0	62,0±4,0	30,0±4,0	21,0±4,0
Включение меченых аминокислот, имг./мин ЖС кл/мл	52400±112	41200±84	12780±97	12360±82
Флуоресценция ДСМ, отн. ед.	112,0±10,0	128,0±12,0	52,0±4,0	70,0±6,0
Захват бифенила, мкМ/мл	60,0±4,0	70,0±4,0	45,0±2,0	55,0±4,0

* $p<0,05$

В табл. 1 приведены данные, характеризующие функциональные параметры гепатоцитов, выделенных из трупной печени человека рекомендуемым способом.

Матеріал, захищений авторським правом

В работе, связанной с получением гепатоцитов плода человека, чаще всего используется печень плодов 24–26 недель внутриутробного развития. Печень этого срока все еще имеет многообразие клеточного строения: клетки лимфоидного и эритроидного ряда различной степени зрелости, ростки гемопоэтической ткани, форменные элементы крови — молодые и зрелые (рис. 2). Паренхима печени формируется в виде отдельных клеток, скоплений и выраженных тяжей гепатоцитов. Исходя из такого строения ткани, в данный временной период ее дифференцировки можно выделить не только гепатоциты, но и гемопоэтические клетки. Методические подходы при получении гепатоцитов или гемопоэтических клеток совершенно различны (В.И.Грищенко и др., 1990).

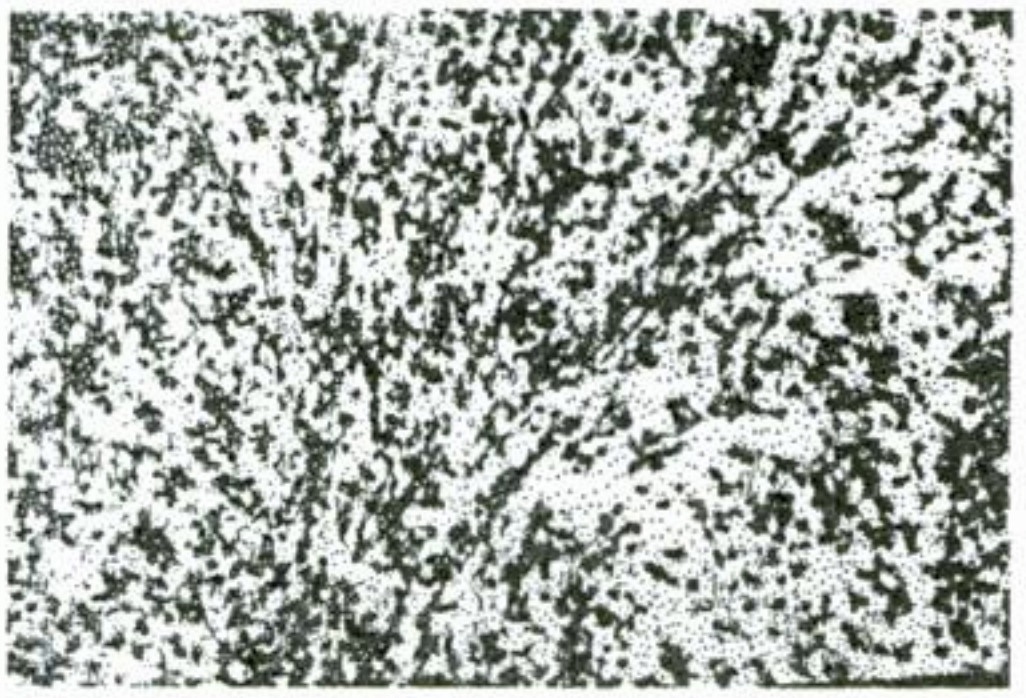


Рис. 2. Структура печени плода человека 26 недель развития. Х 100. Уменьшение при репродуцировании 2/3

Перфузию печени плода осуществляют направленным потоком через воротную вену. Катетер вводится через пуповинную вену в воротную и лигатурой в ней фиксируется. Затем катетеризуется нижняя полая вена над печенью для забора оттекающего перфузата.

На первом этапе печень перфузируется раствором Хенкса без кальция при температуре 18÷20 °С в течение 10–15 мин. Такой режим позволяет вымыть внутрипеченочную кровь, которая при необходимости через катетер в нижней полой вене забирается в центрифужные пробирки. Форменные элементы крови при этом могут быть осаждены центрифугированием при 1500 об/мин в течение 2 мин. Осажденные форменные элементы разводят раствором Хенкса в соотношении 1:5 и готовят при необходимости мазки для подсчета в камере Горяева.

На втором этапе в течение 10 мин проводят перфузию бескальциевым раствором Хенкса, содержащем 0,9 мМ ЭДТА. Введение в среду ЭДТА способствует вымыванию легко растворимых солей кальция из межклеточного цемента и некоторому увеличению выхода клеток, что весьма важно, учитывая уникальность материала и его количество. Затем печень иссекают, переносят в лоток, содержащий аналогичный раствор, и несколько раз промывают, после чего измельчают ножницами в чашке Петри с раствором Хенкса и 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой. Такой методический подход (Л.М.Лукьянова и др., 1985) широко используется при получении клеток печени.

Измельченные кусочки ткани процеживают через 3 слоя нейлонового фильтра, оставляют 10–15 мин на холоде, после чего центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок растворяют в среде Хенкса до нужной конечной концентрации. Жизнеспособность клеток печени плода, выделенных описанным способом, составляет не менее 65–70 %, коэффициент стимуляции эндогенного дыхания сукцинатом в такой суспензии — 1,32±0,15 и 1,24±0,10 (24 и 26 недель внутриутробного развития соответственно).

Таким образом, для разрушения межклеточных контактов гепатоцитов в печени плода исследованных сроков достаточно использовать разделительную бескальциевую среду Хенкса с 0,9 мМ комплексона, ЭДТА, а для получения гепатоцитов из печени с выраженным развитием стромальной ткани (трупная печень человека) методических приемов недостаточно. Необходимо, как указывалось выше, использовать гипотермическую консервацию органа, оксигенацию перфузионного раствора, а также дезагрегацию вибрацией (помимо введения в среду комплексона ЭДТА).

Матеріал, захищений авторським правом

Исследования по изучению влияния низких температур на изолированные гепатоциты показали, что они являются выраженными криочувствительными мембранными структурами, а степень их повреждения зависит от возрастных особенностей строения и функционирования печени.

Показано (Н.П.Суббота и др., 1992–1995), что деконсервированные гепатоциты, выделенные из печени плодов человека, новорожденных щенят или поросят, повреждаются в большей мере, чем гепатоциты из печени взрослых трупных доноров или половозрелых животных (табл. 1). Об этом свидетельствуют более низкие показатели жизнеспособности, снижения концентрации АТФ, увеличения концентрации лизосомальных ферментов в межклеточном пространстве.

Нарушение морфофункциональных свойств деконсервированных гепатоцитов плодов более ранних сроков выражены в большей степени. При этом их функциональные параметры после замораживания не всегда коррелируют с показателями жизнеспособности, определенной по исключению красителя ТС. Это некоторое несоответствие между оценкой жизнеспособности по окраске с ТС и функциональными параметрами может свидетельствовать не о сохранении большего количества жизнеспособных клеток, а о более высоком метаболизме клеток, оставшихся неповрежденными. На основании опыта работы можно заключить, что оценка жизнеспособности клеток только по окраске с ТС не может быть адекватным показателем. Адекватным тестом жизнеспособности является контролирование сложного метаболического процесса, требующего согласованности работы ряда систем. Таким параметром, как показано после целого ряда исследований, является способность гепатоцитов включать меченые аминокислоты в суммарные белки (табл. 2).

Таблица 2

Влияние скоростей замораживания и криопротекторов на функциональные параметры гепатоцитов плодов и трупной печени человека (n=7)*

Скорость замораживания, °С/мин, концентрация, вид КП	Гепатоциты кадаверов			Гепатоциты плодов		
	A	B	C	A	B	C
300–400						
10%-й						
глицерин	2,53±0,20	25	32	2,50±0,20	20	28
димексид	2,81±0,15	40	35	2,40±0,10	22	30
1,2-пропандиол	3,22±0,18	20	30	2,60±0,15	18	20
16000–16500						
10%-й						
глицерин	2,20±0,10	42	60	2,31±0,10	54	54
димексид	2,45±0,20	47	62	2,28±0,20	65	65
1,2-пропандиол	3,80±0,16	25	45	2,80±0,10	40	50
16000–16500						
3%-й						
глицерин	2,23±0,15	57	62	2,34±0,14	50	60
димексид	2,01±0,10	60	64	2,30±0,22	60	62
1,2-пропандиол	3,64±0,16	23	40	2,80±0,16	42	48
Двухэтапно						
10%-й						
димексид	2,14±0,14	67	54	2,26±0,10	50	60
глицерин	2,20±0,15	61	52	2,38±0,20	50	58
1,2-пропандиол	4,40±0,24	28	43	3,62±0,12	40	50
Многоэтапно						
10%-й						
димексид	2,12±0,12	65	55	2,84±0,14	52	60

Примечание. * p<0,05 — между контролем и опытом; A — коэффициент стимуляции эндогенного дыхания сукцинатом; B — включение меченых аминокислот, процент от контроля; C — жизнеспособность по исключению ТС, %.

Использование криопротекторов позволяет в случае варьирования скоростей на этапах охлаждения получать после деконсервации клетки с сохранением более высокого уровня жизнеспособности, чем при замораживании в средах без криопротекторов, но с применением комбинированных скоростей. В поисках принципиально новых методических подходов, ранее не использу-

Матеріал, захищений авторським правом

емых в криобиологии при криоконсервировании суспензии гепатоцитов, был разработан метод, позволивший более чем в 3 раза снизить эффективную концентрацию криопротектора (В.Ф.Тарасов и др., 1986). Суть метода заключалась в достижении сверхбыстрого замораживания. Увеличение скорости замораживания до 16000 °С/мин было само по себе эффективно: даже в среде без криопротектора сохранялся такой же уровень включения меченых предшественников, как при скорости 2000 °С/мин в среде с криопротекторами. Присутствие ДМСО или 1,2-пропандиола оказывало выраженный криозащитный эффект в отношении системы синтеза белка в гепатоцитах этого срока развития плодов (83 % интенсивности включения меченых предшественников от контрольных величин). Такие высокие показатели способности деконсервированных гепатоцитов к включению меченых аминокислот в суммарные белки были достигнуты только для гепатоцитов плодов 20–22-х недель развития. В срок 24–25 недель эти показатели составляют 63 % от контроля, т.е. были на 20 % ниже, чем в срок 20–22 недели при аналогичных условиях консервирования.

При замораживании гепатоцитов в присутствии 3%-го глицерина или ДМСО со скоростью 16000 °С/мин уровень эндогенного дыхания гепатоцитов был такой же, как и при замораживании с этой скоростью в среде с 10%-й концентрацией защитных агентов. Присутствие в среде 3%-го 1,2-пропандиола было менее эффективно.

Поскольку в настоящее время увеличение объема суспензии, реально обеспечивающей достижение скорости 16000°С/мин ограничено технически (В.И.Грищенко и др., 1986), мы разрабатывали режимы замораживания, позволяющие консервировать контейнеры с объемом суспензии 10,0–50,0 мл. Было показано, что замораживание контейнеров объемом до 50,0 мл в два этапа и температурной остановке при –60 °С более эффективно, чем при апробировании стандартных одноэтапных режимов. Замораживание в три этапа позволяет клеточной суспензии еще лучше адаптироваться к снижению температуры и в значительной мере сохранить функциональные параметры, определяющие ее клиническое использование (табл. 2).

При двухэтапном (или в три этапа) замораживании в среде с 10%-м ДМСО сохраняется интенсивность включения аминокислот в суммарные белки на уровне 70 % от контрольных величин. Эти показатели лишь немного выше полученных при замораживании суспензии малых объемов в среде с 3%-м криопротектором и скорости замораживания 16000 °С/мин.

Таким образом, используя методический прием, позволяющий значительно увеличить скорость замораживания суспензии, можно снизить концентрацию защитного агента до 3 % и это обеспечит такое сохранение жизнеспособных клеток, как и при введении в среду криопротектора в концентрации 10 %. Это особенно важно при клиническом использовании клеток. Поскольку низкая концентрация протектора не требует отмывания, клетки не подвергаются дополнительной нагрузке при центрифугировании, т. е. этап отмывания не увеличивает количества нежизнеспособных клеток в суспензии.

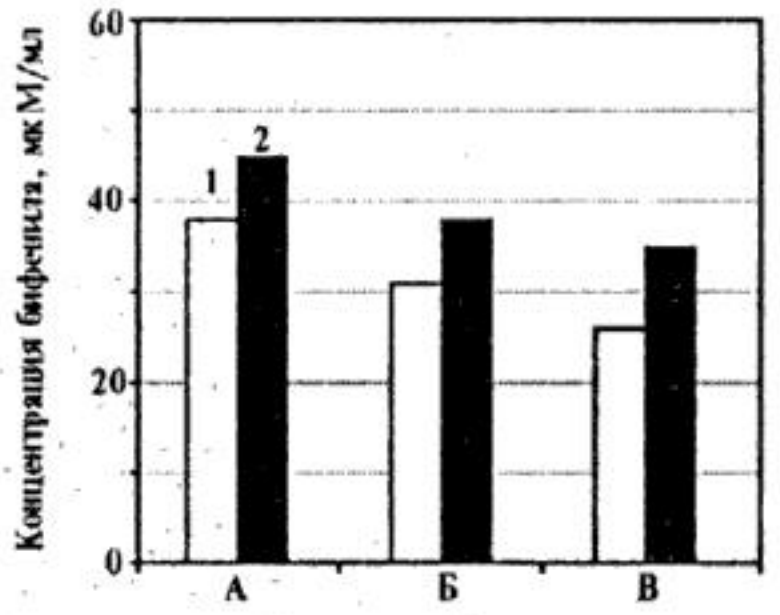


Рис. 3. Захват ксенобиотика из среды деконсервированными гепатоцитами плодов; *1* — человека (24–26 недель развития); *2* — кадаверов; А — контроль, Б — 16500 °С/мин + 3%-й ДМСО, В — двухэтапно+10%-й ДМСО

Показано, что замороженные по двухэтапной программе, в три этапа или сверхбыстро гепатоциты кадаверов сохраняют способность к захвату бифенила на высоком уровне. Захват ксенобиотика в свежеизолированных и декон-

Матеріал, захищений авторським правом

сервированных клетках взрослых доноров (рис. 3) выше, чем в гепатоцитах из печени плодов (в среднем на 15 %). Это зависит, по-видимому, не только от количества жизнеспособных клеток в суспензии, но и от возрастных особенностей функционирования ферментных систем окисления чужеродных соединений (А.И.Арчаков, 1975).

Сохранение в деконсервированных гепатоцитах плодов человека и кадаверов высокого уровня функционирования систем, важных для клинического использования, позволяет применять их в комплексном лечении больных с острой печеночной недостаточностью в ряде клиник стран СНГ как в плановом лечении больных, так и в случае необходимости их транспортировки по санавиации. Гепатоциты используются при этом в качестве компонента биологических диффузионных сред, компонента "биококтейлей", источника сырья для получения цитозольных фракций и криоэкстрактов (Н.П.Суббота и др., 1986–1996).

Анализ эффективности клинического использования гепатоцитов, цитозольных фракций, суспензий и криоэкстрактов печени плодов человека (Ю.Н.Лебедева, Н.П.Суббота, 1994–1996) в комплексном лечении больных с острой печеночной недостаточностью позволяет сделать научно обоснованный прогноз о перспективности этого материала в качестве сырья для создания принципиально нового класса лекарственных соединений на основе криоконсервированных препаратов.

УДК 57.043+61:615.832.9

А.С.Снурников, А.М.Полончук

РАЗРАБОТКА ТЕХНИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПРАКТИЧЕСКОГО ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЕ

Применение низких температур в биологии и медицине вызвало необходимость создания специализированных технических устройств. С этой целью в 1974 году при институте было образовано хозрасчетное опытное производство с конструкторским бюро, в 1981 году преобразованное в специальное конструкторско-технологическое бюро с опытным производством (СКТБ с ОП), которое решает следующие задачи:

1. Создание технической базы для обеспечения экспериментальных исследований, выполняемых научными подразделениями Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

2. Разработка, изготовление и испытание действующих макетов и опытных образцов комплексов оборудования, приборов и медицинских инструментов.

3. Изготовление, внедрение опытных и промышленных образцов в условиях единичного и мелкосерийного производства.

СКТБ с ОП занимается разработкой:

аппаратуры для криоконсервирования (замораживания, длительного хранения, размораживания) различных биоматериалов;

аппаратуры для сублимационной сушки биологических объектов;

технических средств гипотермии;

отдельных технических средств криомедицины;

приборов для научных медицинских и биологических исследований.

Одним из основных направлений является разработка аппаратуры для низкотемпературного консервирования различных биоматериалов. Именно к этому направлению относится большинство опытно-конструкторских работ как по количеству, так и по объему выполненных СКТБ с ОП за годы его существования. Как правило, все выполняемые опытно-конструкторские работы заканчиваются поставкой комплексов, состоящих из замораживателей,

Матеріал, захищений авторським правом

хранилищ, размораживателей, вспомогательных приборов, приспособлений, инструмента. В СКТБ с ОП накоплен значительный опыт по разработке таких комплексов, позволяющий реализовать преемственность технических решений для совершенствования изделий, повысить качество изготовления изделий, а следовательно, их долговечность и надежность в эксплуатации при одновременном снижении себестоимости выпускаемой продукции. В частности, работы по созданию комплекса технических средств для криоконсервирования клеточных культур позволили качественно поднять уровень работы СКТБ с ОП, изготавливать аппаратуру на современном уровне. Комплекс не имеет отечественных и зарубежных аналогов, отличается высокими техническими, эксплуатационными и экономическими характеристиками.

Практически все разработки аппаратуры для криоконсервирования находятся на уровне лучших отечественных и зарубежных образцов, защищены авторскими свидетельствами на изобретения. Только по замораживателям биоматериалов получено более 25 авторских свидетельств.

За годы существования СКТБ с ОП созданы уникальные приборы для научных исследований в области криобиологии и приборы, оборудование для обеспечения технологического процесса криоконсервирования различных биологических объектов. Комплексами для криоконсервирования биообъектов оснащены многие станции переливания крови, госплемзаводы, специализированные клиники и научно-исследовательские институты. Комплексы совершенствуются, а их модификации отвечают требованиям обеспечения процесса охлаждения конкретного биологического объекта.

Все комплексы для криоконсервирования имеют программный блок, позволяющий в автоматическом режиме реализовать заранее заданную программу скоростей и температур охлаждения биообъектов, камеру охлаждения, в которой размещаются контейнеры с биообъектом, и систему охлаждения (подачи хладоагента).

С 1978 года опытное производство изготавливало универсальные замораживатели, позволяющие реализовать практически любую программу охлаждения в широком диапазоне скоростей изменения температур. Опыт эксплуатации этих замораживателей показал явное несоответствие аппаратуры поставленным задачам: полностью автоматический цикл охлаждения прерывается на самом ответственном этапе ведения технологического процесса вмешательством оператора для ручного инициирования кристаллизации раствора криопротектора. Кроме того, для столь малого объема замораживаемого материала габариты аппаратуры и ее стоимость были несоразмерно завышены, а расход азота недопустимо велик.

Сравнительный анализ данного типа замораживателя с информационными материалами и патентными описаниями замораживателей ведущих зарубежных фирм показал, что они весьма схожи. Поэтому следующие замораживатели изготавливались по общепринятой схеме, содержащей камеру для размещения пайет или ампул, систему снабжения хладоагентов, предназначенную для подачи жидкого азота в камеру в количестве, необходимом для ведения заданной программы охлаждения, и регулятор, обеспечивающий контроль и изменение температуры в камере путем управления скоростью подачи азота.

Анализ отдельных недостатков, свойственных этим замораживателям, заставил искать новые подходы к созданию дешевого и надежного в эксплуатации замораживателя.

Камера охлаждения, в которой размещены объекты криоконсервирования и датчики температуры, представляет собой теплоизолированную емкость, внутренняя полость которой организована таким образом, чтобы все упаковки с биообъектами в защитной среде и датчик температуры находились в одинаковых условиях, что достигается симметричным построением внутрен-

Матеріал, захищений авторським правом

ней полости и интенсивным перемешиванием распыленного жидкого азота при помощи вентилятора, приводимого в действие электродвигателем с достаточно высокой скоростью вращения.

Понижение температуры и ее стабилизация по заданным программам осуществляются подачей в камеру жидкого азота от системы снабжения хладоагентом, состоящей из сосуда Дьюара, сообщающегося с камерой охлаждения азотным шлангом через регулируемый вентиль или клапан. Для обеспечения подачи азота по заданной программе сосуд Дьюара должен быть закрыт герметично, а внутри него создано избыточное давление, например, за счет испарения части жидкого азота. Дозирование азота осуществляется регулируемым вентилем или клапаном, управляющим соответствующими сигналами, поступающими из блока управления на основании информации о текущем значении температуры в контрольной точке — месте установки датчика температуры. Характерной особенностью такого замораживателя, которую при определенных условиях можно отнести к недостаткам, является наличие подвижных частей в зоне прохождения жидкого или газообразного азота или в непосредственной близости от этой зоны. 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 электрических 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 широкомасштабного внедрения на станциях трансплантации эмбрионов.

Методика низкотемпературной консервации эмбрионов млекопитающих имеет существенные отличия от методик криоконсервации других объектов.

Анализ различных конструкций оборудования для консервации эмбрионов показывает, что все они относятся к устройствам, в которых реализуется однотипная технология низкотемпературного консервирования суспензий вместе с криопротектором, упакованным в контейнеры-пайеты или ампулы и помещенным в камере замораживания. Различное оборудование отличается в основном камерами, в которых осуществляется программное замораживание малого объема биоматериала — до 10 мл за один цикл. Несложные расчеты показывают, что для охлаждения (от 20 до −30 °С) такого объема криопротектора необходимо затратить около полутора килокалорий холода, что при эффективном использовании хладоагента привело бы к расходованию примерно 25 г жидкого азота. Его расход в разных замораживателях для реализации программ составляет более килограмма. Вывод очевиден — подавляющая часть хладоагента используется на компенсацию теплопритоков из окружающей среды через поверхности камеры, шланга и системы снабжения хладоагентом. Возникла необходимость совместить камеру охлаждения с системой снабжения хладоагентом, разместив укладку с ампулами или пайетами непосредственно в горловине сосуда Дьюара, при этом целесообразнее использовать газообразную фазу азота.

Отсутствие интенсивного теплообмена было компенсировано размещением ампул или пайет в укладке, изготовленной из материала с высокой теплопроводностью, что обеспечило достаточную для практических целей идентичность условий для каждого замораживаемого эмбриона.

Характерной особенностью устройства для замораживания эмбрионов является также необходимость искусственного инициирования кристаллизации раствора криопротекторов, чтобы избежать гибели биообъектов.

Матеріал, захищений авторським правом

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, в 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, исключается ошибка оператора при наборе программы в регуляторе, и процесс замораживания становится полностью автоматическим.

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

К основным преимуществам разработанной аппаратуры следует отнести: полностью автоматический режим замораживания по программам, жестко фиксированным в регуляторе, исключающий воздействие оператора на результаты замораживания; автоматическое прохождение кристаллизации в щадящем для эмбриона режиме — без переохлаждения и отогрева — независимо от теплофизических свойств криопротектора; отсутствие подвижных частей (двигателей, клапанов, реле давления и т.п.), что приводит к технологичности, долговечности и высокой надежности замораживателя; отсутствие в открытом сосуде Дьюара избыточного давления в процессе работы, что гарантирует безопасную работу обслуживающего персонала без использования специальных мер; упрощение схемы регулятора из-за отсутствия силовых элементов управления электродвигателями, клапанами, вентилями, а также контура стабилизации давления в сосуде Дьюара.

Низкий расход жидкого азота (400 г на одну программу) позволяет без дозаправки провести в течение месяца 15–20 циклов замораживания эмбрионов. С 1988 года изготовлено более 200 замораживателей эмбрионов, которые в основном по разнарядкам ВНПО по племенному делу в животноводстве и НПС "Плембиосистема" поставлялись в специализированные институты и хозяйства.

На базе упомянутых устройств разработаны замораживатели роговицы глаза, щитовидной железы, спермы рыб, птиц, человека. Методы криостабилизации биоструктур используются при структурно-химическом анализе клеток и тканей животных и растений. Большое разнообразие физико-химических характеристик объектов требует сложных, многоступенчатых процедур подготовки замороженного биоматериала к анализам, для чего необходимы специальное оборудование и технологические линии, обеспечивающие программное замораживание и хранение замороженных биоматериалов, криотомирование и сохранение срезов криостабилизированных структур, сублимацию (лиофилизацию) и хранение высушенных образцов.

Одним из возможных этапов обработки криостабилизированного биоматериала является сублимационное высушивание, которое обеспечивает хорошую сохранность тонкой структуры ткани и клеток, фиксированной глубоким замораживанием, предупреждает появление артефактов, связанных с процессами оттаивания (разрывы клеточных мембран, смещение легкорастворимых соединений с мест их прижизненной локализации и др.). Сублимационное высушивание биообъектов используется в гистохимических исследованиях, при изучении низкомолекулярных органических и неорганических веществ, при радиоавтографическом анализе, цитофотометрии в видимом и ультрафиолетовом свете, в рентгеновской гистоспектрографии, электронной микроскопии.

В СКТБ с ОП ведутся работы по созданию лабораторных и полупромышленных установок для сублимационного высушивания различных биомате-

Матеріал, захищений авторським правом

риалов малых объемов с использованием жидкого азота, элементов Пельтье и холодильных агрегатов.

Разработан комплекс оборудования для криостабилизации биоструктур, в который входит установка сублимационной сушки (УСС-1). Установка предназначена для сублимационного высушивания объектов, требующих малых теплозатрат, криотомных срезов животных и растительных тканей, небольших кусочков тканей для гистологических и электронно-микроскопических исследований, культур тканей.

В вакуумной камере установки расположены рабочий стол для размещения образцов и десублиматор, охлаждаемые и нагреваемые термобатареями из элементов Пельтье.

В установке автоматически поддерживается заданная температура рабочего стола в диапазоне — 60÷40 °С. Температура десублиматора –60 °С.

В установке контролируются электрические параметры, температура стола и десублиматора, давление в камере. Имеется выход на самопишущий прибор для записи температуры рабочего стола на диаграммной ленте. Достоинства УСС-1: отсутствие в вакуумной камере химических агрессивных сред, которые используются в известных установках; низкая температура десублиматора и терморегулируемый рабочий стол, позволяющий для каждого объекта подбирать оптимальный режим сушки в широком диапазоне температур; укладка с перфорированной крышкой в специальные контейнеры, исключающие оттаивание замороженных срезов при манипуляциях и не позволяющие им разлетаться в камере в процессе сушки.

Для замораживания-высушивания жидких и пастообразных биобъектов, расфасованных в стеклянные флаконы, ампулы и металлические противни, определения оптимальных режимов сублимационного консервирования и выпуска сухих препаратов в условиях лабораторий и опытных производств медико-биологического профиля, в фармацевтической и пищевой промышленности разработана установка УЗВ-9.

Установка состоит из камеры замораживания-высушивания, системы охлаждения-отогрева, вакуумной системы, блока контроля и управления, системы снабжения хладоагентом. Расположенные в камере полки охлаждаются и отогреваются циркуляцией рабочей жидкости. Вакуумная система обеспечивает откачку конденсирующихся и неконденсирующихся газов. Десублиматор вынесен из камеры, охлаждающейся жидким азотом. Вакуумные клапаны обеспечивают отсечение камеры от десублиматора и десублиматора от вакуумного насоса.

Основные характеристики УЗВ-9:

Количество влаги, удаляемой за цикл, кг	не более 3,0
Температурный диапазон полок, °С	40÷ –70
Скорость охлаждения полок, °С/мин	0,5...3
Температура десублиматора, °С	–196
Рабочая поверхность полок, мм	250×250
Количество рабочих полок в камере, шт.	3÷ 5
Потребляемая мощность, кВт	3

Азотный десублиматор установки УЗВ-9 позволяет провести сублимационное высушивание биобъектов с очень низкими эвтектическими температурами.

Для мелкосерийного производства лиофилизированных препаратов разработана сублимационная установка УЗВ-10 без применения жидкого азота с большей производительностью, чем установка УЗВ-9.

В вакуумной камере УЗВ-10 расположены подвижные терморегулируемые полки, охлаждаемые и нагреваемые циркулирующей в них рабочей жидкостью. Десублиматор вынесен из камеры и отсекается от нее и вакуумного насоса с помощью вакуумных клапанов. Предусмотрен принудительный ото-

Матеріал, захищений авторським правом

грев десублиматора после окончания процесса сушки. Охлаждения сублиматора и рабочей жидкости производится двухступенчатым герметичным холодильным агрегатом с воздушным охлаждением. Блок управления обеспечивает автоматическую стабилизацию температуры полок и контроль давления в камере.

Основные характеристики УЗВ-10:

Количество влаги, удаляемой за цикл, кг	10
Количество полок, шт.	3÷ 4
Рабочая температура полок, °С	–30...+40
Рабочая поверхность полок, мм	420×420
Температура десублиматора, °С	–45

Все большее применение находит метод охлаждения организма для лечения заболеваний с помощью гипотермии. Важнейшей задачей реализации этого метода является умение управлять процессами охлаждения и согревания живого организма и отдельных его участков, определять необходимые режимы, при которых живой организм имел бы наибольшую толерантность к охлаждению и согреванию. При этом требуется осуществлять определенные режимы, изменять температуру поверхности тела с заданной скоростью, поддерживать температуру в заданных интервалах при одновременном воздействии СВЧ нагрева на этот участок в необходимых интервалах времени и т.п. Известны устройства для охлаждения и согревания живого организма, содержащие ряд охлаждающих устройств в зависимости от участка тела,систему управления, систему измерения и индикации, однако большинство этих устройств не обеспечивают программного подвода хладоносителя в охлаждающие устройства для охлаждения живого организма.

В СКТБ с ОП разработан ряд охлаждающих гипотермических устройств, применяемых в медицине. Три из них защищены авторскими свидетельствами на изобретения.

Охлаждающие устройства могут быть применены при краниоцеребральной гипотермии, для локального охлаждения различных участков тела живого организма, для лечения экстремальных состояний организма, а также как вспомогательный метод в хирургии, онкологии, гинекологии, неврологии и других областях медицины.

В результате автоматизации процесса охлаждения и подвода хладоносителя по заданной программе может быть достигнут высокий уровень чувствительности организма к охлаждению, что невозможно достигнуть с помощью других существующих отечественных установок.

На аппарате типа АУГ-1 проведены с положительными результатами медицинские испытания в ВОНЦ МЗ СССР, 18-й детской больнице (г. Москва), 7-й городской детской больнице (г. Харьков), в родильном отделении 1-й городской больницы (г. Харьков), НИИ ортопедии и травматологии (г. Харьков), городской больнице (г. Сватово).

Основные характеристики аппарата АУГ-1:

Температура хладоносителя , °С	–20
Интервал скоростей охлаждения, °С/мин (с дискретностью через 1 °С/мин)	от 1 до 10
Интервал рабочих температур, °С	от 37 до –10

Проверены безазотные варианты гипотермических установок, предназначенных для широкомасштабного внедрения в медицинскую практику.

В СКТБ с ОП накоплен определенный опыт по разработке технических средств криомедицины. Криоэлектрокоагуляторы КЭК-1 предназначены для холодового воздействия и электрокоагуляции патологических образований в желудке и двенадцатиперстной кишке (полипы и др.), половых органах.

Традиционными для СКТБ с ОП являются разработки приборов для научных исследований биологического и медицинского направления. Разработа-

Матеріал, захищений авторським правом

ны и внедрены в производство на Сумском заводе электронных микроскопов устройство связи электронного микроскопа с ЭВМ "Растр", устройство для ввода графической информации "Контур".

Разработаны контейнеры многоразового использования объемом от 1 до 500 мл для замораживания и хранения суспензий биоматериалов в среде жидкого и газообразного азота; кассеты и укладки различной конструкции, обеспечивающие упорядоченное размещение контейнеров в низкотемпературных хранилищах; переносные сосуды Дьюара объемом до 10 л и системы снабжения жидким и газообразным хладоагентом на сосудах Дьюара от 34 до 100 л, обеспечивающие ручной и автоматический режимы подачи хладоагента.

В настоящее время в биологии и медицине значительный интерес представляют исследования температуры в биообъектах, подвергающихся гипотермии или замораживанию, и динамики температурного поля при криовоздействии с целью изучения свойств биообъектов и контроля режима криовоздействия. Комплексное решение задач требует применения многоточечной методики измерения температуры, а также разности температур между двумя любыми точками с высокой разрешающей способностью и точной локализацией места измерения как на поверхности, так и внутри объекта с минимальным искажением температурного поля в месте измерения. Для этих целей разработаны восьмиканальные электронные термометры с поликристаллическими терморезисторами в качестве первичного термопреобразователя датчиков.

Приборы воспринимают сопротивление терморезистора в определенном диапазоне его изменения, что соответствует диапазону измеряемых температур −50÷50 °С, выбранному базовым как наиболее широко применяемому в биологии и медицине.

Однако использование свойств перепрограммируемости прибора позволяет реализовать более широкий диапазон измеряемых температур. Для этого достаточно выбрать терморезистор с таким сопротивлением R при температуре T_0, чтобы в диапазоне измеряемых сопротивлений этого терморезистора температура соответствовала требуемому диапазону (например, −100÷0 или 0÷100 °С).

СКТБ с ОП разработало также нетрадиционное для себя оборудование с использованием холода: две модификации фризеров "Эльбрус" и "Эльбрус 2М" для эффективного и быстрого приготовления мягкого мороженого производительностью 20 и 5 кг/ч, молокоохладитель МО-1 объемом 300 л для охлаждения молока до 7 °С.

СКТБ с ОП систематически осуществляет подконтрольную эксплуатацию всего изготавливаемого им оборудования, направленную на постоянное совершенствование уровня разработок.

Таким образом, институт создал экспериментальный и прикладной базис для дальнейшего всестороннего изучения действия холода на сложные биологические объекты, что открывает большие перспективы для биологии и особенно медицины.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК [591.3+611.013]: 57.086.13+57.043

В.И.Грищенко, Н.А.Лучко

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОБЛЕМЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Проведен комплекс фундаментальных исследований механизмов криоповреждения и криозащиты репродуктивных клеток, эмбрионов и эмбриональных клеток животных и человека, включая развитие нового направления в криорепродуктологии — использование сверхвысоких скоростей охлаждения репродуктивных клеток в сочетании с композиционными криоконсервантами. Разработаны методы криоконсервирования репродуктивных клеток для клинического применения.

Основным направлением научной деятельности отдела криобиологии систем репродукции, образованного в 1983 году, было изучение механизмов криоповреждения и криозащиты репродуктивных клеток, эмбрионов и эмбриональных клеток животных и человека, поиск путей повышения биологической активности спермиев при различных видах патоспермии и пролонгации жизнеспособности изучаемых клеток с помощью низких температур, освоение и внедрение метода экстракорпорального оплодотворения в работу клиники.

На основе полученных фундаментальных данных разработаны методы криоконсервирования и гипотермического хранения репродуктивных клеток, позволившие организовать их криобанки для клинических и экспериментальных целей.

В результате комплекса исследований действия сверхвысоких скоростей охлаждения, а также химических факторов криозащиты на спермии и эмбрионы установлены закономерности влияния указанных факторов на сохранность этих клеток при переводе их в состояние глубокого холодового анабиоза [1].

На основании собственных фундаментальных данных создана концепция сверхбыстрого охлаждения репродуктивных клеток в среде многокомпонентного криоконсерванта. В соответствии с ее основными положениями при переводе спермы и эмбрионов в состояние глубокого холодового анабиоза максимально снижается отрицательное влияние характерных физико-химических факторов, которые реализуются в процессе замораживания-отогрева и обусловливают повреждение эндоцеллюлярных структур и мембранного аппарата. Впервые отмечено, что криозащита репродуктивных клеток определяется сочетанием оптимальных скорости охлаждения и содержания в среде эндоцеллюлярных криопротекторов в низкой концентрации.

Криозащитное действие сверхвысоких скоростей охлаждения репродуктивных клеток и эмбрионов связано с оптимальным дегидратационным эффектом, являющимся необходимой предпосылкой предупреждения развития эндоцеллюлярной, летальной для клеток, кристаллизации, обусловлено как коллигативными свойствами криоконсерванта, направленными на нейтрализацию "эффекта раствора", возникающего в этих условиях, так и мембраностабилизирующим действием компонентов криоконсерванта для поддержания нативных свойств мембраны в процессе дегидратации клеток. В связи с морфофункциональными особенностями репродуктивных клеток максимальная сохранность каждого их вида достигается оптимальным сочетанием температурного режима, имеющего широкий интервал, с узким концентрационным диапазоном.

Матеріал, захищений авторським правом

Существенную роль в обеспечении высокого криозащитного эффекта многокомпонентного криоконсерванта при криоконсервировании спермы играет включение в его состав эндоцеллюлярного компонента, а при криоконсервировании эмбрионов — трех эндоцеллюлярных криопротекторов в низких концентрациях, которые способны на коллигативной основе выполнять функцию противосолевого буфера при кратковременном нарастании в криобиологической системе гиперконцентрации солей, вызванном дегидратационным действием сверхбыстрого охлаждения.

Большое значение для повышения криоустойчивости репродуктивных клеток в процессе их замораживания-оттаивания имеет включение в среду криоконсервирования мембраностабилизирующих компонентов из группы холинов. Криопротекторное действие холина-хлорида реализуется на фоне классических криопротекторов, при этом, по-видимому, осуществляется его взаимодействие с липопротеидными комплексами мембраны посредством обмена связанной воды, что, надо полагать, уменьшает механические напряжения в мембране, возникающие при криовоздействии, и сглаживает структурные перестройки липид-липидных и липид-белковых комплексов, способствуя сохранению барьерных свойств мембраны. Как было установлено в отделе криопротекторов важным свойством криозащитных соединений являются параметры гидрофильно-липофильного баланса молекул [4]. Нами найдено, что максимум защитных свойств молекул алкилзамещенных глицерина в отношении репродуктивных клеток лежит в интервале гидрофильно-липофильного баланса lg P=–2,39, свойственного глицерину до lg P=–1,39, что характерно для его монометилового производного. Криозащитные свойства этих соединений не имеют достоверных различий. Дальнейшее падение гидрофильности в ряду соединений 1-МЭЭГ и 1,3-ДМЭГ приводит к снижению криопротекторных свойств указанных алкилзамещенных глицерина, связанному, надо полагать, с падением коллигативных свойств этих соединений и усилением их гидрофобного взаимодействия с компонентами мембраны. Это выражается как в интегральном снижении криозащиты, так и в повреждении процессом замораживания-оттаивания цитоплазматической мембраны и ее гидрофильного акросомального образования, что вызывает достоверное падение активности акрозина. Это связано, очевидно, с формированием в акросоме дефектных зон и элиминацией акрозина во внешнюю среду. При сверхбыстром охлаждении спермиев в среде глицерина активность акрозина не имела отличий от контроля.

В условиях сверхбыстрого охлаждения спермиев в среде глицерина и его метильного производного не происходит нарушения их цитоплазматической мембраны, о чем свидетельствует активность цитозольного фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). При включении в среду замораживания 1-МЭЭГ снижается активность ферментативного белка в спермиях, что обусловлено элиминацией его из клеток во внешнюю среду в силу нарушения целостности их мембраны, а также частичной инактивацией Г6ФДГ. Это может быть связано со значительной потерей криопротектором коллигативных свойств, что, по-видимому, за счет "эффекта раствора" приведет к инактивации ферментативного белка.

Важным является установленный факт, что степень морфологических изменений спермиев при их сверхбыстром охлаждении не соответствует глубине функциональных нарушений. Так, снижение активности акрозина в гаметах после криоконсервирования в условиях сверхбыстрого охлаждения в среде 1-МЭЭГ на 15,7 % соответствует падению их выживаемости на 30 %. Поскольку допустимое падение содержания акрозина в спермиях, не отражающееся негативно на их оплодотворяющихся свойствах, не должно превышать 30 %, гаметы, криоконсервированные под защитой 1-МЭЭГ, несмотря на значительное падение их выживаемости, могут быть рекомендованы для дальней-

Матеріал, захищений авторським правом

шего изучения возможности использования этих соединений в клинических целях.

Изучение компонентов адениловой системы показало, что именно в энергетическом обмене спермиев прежде всего возникают нарушения. Так, при олигоспермии несколько снижается энергетический заряд и увеличивается фракция АМФ ($p<0,05$), в то время как другие биохимические параметры достоверно не изменяются [3]. Прослеживается тесная зависимость величины энергетического заряда и соотношения фракций аденозинфосфатов от степени астении в сперме. Компоненты адениловой кислоты четко реагируют даже на незначительное снижение активной подвижности спермиев. Так, олигоспермия приводит к снижению активной подвижности всего на 10 % от нижней границы нормы. В нормальной сперме после криоконсервирования она снижалась на 17 % по сравнению с нативной, что с увеличением АМФ привело к достоверному уменьшению АТФ и АДФ. При дальнейшем понижении активной подвижности спермиев почти прямая связь ее с содержанием АТФ нарушается. Снижение содержания становится менее выраженным по сравнению с уменьшением подвижности спермиев.

При астеноспермии активная подвижность спермиев уменьшается практически вдвое по сравнению с нормой, тогда как содержание АТФ — всего на 20 % при существенном снижении фракции АДФ и повышении фракции АМФ, которая становится почти равной АДФ. Энергетический заряд также достоверно снижается. Несоответствие понижения подвижности спермиев и содержания АТФ происходит, по-видимому, за счет наличия слабоподвижных клеток, которые содержат какое-то количество АТФ, что и повышает общее ее содержание. Полученные данные могут быть использованы как диагностические показатели, в частности, содержание ДНК в сперме человека при патологии может являться тестом функциональной способности спермиев. Дополнительным тестом может быть определение отношения РНК-ДНК.

Значительным научным направлением в исследованиях действия сверхвысоких скоростей охлаждения и состава криоконсерванта на репродуктивные клетки является изучение влияния указанных факторов на биосинтез нуклеиновых кислот и белка.

Установлено, что криоконсервирование эмбрионов в условиях сверхвысоких скоростей охлаждения не отражается на содержании ДНК, однако стимулирует биосинтез РНК и белка. Адаптация эмбрионов к низким положительным температурам в течение часа, предшествовавшая криоконсервированию, способствовала нормализации РНК и белка, уровень которого не достигал нормы. Культивирование размороженных эмбрионов в течение часа оказывало нормализующее влияние на биосинтез РНК, подобно адаптации, и приводило к полной нормализации биосинтеза белка. Нормализующее влияние культивирования на биосинтез белка ограничено 25–40 мин эквилибрирования эмбрионов в криоконсерванте при 22 °С. Удлинение этого периода на 90 мин не привело в результате культивирования к достоверному по сравнению с контролем падению биосинтеза белка, вызванного криовоздействием.

Результаты апробации морфофункциональной сохранности эмбрионов, перенесших сверхбыстрое охлаждение, получены путем их хирургической трансплантации мышам-реципиенткам. При этом отличий от контроля по показателям приживляемости и получения потомства не было. Спермии, криоконсервированные в этих же условиях, по своей оплодотворяющей способности не отличались от нативных гамет.

Важность исследования некоторых особенностей механизма криозащиты репродуктивных клеток состоит в том, что этот цикл работ позволил разработать способы их криоконсервирования, по своей эффективности и простоте реализации не имеющие аналогов в мировой науке и практике, запатентованные в нашей стране и за рубежом.

Матеріал, захищений авторським правом

Интересные результаты исследований получены при изучении чувствительности ооцитов свиней и скорости охлаждения в зоне положительных температур, которые позволили рекомендовать начальный отбор клеток, включающий при необходимости использование незрелых ооцитов, их дозревание *in vitro* и скорость охлаждения, не превышающую 10 °С/мин. Предложен способ расчета осмотических параметров единичной яйцеклетки, существенно повышающий точность коэффициентов проницаемости для воды, что важно для прогноза криоустойчивости ооцитов и оптимизации программ их замораживания.

Учитывая, что диагностика иммунологического бесплодия предполагает исследование сыворотки крови, секретов репродуктивного тракта в динамике, а также то обстоятельство, что все образцы диагностического материала от одной пациентки или пациента необходимо исследовать в одинаковых условиях эксперимента, т.е. они должны иметь "парные пробы", в отделе разработан метод низкотемпературного хранения указанного выше биоматериала после замораживания без применения криопротектора.

Оптимальным методом для консервации сывороток оказался двухэтапный, обеспечивающий сохранение биологической полноценности сывороток по меньшей мере в течение года, поскольку за это время не наблюдается существенного снижения уровня иммуноглобулинов и антиспермальных антител в образцах. Криоконсервирование цервикальной слизи производили по методике, включающей охлаждение от 24 до −70 °С со скоростью 5–10 °С/мин с последующим погружением ее в жидкий азот.

Разработанные методы низкотемпературного консервирования диагностического материала существенно расширяют возможности и качество диагностики иммунологического бесплодия, а также его терапии.

Важное место в исследованиях отдела занимают работы по гипотермическому хранению гамет и эмбрионов.

Эксперименты показали, что 6–8-клеточные эмбрионы, хранившиеся при 10 °С, в 61,3 % случаев морфологически и по развитию *in vitro* не отличались от нативных [7]. Всестороннее исследование роли температурных условий и свойств среды гипотермического хранения репродуктивных клеток позволило установить, что спермии человека, суспендированные в доступных солевых забуференных средах и охлажденные со скоростью 0,1 °С/мин до 8–10 °С/мин сохраняют подвижность, целость акросомы и активность акрозина, эндогенное дыхание, активность сукцинат-дегидрогеназы, переживаемость 48 ч. В течение такого же срока не снижается оплодотворяющая способность гамет, о чем свидетельствует успешное применение их в методике вспомогательной репродуктивной технологии — искусственной инсеминации спермой мужа при иммунологическом бесплодии и бесплодии неясного генеза. Спермии, хранившиеся при околонулевых температурах, пригодны для постановки диагностического теста контакта спермы с цервикальной слизью. Особое значение для успешного использования репродуктивных клеток человека, хранившихся в условиях гипотермии, имеет повышение их жизнеспособности с помощью физических и химических факторов воздействия.

Показана возможность удлинения срока гипотермического хранения суспензии спермиев человека при применении питательной среды, предварительно выдержанной в искусственном дополнительном постоянном магнитном поле. В частности, если среду Эрла выдержать в постоянном магнитном поле напряженностью 0,5–45 миллиТесла в течение 4–18 ч, то ее можно использовать для выделения подвижной фракции спермиев из эякулята человека, а также для хранения выделенных клеток при 8–10 °С в атмосфере 5%-го CO_2 при нормо- и олигоспермии. При этом морфофункциональные показатели остаются на исходном уровне весь срок наблюдения (3 сут) [6]. Установлено, что при астено- и олигоастеноспермии эти показатели изменяются на сут-

Матеріал, захищений авторським правом

ки позже, чем в исследованиях с питательной средой, не подвергавшейся воздействию дополнительного постоянного магнитного поля. Режим гипотермического хранения мужских половых клеток человека с указанной модификацией расширяет возможности фракции подвижных спермиев эякулята при лечении бесплодия методами искусственной инсеминации *in vitro* и *in vivo*, а также позволяет обеспечить непрерывность диагностической иммунологической работы в репродуктологии, так как материал одного эякулята с нормоспермией можно использовать в течение 3 рабочих дней как в качественных (тест контакта спермы с цервикальной слизью), так и в количественных (реакция агглютинации) иммунологических тестах. Использование комплексного подхода в оценке морфологических, функциональных и некоторых биохимических свойств спермиев, находящихся в условиях гипотермии, позволило выбрать приемлемые условия и продлить срок хранения их до 72 ч. Этому способствовал предварительный выбор среды, разработка скорости охлаждения и подбор режима хранения.

Наряду с магнитным полем исследовано влияние лазерного излучения на морфофункциональные свойства спермиев человека. Определены интенсивность низкоинтенсивного гелий-неонового лазерного излучения и время облучения спермиев, при которых осуществляется стимулирующее воздействие на них, выражающееся в повышении кинетики как нативных, так и перенесших глубокое замораживание гамет. Характерно, что эффективность стимулирующего действия лазерного облучения на спермии зависит от степени олигоастеноспермии и максимально выражена при астеноспермии средней интенсивности и минимальна — при нормоспермии. Одним из механизмов повышения функциональной активности спермиев является стимуляция под воздействием лазерного излучения пероксидазной активности каталазы и скорости эндогенного дыхания. Исследованиями установлено, что лазерное облучение ооцитов увеличивает число зрелых клеток, завершивших свое развитие, и понижает в них уровень хромосомных аберраций. Указанный комплекс исследований позволил рекомендовать гелий-неоновое лазерное облучение как фактор реабилитации гамет человека после их замораживания-отогрева.

Существенным этапом работ отдела явилось исследование устойчивости ооцитов к низким температурам при различном гормональном профиле женщин [2]. Установлено, что зрелые преовуляторные яйцеклетки характеризуются более выраженной криоустойчивостью по сравнению с незрелыми недифференцированными формами. Криорезистентность ооцитов коррелирует с гормональным профилем пациенток. Наиболее устойчивы к действию низких температур ооциты, полученные у женщин с нормальным преовуляторным гормональным фоном. Ооциты, аспирированные у пациенток с миомой матки, по сравнению с ооцитами у женщин с нормальным преовуляторным гормональным фоном, не обладали измененной криочувствительностью в сравнении с такими клетками, полученными у женщин с трубным бесплодием, что позволяет использовать эти яйцеклетки при постановке криобиологического эксперимента с ооцитами человека и, возможно, для оводонации.

Проблемы влияния замораживания-отогрева на генетический аппарат эмбрионов обусловили проведение комплекса исследований, при выполнении которых установлены закономерности, имеющие большое теоретическое и прикладное значение. В частности, установлена взаимосвязь между частотой возникновения патологических митозов, хромосомных аберраций и эмбриональной смертностью эмбрионов мышей, трансплантированных реципиентам после деконсервации клеток. Следовательно, при оценке сохранности деконсервированных эмбрионов необходимо применять комплексный подход, включающий наряду с морфофункциональными способами их оценки цитогенетические методы. Эти методы позволили установить, что степень повреждения генетического аппарата эмбрионов мышей в наименьшей степени выра-

Матеріал, захищений авторським правом

жена при добавлении к ним растворов ДМСО и глицерина при 0–10 °С. Напротив, эквилибрация эмбрионов на стадии морулы при 37 °С в 3 М растворе ДМСО приводит к снижению митотического индекса накопления метафаз, увеличению числа дегенеративных клеток с пикнотическими ядрами, повышению случаев проявления патологии митоза [8]. Таким образом, проведенные исследования показали, что криопротекторы и сам процесс охлаждения-отогрева могут приводить к патоморфологическим и цитогенетическим нарушениям в клеточных структурах эмбрионов мышей. Это выражается в снижении пролиферативной активности, патологии митозов и выраженном пикнозе ядер некоторых клеток, что следует учитывать при помещении данного вида клеток на хранение в криобанк.

Проводились исследования по размораживанию репродуктивных клеток. Показано, что применение ультразвуковых волн малой интенсивности на этапах отогрева криоконсервированной спермы увеличивает морфофункциональную сохранность сперматозоидов. Такое же действие оказывают электромагнитные волны СВЧ. Причем СВЧ-отогрев спермы целесообразно применять после предварительного переноса образца в низкотемпературную баню, жидкость которой имеет такие же диэлектрические свойства, как и сперма. Импульсные режимы СВЧ-облучения при отогреве повышают, по сравнению с непрерывным облучением, сохранность криоконсервированных сперматозоидов.

Основное внедрение и совершенствование программы экстракорпорального оплодотворения у человека потребовало проведения ряда исследований, в которых важное значение имели разработки условий использования как нативных, так и перенесших гипотермическое хранение при криоконсервировании спермиев и ооцитов.

Предложенная отделом научно-техническая программа “Разработка метода экстракорпорального оплодотворения при бесплодии, применение низких температур для решения этой проблемы” включена в комплекс научно-технических программ Украины по проблеме “Здоровье человека”. Проведен комплекс исследований, на основе которого создана технология применения при экстракорпоральном оплодотворении и переносе зигот и гамет в маточные трубы, спермиев, хранившихся в условиях гипотермии и в жидком азоте. Разработаны научно-правовые основы организации криобанков эмбрионов человека и технология применения их в программе экстракорпорального оплодотворения. Кроме того, ведутся работы по созданию метода селекции пола, технологии его применения при лечении бесплодия, а также криобанка спермиев для профилактики наследственных заболеваний, связанных с полом.

Для внедрения разработок отдела в области экстракорпорального оплодотворения, криоконсервирования гамет и эмбрионов, инсеминации спермой мужа и донора, создано акционерное общество “Имплант”.

Существенную научную новизну представляют полученные данные о зависимости степени чувствительности первичных половых клеток, ранних зародышей человека к низкотемпературному воздействию от характера их взаимосвязей с соматическими клетками гонады. По мере установления более тесных взаимосвязей с микроокружением устойчивость гоноцитов возрастает [5].

Высокоэффективные и экономичные способы сверхбыстрого замораживания спермы и эмбрионов человека запатентованы в США, Англии, Франции, Германии и Японии. Это позволило осуществить широкомасштабное внедрение способа криоконсервирования спермы человека в лечебную практику и решить проблему обеспечения клинической медицины генетическим биоматериалом. Так, на базе Харьковского акушерско-гинекологического центра создан и успешно функционирует криобанк донорской спермы, содержащий 20 тысяч спермадоз материала.

Матеріал, захищений авторським правом

Аналогичные банки созданы сотрудниками отдела в других Центрах планирования семьи и репродукции в Украине и других странах СНГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А.* Сверхбыстрые скорости охлаждения и витрифицирующие растворы в криобиологии // Пробл. криобиологии. – 1993. – № 3. – С. 3–13.
2. *Грищенко В.И., Луцкая Л.И., Дахно Ф.В.* Криоконсервирование ооцитов и эмбрионов // Пробл. криобиологии. – 1992. – № 3. – С. 43–49.
3. *Грищенко В.И., Паращук Ю.С., Смаглий Н.Ю. и др.* Биохимические свойства нативных и криоконсервированных спермиев человека // Патологические аспекты действия холода: Сб. науч. тр. – Харьков, 1989. – С. 32–36.
4. *Луговой В.И., Шраго М.И.* Современные аспекты проблемы поиска и создания криопротекторов: Сб. науч. тр. – Харьков, 1992. – С. 67–78.
5. *Пиняев В.И., Бриндак О.И., Куракса В.М.* Сравнительная оценка результатов криоконсервирования первичных половых клеток ранних зародышей человека, замороженных с различными скоростями // Рук. деп. в ВИНИТИ 20.02.89, № 1091–В89. – 15 с.
6. *Юрченко В.И., Ковалев М.Г., Ахмад М.М.* Влияние постоянного магнитного поля на иммунобиологические свойства спермиев, хранившихся в условиях гипотермии // І з'їзд Укр. товариства кріобіології і кріомедицини: Тези доповідей (Харків, 18–20 жовтня 1995 р.). – С. 7–9.
7. *Чуб Н.Н., Терпячая И.В., Пиняев В.И. и др.* Изучение пенетрационной и оплодотворяющей способности спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии: Сб. науч. тр. — Киев, 1995. – С. 184–186.
8. *Grischenko V.I., Petrushko M.P., Kalugin Yu.V., Luchko N.A.* The effect of cryopreservation factors on some morphological and genetic characteristics of mouse embryos // Proc. Int. Meet. Soc. Low Temp. Biol. – Leven, Belgium. – 1994. – P. 5.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 27.02.97

В.І.ГРИЩЕНКО, Н.А.ЛУЧКО

НОВІ ПІДХОДИ ДО ПРОБЛЕМИ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВУВАННЯ РЕПРОДУКТИВНИХ КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Проведено комплекс фундаментальних досліджень механізмів кріопошкоджень і кріозахисту репродуктивних клітин, ембріонів і ембріональних клітин тварин і людини, включаючи розвиток нового напрямку в кріорепродуктології — використання надвисоких швидкостей репродуктивних клітин у поєднанні з композиційними кріоконсервантами. Розроблено методи кріоконсервування репродуктивних клітин для клінічного використання.

V.I.GRISCHENKO, N.A.LUCHKO

THE NEW APPROCHES TO THE PROBLEM OF HUMAN AND ANIMAL REPRODUCTIVE CELL LOW TEMPERATURE PRESERVATION

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

The complex of fundamental researches of cryodamage and cryoprotection mechanisms of reproductive cells embryos human and animal embryonic cells including the cryoreproductology the usage of ultra-high cooling rate of reproductive cells in combination with compositional cryoprotectants has been conducted. The method of reproductive cells cryopreservation have been developped for the clinical application.

УДК 57.043:577.352.4

Е.А.Гордиенко, А.И.Осецкий, Л.Ф.Розанов

НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СПОСОБОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Описываются основные физические принципы, лежащие в основе методов криоконсервирования клеточных суспензий. Показано, что основные физико-химические изменения в клетках на всех этапах криоконсервирования связаны с процессами массопереноса в системе клетка—окружающая среда и могут быть описаны с помощью уравнений термодинамики необратимых процессов.

Матеріал, захищений авторським правом

Успех низкотемпературного консервирования биологических объектов зависит прежде всего от правильного учета физических явлений, которые протекают на различных этапах этого процесса.

Процесс низкотемпературного консервирования клеточной суспензии схематически можно представить в виде пяти последовательных стадий:

замещение окружающей клетки физиологической среды криозащитным раствором, сопровождаемое процессами массообмена между клетками и окружающим их раствором;

глубокое охлаждение взвеси клеток в криозащитном растворе по определенной программе (обычно до температуры −79÷−196 °С). Такое охлаждение инициирует фазовые переходы в структуре биомембран, вне- и внутриклеточных водных растворах; медленно протекающие фазовые переходы внеклеточных растворов сопровождаются процессами массообмена между клетками и окружающей их средой;

длительное хранение замороженного материала при постоянной низкой температуре (в холодильнике, парах жидкого азота или непосредственно в жидком азоте); возможность такого хранения связана с тем, что большинство физических и химических реакций биосистем, в том числе и реакции, вызывающие деградацию и повреждение клеточных структур, относятся к процессам активационного типа и их скорость экспоненциально понижается с понижением температуры;

отогрев биообъекта по заданному режиму до положительной (выше 0 °С) температуры, при котором после появления в системе жидкой фазы вновь могут инициироваться процессы массопереноса;

замещение криозащитного раствора физиологически индифферентной средой; на этой стадии важно избежать критического увеличения клеточного объема, связанного с постгипертоническим лизисом.

На каждой стадии процесса низкотемпературного консервирования клеточных суспензий необходимо учитывать биофизические параметры конкретных видов клеток и физические характеристики криозащитных сред.

Наиболее значимыми для низкотемпературного консервирования биофизическими параметрами клеток и клеточной суспензии являются: проницаемость клеточных мембран для молекул воды и применяемого для криозащиты растворенного вещества, поверхностно-объемное отношение клетки, отношение общего объема клеток к объему суспензии и объемная доля осмотически неактивных внутриклеточных веществ.

Важнейшими характеристиками криозащитных сред являются осмотические активности непроникающего и проникающего в клетки компонентов, проникающая способность последнего и ее температурная зависимость. Высокая осмотическая активность при невысокой проникающей способности делает криопротекторы потенциальной причиной повреждения клеток на стадии замены физиологической среды на криозащитную и на стадии возврата клеток в физиологическую среду. В какой-то мере избежать нежелательных осмотических стрессов позволяет процедура последовательной экспозиции клеток в средах с увеличивающейся (или уменьшающейся) концентрацией. Однако чрезмерное пролонгирование экспозиции тоже нежелательно — здесь возможно проявление токсических свойств криопротектора.

Оптимальное время однократной экспозиции клеток в криозащитной среде, содержащей проникающий и непроникающий компоненты, может быть рассчитано из уравнений тепломассообмена, универсальных для клеток с различными биофизическими характеристиками [2].

Решение этих уравнений приводит к следующим важным заключениям. Во-первых, время насыщения клеток криопротектором равно времени восстановления клеточного объема, следующего за первой стадией взаимодействия клеток с гипертонической криозащитной средой, т.е. после дегидратации. Это

Матеріал, захищений авторським правом

позволяет экспериментально проводить оценку времени оптимальной эквилибрации по данным объемных изменений клеток. Во-вторых, из полученных решений следует возможность уравновешивания концентраций вне- и внутриклеточного криопротектора при различной степени дегидратации клеток, что позволяет снизить вероятность неблагоприятного для клеток внутриклеточного кристаллообразования за счет соответствующей предобработки клеток на этапе их изотермической экспозиции с криозащитной средой, а именно за счет подбора оптимального соотношения исходной (до охлаждения) внутриклеточной концентрации криопротектора и степени исходного обезвоживания замораживаемых клеток. В-третьих, решая уравнения [2] при конкретных биофизических характеристиках определенных клеток, можно определить динамику накопления криопротектора клетками, кинетику их обезвоживания, минимальный объем, достигаемый клетками в криозащитной среде, и т.д.

Различная проницаемость мембран разных клеток для криопротекторов приводит к тому, что время минимально необходимой экспозиции в криозащитных растворах может сильно различаться. Так, эритроциты человека достигают в растворах глицерина состояния, близкого к равновесию, уже ко второй-третьей минуте экспозиции, в то время как ядросодержащие клетки крови и костного мозга требуют более пролонгированной экспозиции (15–20 мин). Время экспозиции в криозащитных средах перед замораживанием, естественно, зависит от вида криопротектора. Так, например, 1,2-ПД проникает в эритроциты человека в 8–15 раз быстрее, чем глицерин, а ДМСО — в 1,5 раза быстрее, чем 1,2-ПД. Что касается видовых различий проницаемости, то проницаемость эритроцитов человека для глицерина в 100–600 раз выше, чем проницаемость эритроцитов быка.

Глубокое охлаждение взвеси клеток в криозащитном растворе сопряжено с действием на клетки кристаллов вне– и внутриклеточного льда и концентрированных внеклеточных растворов. Механическое действие на клетки кристаллов льда возможно вследствие давления, создаваемого за счет того, что объем воды при превращении ее в лед увеличивается на 10 %. Вторым источником механического взаимодействия кристаллов льда с клеточными компонентами является разность свободных энергий между кристаллами льда и окружающей его переохлажденной жидкостью. Криопротекторы способны уменьшать механическое взаимодействие растущих кристаллов льда с клетками, однако внутриклеточная локализация криопротектора не обеспечивает полного предотвращения повреждения клеток внутриклеточным льдом. Избежать внутриклеточной кристаллизации или, по крайней мере, сделать ее достаточно безопасной для клеток можно путем их дегидратации. При замораживании уровень дегидратации лимитируется скоростью охлаждения. В связи с тем, что концентрация внеклеточного криопротектора при замораживании увеличивается, возрастающий концентрационный градиент инициирует дополнительный поток криопротектора в клетки.

На этапе кристаллизации вычисления клеточного объема, концентраций вне- и внутриклеточных веществ, а также переохлаждения внутриклеточного раствора производятся по уравнениям:

$$\begin{cases} \dfrac{dy}{d\hat{T}} = \dfrac{T_0}{\dot{T}\tau_0} \exp\left[\dfrac{U_0}{RT_0}(\hat{T}-1)/\hat{T}\right]\left[\sigma_1\hat{\pi}_1^{in} - (\sigma_1\varphi^{out}+1)\hat{\pi}_2^{out} + \dfrac{1-\alpha}{y-\alpha}\right]; \\ \dfrac{d\hat{\pi}_1^{in}}{d\hat{T}} = -\left\{\dfrac{T_0}{\dot{T}\tau_0}\beta(T_0)\exp\left[\dfrac{U_1}{RT_0}\left(\dfrac{\hat{T}-1}{T}\right)\right]\left[\hat{\pi}_1^{in} - \varphi^{out}\hat{\pi}_2^{out}\right] + \sigma_1\hat{\pi}_1^{in}\dfrac{dy}{d\hat{T}}\right\}\dfrac{i}{y-\alpha}; \\ \hat{\pi}_2^{in} = (1-\alpha)/(y-\alpha), \end{cases}$$

Матеріал, захищений авторським правом

где T – абсолютная температура клеточной суспензии; T_0 — исходная температура; $\tilde{T}=T/T_0$, $\dot{T}$ – скорость охлаждения; $U_0(U_1)$ – энергия активации процесса переноса молекул воды (криопротектора) через клеточную мембрану; $\hat{\pi}_1 = \hat{\pi}_1^{out}(0)(1 - g_0) + g_0\hat{\pi}_1^{in}(0)(1 - \alpha); \hat{\pi}_2 = \hat{\pi}_2^{out}(0)(1 - g_0) + g_0\hat{\pi}_2^{in}(0)(1 - \alpha);$ $\beta = \tau_0(T_0)/\tau_1(T_0)$; $\varphi^{out} = \hat{\pi}_1^{out}/\hat{\pi}_2^{out}$; $\tau_1(T_0) = (\gamma K_1(T_0))^{-1}$, а $\hat{\pi}_2^{out}$ определяется из диаграммы плавления конкретного тройного криозащитного раствора, в котором взвешены клетки. Например, для раствора ДМСО—NaCl— H_2O имеем

$$\frac{\tilde{T}}{T_0} = \frac{273,15}{T_0} - \frac{0,009}{T_0}\,[13,3+14,49\,\exp(0,26\Phi)\,](1+\Phi)\hat{\pi}_2 -$$

$$- \frac{(0,009)^2}{T_0}\,[133,3+178,39\,\exp(-1,5\Phi)\,](1+\Phi)^2\hat{\pi}_2^2 .$$

Очевидно,

$$\Phi^{in} = \frac{\hat{\pi}_1^{in}}{\hat{\pi}_2^{in}} = \frac{\hat{\pi}_1^{in}(y - \alpha)}{1 - \alpha};$$

$$\Phi^{out} = \frac{\hat{\pi}_1^{out}}{\hat{\pi}_2^{out}} = \frac{\hat{\pi}_1^{out}(0)(1 - g_0) + g_0\hat{\pi}_1^{in}(0)(1 - \alpha) + g_0\hat{\pi}_1^{in}(y - \alpha)}{\hat{\pi}_2^{out}(0)(1 - g_0) + g_0(1 - \alpha) + g_0\hat{\pi}_2^{in}(y - \alpha)} =$$

$$= \frac{\hat{\pi}_1^{out}(0)(1 - g_0) + g_0(1 - \alpha) + g_0\hat{\pi}_1^{in}(y - \alpha)}{\hat{\pi}_2^{out}(0)(1 - g_0)} .$$

Решение этой системы уравнений позволяет заключить, что в присутствии криопротектора внутриклеточное переохлаждение растет монотонно только при быстром охлаждении клеток, которые возвратились к исходному объему на предыдущей стадии процесса низкотемпературного консервирования.

Количественную оценку оптимальной скорости охлаждения насыщенных криопротектором клеток можно проводить по формуле

$$\dot{T}_{опт} = -T_0\gamma L_p\pi_2^{in}/1,25 ,$$

где T_0 – температура плавления внеклеточного раствора.

Следует отметить, что максимальная скорость охлаждения, не приводящая к значительному внутриклеточному переохлаждению, и, следовательно, к внутриклеточной кристаллизации, может быть определена как оптимальная скорость охлаждения, которая зависит от параметров клеточной проницаемости и варьируется для различных клеток в широком диапазоне. Так, оптимальная скорость охлаждения составляет: 3000, 100, 10, 1, 0, 0,1 град/мин для эритроцитов человека, клеток культуры почки китайского хомячка, дрожжей, ядросодержащих клеток крови и костного мозга, яйцеклеток мыши соответственно. На величину оптимальной скорости влияют как переохлаждение клеточной суспензии до начала кристаллизации, так и состав криозащитной среды и регламент обработки клеток этой средой.

Отогрев биообъекта, как правило, следует проводить быстро. Это позволяет избежать дополнительной дегидратации клеток и связанного с ней повреждения, а также нежелательных эффектов вне- и внутриклеточной рекристаллизации.

При замещении криозащитного раствора на физиологический необходимо избегать значительных градиентов осмотического давления на мембраны, приводящих к возрастанию объема клеток выше критического. Обычно для этого применяют многоступенчатую отмывку, погружая клетки в растворы со все меньшим осмотическим давлением.

На протяжении двадцати пяти лет в возглавляемых нами подразделениях ИПКиК НАН Украины созданы физико-математические модели таких важных с криобиологической точки зрения явлений, как температурный шок,

Матеріал, захищений авторським правом

осмотический и постгипертонический лизис клеток, гипертонический криогемолиз. Построены количественные физические модели явлений латерального перераспределения мембранных компонентов при различных типах деформации клеточных мембран, механического взаимодействия клеток с движущейся границей раздела "лед–водный раствор", рекристаллизации на этапе отогрева. С помощью физико-математического моделирования изучены особенности трансмембранного переноса, когда клетки оказываются захваченными в замкнутые жидкие включения, объяснен защитный эффект быстрого двухступенчатого замораживания, усовершенствованы модели, описывающие изменение состава и переохлаждения внутриклеточной среды на разных этапах цикла низкотемпературного консервирования. Создана теоретическая модель, предсказывающая отклонение температурной зависимости скорости процессов активационного типа от закона Аррениуса.

Таким образом, созданы предпосылки для построения количественной биофизической теории низкотемпературного консервирования клеточных суспензий и других биологических объектов. В частности, доказано, что основные физико-химические изменения в клетках на всех этапах криоконсервирования определяются физическими процессами, протекающими в системе "клетка–окружающая среда", и могут быть описаны с помощью уравнений термодинамики необратимых процессов и других разделов физики [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук.думка, 1994. – 143 с.
2. *Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф., Костяев А.А. и др.* Кинетика процессов массопереноса при изотермической экспозиции клеток в комбинированных средах // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 3. – С. 3–8.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 27.12.96

Є.О.ГОРДІЄНКО, О.І.ОСЕЦЬКИЙ, Л.Ф.РОЗАНОВ

НАУКОВЕ ОБГРУНТУВАННЯ МЕТОДІВ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО КОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Описуються основні фізичні принципи, які лежать в основі методів кріоконсервування клітинних суспензій. Показано, що основні фізико-хімічні зміни в клітинах на всіх етапах кріоконсервування пов'язані з процесами масопереносу в системі клітина–оточуюче середовище і можуть бути описані за допомогою рівнянь термодинаміки необоротних процесів.

E.A.GORDIENKO, A.I.OSETSKY, L.F.ROZANOV

SCIENTIFIC SUBSTANTIATION OF METHODS OF LOW TEMPERATURE PRESERVATION OF CELLULAR SUSPENSIONS

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

The basical physical principles, laid in the basis of cryopreservation methods of cell suspensions are described in this article. It has been shown, that the main physicochemical alterations in cells at all stages of cryopreservation depend on processes of mass transfere in the system "cell–surrounding media" and should be described with irreversible thermodynamics equations.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.826.4:57.043

Г.А.Бабийчук, В.С.Марченко

ТРИГГЕРНАЯ ФУНКЦИЯ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ГИБЕРНАЦИИ

Обосновывается необходимость разработки новой научной концепции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) охлажденного мозга. Предлагается рассматривать ГЭБ как структурно-функциональную основу сверхмедленной управляющей системы организма, пускового звена центральных механизмов терморегуляции при гипотермии и гибернации.

Анализ научной литературы, посвященной изучению адаптации организма человека и животных к охлаждению, показывает, что один из центральных вопросов криобиологии и криомедицины — проблема искусственного гипобиоза находится в стадии разработки. Предпринятый в последние годы интенсивный поиск нейропептидов — индукторов зимней спячки — тоже может оказаться скорее модным, чем плодотворным (ряд ученых не без основания считают такой подход методологической ошибкой [5]). Однако, возможно, сама идея полностью не исчерпала себя, если под "триггером торпора" понимать не единственный специфический фактор или даже комплекс биоактивных веществ, а специальную функциональную систему организма. По нашему мнению, прогресс в этом научном направлении можно ожидать только при исследовании на системном уровне общего управления состоянием охлажденного организма. Поэтому актуально изучение функциональных систем мозга, регулирующих суммарную активность и поддерживающих гомеостаз ЦНС. К таким физиологическим механизмам относятся гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и сверхмедленная управляющая система организма [1], которые стали предметом наших исследований последних лет и представляются перспективными объектами изучения для криобиологии.

Рассматривая ГЭБ как структурную основу медленной управляющей системы мозга, пускового звена центральной терморегуляции при искусственной и естественной гипотермии, необходимо определить место и роль в этих механизмах "гормонов гибернации". Предполагают, что "триггер спячки" продуцируется в мозге в низкомолекулярной форме, а проникая через ГЭБ, соединяется с альбуминовым носителем и в таком "запретном" для нервной ткани виде присутствует в крови зимнеспящих [6]. Тогда повышение проницаемости ГЭБ в природных условиях, вызываемое, например, гипоксией, гипотермией, гиперкапнией, может служить своеобразным регулятором уровня поступающего в мозг "триггера гибернации", который сам будет влиять на уровень проницаемости барьера, замкнув петлю обратной связи.

Цель работы — оценить взаимную регуляцию функционального состояния ГЭБ и "триггеров зимней спячки" из трех групп биологически активных веществ: нейропептидов (на примере бомбезина), биогенных аминов (на примере норадреналина),антиметаболических агентов из тканей холодоадаптированных организмов (на примере фракции 1–10 кД мозга якутской лошади).

Эксперименты проводились на белых крысах, золотистых хомяках и длиннохвостых сусликах. Краниоцеребральную гипотермию (КЦГ) в течение 120 мин до ректальной температуры 32 °С осуществляли в непрерывном и ритмическом режимах (длительность единичного воздействия 1 с, частота 0,1 Гц). Функциональная активность ГЭБ и нейроглиальных комплексов оценивалась электрофизиологическими, нейрохимическими и электронно-микроскопическими методами [2].

Бомбезин, относясь к группе антиметаболических нейропептидов, снижает поступление энергии в организм и способствует поддержанию гомеостаза в этих условиях за счет действия на тонус вегетативной нервной системы [3, 7]. Тогда возникает вопрос о значении в данных процессах степени проница-

Матеріал, захищений авторським правом

емости ГЭБ для вазоактивных веществ, участвующих в поддержании баланса симпатических и парасимпатических влияний [4].

Внутрибрюшинное введение наркотизированным крысам бомбезина (эксперименты проведены совместно с А.В.Шило и Ю.Ф.Пастуховым) приводит к существенному дозозависимому увеличению проницаемости ГЭБ для катехоламинов. Повышение проницаемости во всех изученных структурах мозга было одного порядка, но несколько больше в гипоталамусе и таламусе. Проникший через ГЭБ норадреналин (НА) захватывается синаптическими терминалями и может высвобождаться, например, под влиянием суперфузии гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенной концентрацией ионов K^+. Причем активность этих "кровавых" катехоламинов, по-видимому, физиологически значима, достаточна для проявления их функции в месте центрального приложения (системное введение НА оказывает центральный эффект — вызывает брадикардию).

В первом приближении можно предложить гипотетическую цепочку событий, приводящих к повышению проницаемости ГЭБ. Известно, что бомбезин увеличивает выброс адреналина (А) надпочечниками [7]. Активированные симпатические процессы будут стимулировать обмен серотонина в эпифизе, который, наряду с нейрогипофизом, интегрирует центральные и системные эффекты нейропептидов. Кроме того, бомбезин способствует дегрануляции энтерохромаффинных клеток желудочно-кишечного тракта как рецепторно-секреторных элементов и высвобождению серотонина с последующей аккумуляцией в тромбоцитах. Моноамины способны прямо активировать аденилатциклазу либо заметно стимулировать синтез и высвобождение простагландинов, которые в зависимости от вида ткани и разновидности аденилатциклазы могут как стимулировать, так и ингибировать синтез цАМФ. Однако в большинстве тканей простагландины активируют синтез цАМФ; локальное накопление цАМФ в мозговых капиллярах крыс приведет к вазодилятации микрососудов, увеличению везикулярного транспорта и повышению проницаемости ГЭБ.

Реальность подобных реакций можно оценить на экспериментальной модели активированного состояния эндогенных бомбезинзависимых процессов. Известно два основных фактора, способных достоверно возбуждать бомбезинергические механизмы организма — температурные воздействия и наркоз [2, 3, 7]. В этой связи было изучено влияние КЦГ на содержание катехоламинов, простагландинов и цАМФ в различных тканях наркотизированных крыс (эксперименты проведены совместно с И.И.Ломакиным, В.В.Ломако, И.В.Чижевской).

При охлаждении отмечалось увеличение концентрации А и в меньшей степени НА в плазме крови, при этом понижалось содержание НА в ткани надпочечников. Полученные результаты не противоречат нашим представлениям о возможной роли бомбезина, приводящего в этих условиях к увеличению секреции адреналина надпочечниками. Однако эти процессы могли быть связаны и с усилением синтеза катехоламинов, поэтому мы проследили некоторые стороны функционирования норадренергической системы при экспериментальном истощении катехоламиновых депо инъекциями резерпина.

Через 18 ч после введения резерпина содержание адреналина и норадреналина уменьшалось соответственно в 5 и 4 раза и оставалось низким в последующие 48 ч наблюдения. КЦГ у данной группы животных существенно повышала содержание НА и А плазмы до уровня, близкого к исходному. Несмотря на некоторое снижение концентрации НА через 24 ч после гипотермии, тенденция к нормализации его содержания сохранялась. Гипотермия значительно увеличивает возможности норадреналинсекретирующих клеток надпочечников, содержание НА повышается более чем в 5 раз по сравнению с его уровнем на фоне введения резерпина, однако не достигает исходных значе-

Матеріал, захищений авторським правом

ний, что может указывать на повышенный выброс НА в кровь под действием бомбезина.

КЦГ в диапазоне температуры тела 32–30 °С сопровождалась умеренным повышением содержания в крови простагландина Е в течение 6 ч гипотермии и через сутки наблюдения, в то время как концентрация простагландина F не была подвержена существенным изменениям.

Кроме того, под влиянием умеренной КЦГ снижается уровень цАМФ. После отогрева наблюдали активацию синтеза цАМФ с последующим уменьшением через сутки. Падение содержания цАМФ в плазме крови на фоне активации симпатических влияний и увеличения концентрации простагландина Е может быть связано с его аккумуляцией в тканях, например, в сердце или сосудах. Так, в сердечной мышце при КЦГ наблюдается увеличение содержания цАМФ за счет каталитической активности аденилатциклазы, опосредованной как адренорецепторами (АР), так и другими средствами, например простагландинами группы Е.

Повышение активности аденилациклазы и увеличение содержания цАМФ приводят к реактивным изменениям в нейроглиальных ансамблях. Электроннограммы свидетельствуют о том, что после холодовых воздействий синаптический аппарат находится в состоянии напряжения, а в эндотелии микрососудов обнаруживаются клатриновые везикулы, активируются процессы рецепторного трансцитоза, что должно сопровождаться повышением проницаемости ГЭБ.

Действительно, при КЦГ происходит заметное повышение проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов во всех изученных структурах мозга. Причем, как и при действии экзогенного бомбезина, наиболее значительно повышается проницаемость в гипоталамусе и таламусе. Блокатор синтеза простагландинов (ацетилсалициловая кислота) повышал резистентность ГЭБ для НА, хотя проницаемость для ацетилхолина в этих условиях оставалась высокой, но это можно объяснить активацией ацетилхолинэстераз простагландинами. Интересно, что бомбезин тоже снижал увеличенную проницаемость ГЭБ охлажденного мозга. Этот принципиальный для нас факт указывает на возможный принцип организации обратной связи в системе: бомбезин повышает проницаемость ГЭБ, пропуская катехоламины, проходит в мозг и "закрывает за собой дверь".

Таким образом, стимулирующее действие бомбезина может быть опосредовано норадренергическими механизмами ЦНС. Поэтому в следующей серии экспериментов был определен общий уровень активности моноаминзависимых процессов по состоянию динамических характеристик секундного биоэлектрического ритма.

Известно, что увеличение силы и длительности холодового воздействия вовлекает в реакцию структуры ЦНС, функционально связанные с моноаминергическими механизмами центральной терморегуляции, что проявляется в характерном изменении секундного ритма сверхмедленной биоэлектрической активности [1].

Было показано, что на первом этапе КЦГ происходит резкое снижение большинства исследованных параметров пространственной синхронизации биотоков коры головного мозга и гипоталамуса, особенно в секундном диапазоне частот. Мощность спектра секундного ритма уменьшается более, чем в 3 раза, во столько же раз снижаются значения постоянного потенциала, динамика которого коррелирует с изменением когерентности секундного ритма.

На втором этапе КЦГ пространственная синхронизация биоэлектрической активности коры возрастает. При этом замедляется скорость охлаждения в 1,5–2 раза (по сравнению с первым этапом КЦГ), но только при наличии в биоэлектрической активности неокортекса квазисинусоидального секундного ритма, мощность спектра которого повышается в 1,5–2 раза. В этих условиях

Матеріал, захищений авторським правом

возрастают значения функции когерентности, особенно в дзета-диапазоне; более чем в 2 раза уменьшается фазовый сдвиг секундного ритма.

Установлено, что в условиях нормотермии при суперфузии задних отделов гипоталамуса НА происходят изменения биоэлектрической активности коры, аналогичные таковым под влиянием КЦГ. Вероятно, повышенная секреция НА в заднем гипоталамусе явилась бы достаточным условием для усиления пространственной синхронизации ЭЭГ при КЦГ. В этом случае синхровлияние на кору будет, скорее всего, передаваться через АР, что можно проверить экспериментально. Так, при суперфузии гипоталамуса блокатором бэта-АР значения функции когерентности ЭЭГ повышаются, а фазовый сдвиг секундного ритма понижается, при суперфузии блокатором альфа-АР, наоборот, значения функции когерентности понижаются, а фазовый сдвиг секундного ритма повышается, что говорит о возможности передачи синхронизирующих влияний гипоталамуса действием НА на альфа-АР, а пространственно десинхронизирующих — на бэта-АР. Этот вывод будет корректен, если он справедлив и для работы охлажденного мозга, когда возможны изменения функциональных характеристик адренорецепции.

Экспериментально установлено, что применение блокаторов бэта-АР на первом этапе КЦГ после увеличения значений функции когерентности ЭЭГ ведет к их уменьшению, а понижение фазового сдвига секундного ритма сменяется увеличением, в то время как блокада альфа-АР на этом этапе КЦГ сопровождается только подавлением пространственной синхронизации ЭЭГ. На втором этапе КЦГ при блокаде альфа-АР подавление сменяется усилением синхронизации биоэлектрической активности, а при блокаде бэта-АР в этих условиях сохраняется однофазная реакция в изменении пространственной синхронизации ЭЭГ.

Анализ кинетических характеристик альфа- и бэта-АР в аналогичных экспериментальных условиях подтвердил участие адренорецепторов в процессах синхровлияний гипоталамуса на кору головного мозга,

Динамика изменений кинетических параметров альфа-АР указывает на то, что на начальных этапах КЦГ понижается сродство лигандов к рецепторам (особенно резко это выражено в случае альфа1-АР), константа диссоциации (Кд) возрастает примерно в 3 раза. При анализе кривых связывания в координатах Скэтчарда при ректальной температуре 32 °С (II этап КЦГ) график для альфа1-АР имеет нелинейный характер, что говорит о наличии двух популяций данного типа рецепторов с различными Кд (количество рецепторов с высокой степенью сродства составляло примерно 40 %). Для бэта-АР уже на начальных этапах охлаждения характерен нелинейный график Скэтчарда.

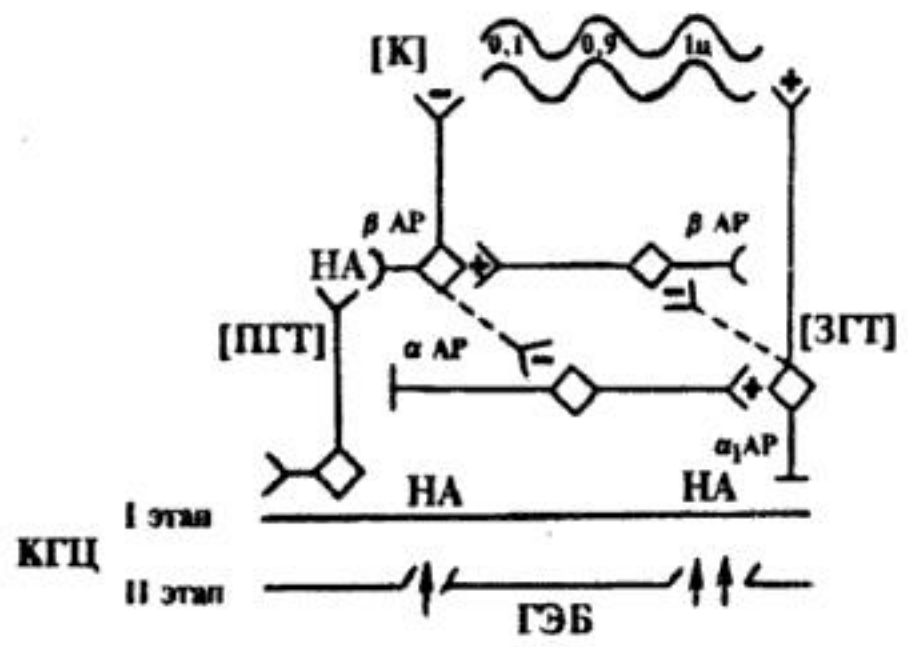
Таким образом, проведенный анализ кинетических параметров радиолигандного связывания адренорецепторов позволил выявить вторую высокоспецифичную популяцию бэта-АР на первом этапе КЦГ и альфа1-АР на втором этапе КЦГ, что объясняет противоположную нормотермии динамику пространственной синхронизации ЭЭГ при КЦГ на фоне блокады адренорецепторов.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что на начальном этапе действия КЦГ происходит усиление секреции НА в передних отделах гипоталамуса, сравнимое по величине с усилением секреции НА у контрольных животных при суперфузии гипоталамуса раствором Кребса-Рингера с повышенным содержанием ионов K^+ (60 мМ). Эти данные хорошо согласуются с представлениями о десинхронизирующем влиянии передних отделов гипоталамуса на пространственно-временные характеристики ЭЭГ на первом этапе гипотермии. На втором этапе КЦГ при снижении ректальной температуры до 32–30 °С (температура гипоталамуса 30–29 °С) происходит уменьшение К -индуцированной секреции НА почти в 2 раза по сравнению с контролем. В структурах заднего гипоталамуса не выявлено сходных измене-

Матеріал, захищений авторським правом

ний в уровне секреции, однако показано существенное повышение проницаемости ГЭБ для НА.

В обобщенном виде результаты наших экспериментов могут быть представлены в виде гипотетической нейрональной модели (рисунок), в основе которой лежит предположение, что усиленная секреция норадреналина в передних отделах гипоталамуса (ПГТ) через систему бэта-АР на первом этапе КЦГ ведет к подавлению пространственной синхронизации ЭЭГ, активация которой опосредуется альфа1-АР на втором этапе КЦГ в условиях повышения проницаемости ГЭБ для НА в задних отделах гипоталамуса (ЗГТ).



Принципиальная схема колебательного контура в нейротрансмиттерных механизмах центральной терморегуляции

Возникают предпосылки для формирования функциональной системы, ответственной за регулирование уровня пространственной синхронизации медленной биоэлектрической активности, что способствует запуску терморегуляторных реакций в ЦНС при искусственной, но возможно и естественной гипотермии.

Поэтому в заключение представлялось целесообразным сопоставить факты, отражающие функциональное состояние ГЭБ при гипотермических воздействиях на организм гомео– и гетеротермных животных.

1. Результаты экспериментов свидетельствуют, что в норме и при охлаждении тела до 35 °С у золотистых хомяков, способных впадать в спячку, и у белых крыс ГЭБ не проницаем для норадреналина. При снижении температуры тела до 34–31 °С проницаемость ГЭБ повышается в 2–3 раза, причем в задних отделах гипоталамуса в 1,5 раза больше, чем в передних, и этот процесс более выражен у хомяков, чем у крыс.

2. Перфузат, собранный с помощью нагнетательно-отсасывающей канюли из различных отделов головного мозга, охлажденных до температуры открытия ГЭБ крыс-доноров и введенный в гипоталамус крыс-реципиентов, при нормотермии вызывает у последних такое же повышение проницаемости барьера. Однако гораздо более существенное увеличение проницаемости для НА происходит у крыс, которым вводили фракцию 1–10 кД мозга холодоадаптированной якутской лошади.

3. Процессы повышения проницаемости ГЭБ сопровождаются возрастанием пространственной синхронизации биоэлектрической активности коры и гипоталамуса. В сходных экспериментальных условиях функция когерентности БЭА некортекса хомяков, в отличие от крыс, достигает более высоких значений в секундном диапазоне частот.

Интересно отметить, что секундный ритм гипоталамуса длиннохвостого суслика в период гибернации имеет большую мощность и сохраняется вплоть до температуры среды инкубации порядка 10–4 °С (у крыс 19–20 °С).

4. Ритмические холодовые воздействия на крыс с обратной связью по секундному ритму некортекса, увеличивая мощность спектра биоэлектрического ритма частотой 0,1–0,6 Гц до величин, характерных для охлажденного мозга гетеротермных животных, приводят к существенному (на порядок) увеличению проницаемости ГЭБ для терморегуляторных нейромедиаторов.

Таким образом, анализ результатов экспериментов и данных литературы дает нам некоторые основания полагать, что при всей уникальности явления зимней спячки она осуществляется с привлечением нейрофизиологических механизмов, функционирующих и у незимнеспящих организмов. Однако до сих пор ни в одной из нейротрансмиттерных моделей центральной терморегу-

Матеріал, захищений авторським правом

ляции не учитывалось состояние проницаемости ГЭБ. Возможно, только поэтому они мало применимы к специфическим гипометаболическим состояниям организма типа зимней спячки. В этой связи давно назрела необходимость в разработке научной концепции ГЭБ как основы сверхмедленной управляющей системы организма и важного звена центральной терморегуляции при гипотермии и гибернации. Дальнейшее изучение этой проблемы должно показать, в какой степени функциональная активность ГЭБ связана с триггерными механизмами естественного гипобиоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аладжалова Н.А.* Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга. – М.: Наука, 1979. – 213 с.
2. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Пастухов Ю.Ф. и др.* К механизмам регуляции гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщ. 1 // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 1. – С. 3–9.
3. *Марьянович А.Т., Поляков Е.Л.* Бомбезин: предполагаемое действие на тонус симпатических нейронов спинного мозга // Симп. Физиология пептидов: Тез.докл. (18–22 апреля 1988). – Л., 1988. – С. 117–118.
4. *Марьянович А.Т., Поляков Е.Л.* Нейропептиды и гематоэнцефалический барьер // Успехи физиологич. наук. – 1991. – 22, № 2. – С. 33–51.
5. *Пастухов Ю.Ф.* Явление сезонного гипометаболизма млекопитающих // Термофизиология. Информ. бюл. Вып. 2. – Минск, 1991. – С. 7–18.
6. *Oeltden P.R., Walsh J.M., Hammans S.R. et al.* Hibernatien "trigger" opicid-lake inhibitory action on brain function on the monkey // Parmac. Boichim. Behav. – 1982. – 17, № 6. – P. 1271–1274.
7. *Tache Y., Brown M.* On the role of bombesin in homeostasis // Trends Neurosci. – 1982. – 5, № 12. – P. 431–433.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 04.02.97

Г.О.БАБІЙЧУК, В.С.МАРЧЕНКО

ТРИГЕРНА ФУНКЦІЯ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ В НЕЙРОТРАНСМІТЕРНИХ МЕХАНІЗМАХ ТЕРМОРЕГУЛЯЦІЇ ПРИ ГІПОТЕРМІЇ ТА ГІБЕРНАЦІЇ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків

Обгрунтовується необхідність розробки нової наукової концепції гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) охолодженого мозку. Пропонується розглядати ГЕБ як структурно-функціональну основу надповільної керуючої системи організму, пускової ланки центральних терморегуляційних механізмів при гіпотермії та гібернації.

G.A. BABIJCHUK, V.S. MARCHENKO

TRIGGER FUNCTION OF BLOOD BRAIN BARRIER IN NEUROTRANSMITTER MECHANISMS OF THERMOREGULATION AT HYPOTHERMIA AND HIBERNATION

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

The necessity of development of new scientific concept of blood brain barrier (BBB) of the brain being cooled has been substantiated. It is proposed to consider the BBB as a functional and structural basis of ultraslow controlling system of organism, triggering link of central mechanisms of thermoregulation at hypothermia and hibernation.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 547.422+57.043

А.В.Зинченко

ОБ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПОЛЯРИЗАЦИИ И ОПТИЧЕСКОМ ИЗЛУЧЕНИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕЙ ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ-НАГРЕВЕ

Исследована зависимость интенсивности оптического излучения и электрической поляризации водных растворов ПЭГ молекулярных масс 300, 400, 600, 1000, 2000 и 3000 от концентрации при охлаждении-нагреве в диапазоне температур 0÷−196 °С. Обнаружена симбатность в зависимости интенсивности ЭП и ОИ от концентрации. Полученные результаты указывают на то, что возникновение ЭП матрицы при охлаждении биологических объектов является одной из причин криоповреждения живых систем в твердофазной матрице.

В ряде работ было показано, что при охлаждении-нагреве водных растворов криозащитных веществ возникают оптическое излучение (ОИ) и электрическая поляризация (ЭП) замороженной матрицы, причем в тех случаях, когда вещество характеризуется более высокой ЭП, в нем регистрируется и более высокое ОИ [4–6]. Физическая природа этих явлений исследована недостаточно.

Цель настоящей работы — систематическое исследование закономерностей развития ЭП и ОИ в водных растворах ПЭГ в широком интервале концентраций при охлаждении-нагреве в диапазоне температур 0 ÷−196 °С. Использовали методику и экспериментальную аппаратуру для регистрации оптического излучения и электрической поляризации, описанные в [2]. Для приготовления растворов брали ПЭГ молекулярных масс 300–3000 фирмы “Merck” квалификации “purum” и бидистиллят.

Образцы исследуемых растворов массой 1 или 2 г помещали в контейнер прибора, описанного в [2], охлаждали погружением в жидкий азот и затем нагревали при помощи встроенного нагревателя, регистрируя при этом ЭП и ОИ. Электрическую поляризацию регистрировали с помощью емкостного зонда, оптическое излучение — фотоэлектронного умножителя ФЭУ-136. Интенсивность ЭП или ОИ измеряли двумя способами: первый — регистрация суммарного числа импульсов ЭП или ОИ счетчиком в течение всего времени охлаждения или нагрева. Такой способ давал информацию о числе единичных актов исследуемых явлений. Однако, как показали наши исследования, амплитуды серии импульсов, регистрируемые в течение одного эксперимента, сильно отличаются. Поэтому в работе использовался еще один способ регистрации. Усиленные импульсные сигналы ЭП и ОИ интегрировали на самописце огибающую серии импульсных сигналов как функцию времени. Мерой интенсивности исследуемых явлений при этом служила площадь под огибающей импульсных сигналов.

На рис. 1 и 2 показаны концентрационные зависимости числа импульсных электрических сигналов на зонде и интегральной интенсивности ОИ для водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600, а на рис. 3 и 4 — аналогичные зависимости для растворов ПЭГ-1000, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3000, полученные при охлаждении. При нагреве образцов получаются концентрационные зависимости, подобные представленным на рис. 1–4, и отличаются только абсолютными значениями интенсивностей исследуемых явлений. На концентрационных зависимостях ЭП и ОИ наблюдаются два максимума в области высоких концентраций ПЭГ (более 50 мас. %) и в области низких концентраций ПЭГ (менее 50 мас. %). Максимум в области малых концентраций ПЭГ слабо выражен в растворах низкомолекулярных ПЭГ (молекулярные массы менее 600) и увеличивается с ростом молекулярной массы полиэтиленгликоля для растворов ПЭГ-1000, ПЭГ-2000 и ПЭГ-3000.

Естественно предположить, что эти закономерности связаны с особенностями фазовых превращений в системе вода-ПЭГ. Из анализа диаграмм физи-

Матеріал, захищений авторським правом

ческих состояний систем вода–ПЭГ-300 и вода–ПЭГ-400 [3] следует, что в диапазоне концентраций 62–86% ПЭГ-300 и 65–75 % ПЭГ-400 растворы при охлаждении полностью стеклуются. Кристаллизация неэлектролитов развивается только в растворах, содержащих более 85 % ПЭГ-300 и 75 % ПЭГ-400. Как видно из рис. 1 и 2, для вышеуказанных диапазонов концентраций, в которых растворы при охлаждении полностью стеклуются, количество генерируемых импульсов ЭП и интенсивность ОИ значительно больше, чем для других концентраций.

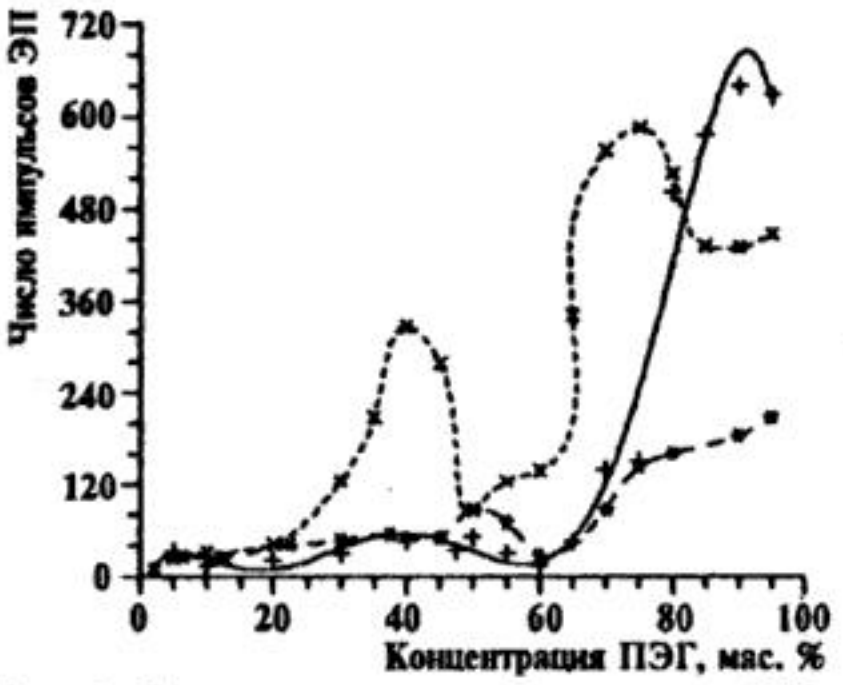


Рис. 1. Зависимость числа импульсов ЭП от концентрации ПЭГ-300 (*), ПЭГ-400 (+) и ПЭГ-600 (×) при охлаждении

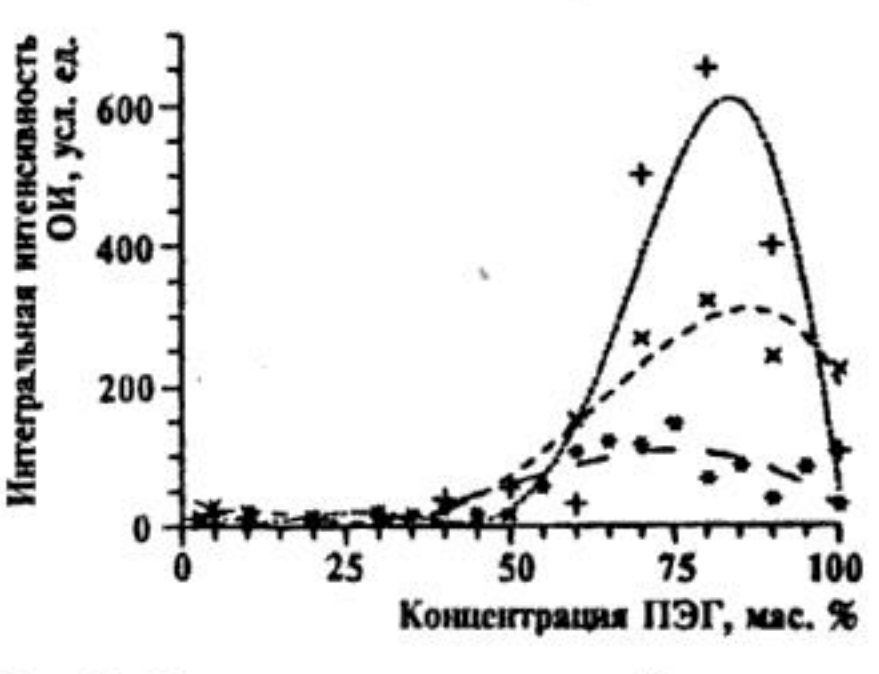


Рис. 2. Зависимость интегральной интенсивности оптического излучения водных растворов ПЭГ-300(+), ПЭГ400 (×), ПЭГ-600 (*) от концентрации при охлаждении

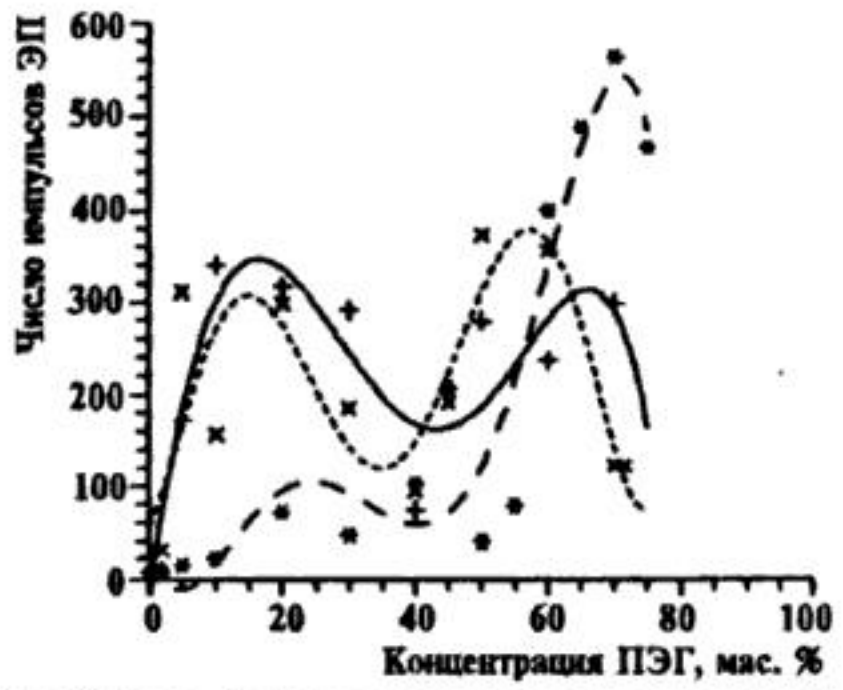


Рис. 3. Зависимость количества импульсов ЭП от состава системы вода-ПЭГ-1000 (*), вода-ПЭГ-2000 (+), вода-ПЭГ-3000 (×) при охлаждении

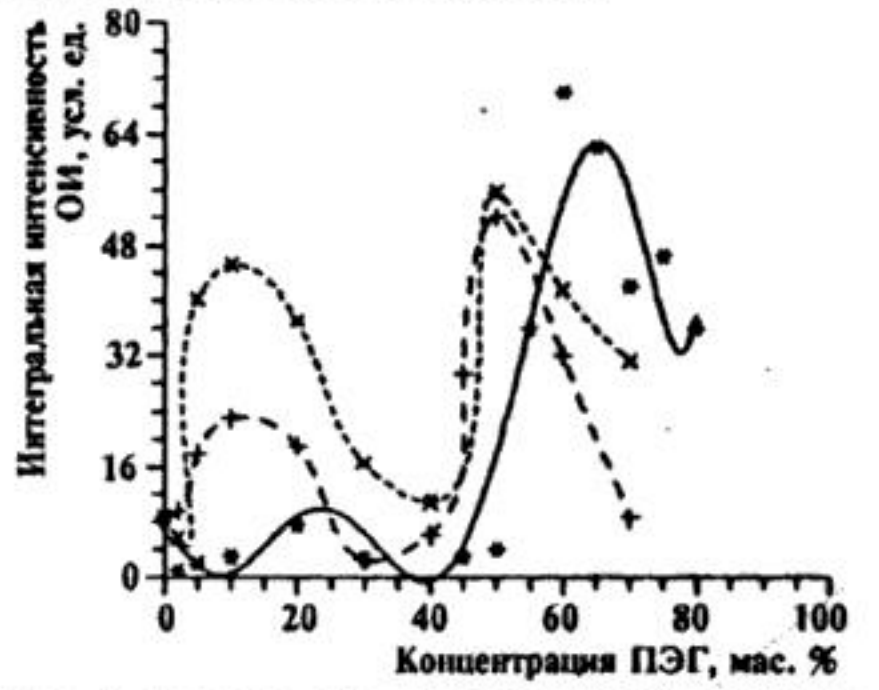


Рис. 4. Зависимость интегральной интенсивности оптического излучения водных растворов ПЭГ-1000 (*), ПЭГ-2000 (+) и ПЭГ-3000 (×) от концентрации при охлаждении

Известно, что во многих веществах в ходе изменения температуры при фазовом переходе могут генерироваться электрические поля в результате возникновения двойного электрического слоя на грани растущих кристаллов (эффект Коста-Рибейро) [7].

Другим механизмом генерирования электрических полей является разделение зарядов при растрескивании материала [1]. Согласно существующей концепции [1, 10] вновь образованные поверхности (края трещины) рассматриваются как неравновесные образования. Механическая энергия разрушения тратится на разрыв когезионных связей и разделение противоположных зарядов. Таким образом, края трещин можно рассматривать, как обкладки заряженного конденсатора.

Тот факт, что интенсивная электрическая поляризация развивается в области высоких концентраций ПЭГ, где растворы полностью стеклуются при охлаждении, дает основания думать, что механизм электрической поляризации в этих растворах связан именно с растрескиванием стеклообразной матрицы.

Матеріал, захищений авторським правом

В системе вода-ПЭГ-600 наблюдается максимум ЭП в области концентраций 40 %. Его появление можно связать со структурными изменениями в растворе. При молекулярной массе 600 молекула ПЭГ переходит от линейной конформации, характерной для низкомолекулярных ПЭГ, к более компактной, спиральной. В результате этого при охлаждении растворов ПЭГ-600 происходит частичная кристаллизация эвтектических составов, а также наблюдается образование кристаллов полиэтиленгликоля и в области концентраций около 40 % ПЭГ количество стеклообразного вещества в замороженном растворе невелико, основная масса вещества образует кристаллы [3]. Следовательно, максимум ЭП в области концентраций около 40 % связан с поляризацией вещества в результате возникновения кристаллизационной разности потенциалов. В пользу предложенной модели поляризации вещества говорит то, что с ростом молекулярной массы ПЭГ интенсивность максимума ЭП в области малых концентраций ПЭГ увеличивается (рис. 3). Известно, что кристаллы ПЭГ-3000 образуются легче, чем ПЭГ-600 [3].

Как видно из рис. 1–4, для всех исследованных систем наблюдается симбатность в изменении интенсивности ЭП и ОИ с изменением концентрации раствора. На основании этого можно полагать, что в основе возникновения электрических и оптических явлений в исследуемых нами растворах при охлаждении-нагреве лежат одни и те же физические процессы. По-видимому, механизм генерации оптического излучения при охлаждении растворов возникает в результате поляризации матрицы подобно тому, как это имеет место при разрушении полимеров [1]. При достаточно большой разности потенциалов между локальными участками образца может произойти электрический пробой, что приведет к оптическому излучению. Возможна также ионизация атомов вещества по туннельному механизму в сильном электрическом поле [8]. Последующая рекомбинация ионов будет сопровождаться оптическим излучением. Следовательно, оптическое излучение при охлаждении-нагреве водных растворов криозащитных веществ может служить индикатором электрической поляризации вещества. На существование еще одного механизма генерации оптического излучения — движение заряженных дислокаций — указывает А.И. Лапшин [9]. Этот механизм реализуется в условиях неравновесного состояния системы и его нельзя исключить в исследуемых нами объектах.

Из приведенных выше результатов следует, что при замораживании растворов криозащитных веществ в них возникают достаточно сильные электрические поля, способные вызывать ионизацию атомов. Именно возникновение сильных электрических полей в замороженной матрице при криоконсервировании биологических объектов может являться одной из причин повреждения объекта в твердофазном состоянии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Барамбойм Н.К.* Механохимия высокомолекулярных соединений. – М.: Химия, 1978. – 384 с.
2. *Грищенко В.І., Зінченко О.В., Мойсєєв В.О.* Електричні явища і оптична емісія у водних розчинах під час охолодження-нагрівання // Укр. фіз. журн. – 1994. – 39, № 3–4. – С. 439–442.
3. *Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Моисеев В.А.* О низкотемпературных фазовых переходах в водных растворах полиэтиленгликолей // Рукдеп. в ВИНИТИ 29.04.87. N3021-B87.
4. *Зинченко А.В., Моисеев В.А.* Механоэлектрические явления в растворах криопротекторов при замораживании-нагреве // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. Сб. науч. тр. ИПКиК АН УССР. – Харьков, 1990. – С. 50–56.
5. *Зинченко А.В., Моисеев В.А.* О явлениях электроактивности в криобиологических системах при охлаждении до –196 °С и нагреве // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем: Сб. науч. тр. ИПКиК АН УССР. – Харьков, 1989. – С. 42–47.
6. *Зинченко А.В., Мусатова И.Б.* Оптическое излучение водных растворов ПЭГ-300, ПЭГ-400 и ПЭГ-600 при термическом воздействии // Докл. НАН Украины. – 1994. – № 4. – С. 132–136.
7. *Мельникова А.М.* Разделение зарядов при кристаллизации // Кристаллография. – 1969. – 14, № 3. – С. 548–563.

Матеріал, захищений авторським правом

8. *Мюллер Э.В., Тьень Т.Ц.* Полевая ионная микроскопия, полевая ионизация и полевое испарение. – М.: Наука, 1980. – 220 с.
9. *Трохан А.М., Лапшин А.И., Гудзенко О.И.* Криолюминесценция жидкостей. // Докл. АН СССР. – 1984. – 275, № 1. – С. 83–86.
10. *Хайнике Г.* Трибохимия. – М.: Мир, 1987. – 282 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 14.01.97

О.В.ЗІНЧЕНКО

ПРО ЕЛЕКТРИЧНУ ПОЛЯРИЗАЦІЮ І ОПТИЧНЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛІВ ПІД ЧАС ОХОЛОДЖЕННЯ-НАГРІВАННЯ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків

Досліджена залежність інтенсивності оптичного випромінювання і електричної поляризації водних розчинів ПЕГ молекулярних мас 300, 400, 600, 1000, 2000 и 3000 від концентрації під час охолодження-нагрівання в діапазоні температур 0÷–196 °С. Виявлена симбатність у залежності інтенсивності ЕП и ОВ від концентрації. Отримані результати вказують, що виникнення ЕП матриці під час охолодження біологічних об'єктів є однією з причин кріопошкодження живих систем в твердій матриці.

A.V.ZINCHENKO

ON ELECTRICAL POLARIZATION AND OPTICAL IRRADIATION OF POLYETHYLENE GLYCOL AQUEOUS SOLUTIONS UNDER COOLING-HEATING

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

The dependence of optical irradiation (OR) and electrical polarization (EP) of aqueus solutions of PEG with molecular masses of 300, 400, 600, 1000, 2000 and 3000 intensity on the concentration under cooling-heating in temperature ranges from 0 to –196 °C has been investigated. Correlation has been discovered in the dependence of OR and EP on concentration, the results being explained by the fact that OR is the consequence of EP. The obtained results point to the fact that the rise of EP in matrix under biological objects freezing is one of the reasons of cryoinjury of live systems in solid matrix.

УДК 612.17:599.323.4:616.45-001/3

Н.Г.Сергиенко, Т.А.Ченчик

СПЕЦИФИЧНОСТЬ МЕХАНИЗМОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Изучено влияние экстремальных факторов на полифосфоинозитидный (ПФИ) цикл и энергетический обмен в сердце крыс различных линий. Выявлены отличия фракционного состава инозитолфосфатов (ИФ1, ИФ2, ИФ3), продуктов деградации полифосфатидилинозитольных липидов и энергетического обмена в сердце крыс, склонных к сердечно-сосудистым заболеваниям.

В последние годы гипотермия находит все более широкое применение в медицине [8]. Длительное воздействие экстремальных факторов, одними из которых являются действия низких температур и других видов стрессорного воздействия на организм могут вызывать существенные изменения в механизмах регуляции проницаемости мембран и трансмембранной сигнализации [1, 4].

В условиях стресса наибольшую опасность представляют нарушения жизненно важных систем организма, прежде всего сердечно-сосудистой. Как известно, сердце — это орган, наиболее часто повреждающийся при стрессорных реакциях различного типа [2, 7]. Проблема прогноза повреждения мышечных клеток сердца и степени посттравматического восстановления остается еще недостаточно изученной.

Матеріал, захищений авторським правом

Установлено, что ведущую роль в механизмах кардиотоксического действия стресс-реакции играют нарушения состояния регуляторных систем [6, 11]. Показано, что продукты распада фосфолипидов выступают в роли вторичных мессенджеров [9, 14], обеспечивающих механизм проведения специфического трансмембранного сигнала в клетку под влиянием различного рода стрессорных воздействий [12, 15]. Однако состояние системы ПФИ при действии экстремальных факторов в органах крыс практически не изучалось. Остаются неясными также причины индивидуальной устойчивости к стрессорным воздействиям. В этой связи перспективным являлось изучение состояния продуктов полифосфатидилинозитольного цикла и особенностей метаболических процессов в миокарде у животных различных линий при экстремальных воздействиях.

Работа выполнена на крысах популяции Вистар и Август обоего пола массой 180–220 г. Крысы с патологическими состояниями (опухоли, респираторные инфекции и т.д.) исключались из исследования. Из общей популяции крыс линии Вистар, предварительно тестированных в открытом поле, отбирали особей с низкой (группа Н) и высокой (группа В) возбудимостью нервной системы. После тестирования крысы находились в состоянии покоя в течение 2-х недель, после чего они подвергались стрессорному воздействию типа "конфликт афферентных возбуждений" (по Ф.П.Ведяеву) в течение 60 мин, забивали их декапитацией. Сердце извлекали на холоду, отмывали от крови охлажденным физиологическим раствором.

Экстракцию и разделение инозитолфосфатов производили по методу Berridge [10], хроматографию инозитолфосфатов — на колонке с дауэксом 2×4 200–400 меш в формиатной форме. Инозитолфосфатные эфиры элюировали ступенчатым градиентом (0,2, 0,4, 1,0 М-формиата аммония) порциями по 15 мл.

Элюэнты обессоливали добавлением дауэкса $50H^+$ (смолу затем удаляли фильтрованием). Экстракты лиофилизировали. Количественное определение фракций инозитолфосфатов производили по фосфору при помощи наборов фирмы "Boeringer". Активность ключевых ферментов гликолиза — гексокиназы (ГК) и фосфофруктокиназы (ФФК) в сердце определяли по стандартной методике. Энергообеспеченность клетки в митохондриальной фракции сердца изучали полярографическим методом [3]. Данные в дальнейшем обрабатывали статистически, достоверность различий средних значений определяли по критерию Стьюдента.

Таблица 1

Содержание изученных показателей в сердце крыс различных линий при действии экстремальных факторов ($M \pm m$; n= 6–10)

Показатель	Н		В		А	
	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс	Интактные	Стресс
ФЛ, нмоль/мг ткани	20,3±1,2	25,6±1,9	17,3±0,8	28,4±1,7	30,2±2,1	40,6±3,4
ФИ, нмоль/мг ткани	1,80±0,11	2,80*±0,21	2,21±0,13	4,36*±0,34	3,29±0,28	8,7**±0,55
Процент ФИ/ФЛ ткани	8,0	11,2	8,9	15,36	10,92	21,4
ИФ1, нмоль ИФ/мг ткани	0,722±0,015	1,56**±0,12	0,185±0,011	0,228*±0,013	0,019±0,001	0,062*±0,002
ИФ2, нмоль ИФ/мг ткани	0,082±0,004	0,119*±0,005	0,076±0,003	0,166*±0,009	0,61±0,002	0,072*±0,003
ИФ3, нмоль ИФ/мг ткани	0,049±0,002	0,057*±0,003	0,091±0,001	0,296*±0,015	0,228±0,010	0,327*±0,013
(ИФ1±ИФ2)/ИФ3	16,4	4,8	2,8	1,3	0,35	0,41
ГК, мкмоль НАДФН/мг белка/мин	10,81±0,93	17,60*±0,62	17,40±1,10	20,33*±1,70	20,44±1,65	38,22*±2,27
ФФК, мкмоль триоз/мг белка/мин	4,72±0,28	6,31*±0,33	6,26±0,39	10,51*±0,82	7,70±0,63	13,43**±1,14

Примечание. Разница достоверна относительно интактных крыс; * — p<0,05–0,02; ** — p<0,01–0,001.

Матеріал, захищений авторським правом

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что у интактных крыс линии Август (А) в миокарде наиболее высокое (по сравнению с другими изучаемыми группами) содержание ФЛ и соотношение ФИ/ФЛ (табл. 1). Следовательно, плазматические мембраны у крыс этой группы обладают меньшей вязкостью, большей текучестью и проницаемостью, чем у крыс групп В и Н. Это отражается и на конформационном состоянии белковой части мембран, на активности встроенных в мембрану ферментов. Изучение фракционного состава ИФ показало, что у интактных крыс групп В и Н преобладает фракция ИФ1, а у крыс группы А — фракция ИФ3. Соотношение (ИФ1 + ИФ2)/ИФ3 было высоким по отношению к группам В и А у крыс группы Н. Учитывая, что ИФ1 и ИФ2 — продукты метаболизма ИФ3, уровень метаболизма ИФ выше в сердце у крыс линии Август, так как ИФ1 и ИФ2 связаны с потенциалзависимым током кальция через мембрану [13], а ИФ3 — с выходом кальция из внутриклеточного депо, можно предположить, что у интактных крыс линии Август регуляция внутриклеточной концентрации кальция осуществляется преимущественно за счет выхода из цистерн саркоплазматического ретикулума, а у крыс групп Н и В — за счет поступления из межклеточного пространства.

Таблица 2

Интенсивность окислительного фосфорилирования в митохондриях сердца крыс линии Вистар (групп Н и В) и Август ($M \pm m$, n=5–7)

Группы животных	Скорость потребления [V1]мкА/мг, белка/ч	Дыхательный контроль V2/V3	Скорость фосфорилирования ADP/t	Активность гидролазной реакции V1/V3	$Ca^{2+}\backslash 0^{-}$
Н					
Интактные	4,50±0,31	5,21±0,32	0,07±0,001	1,21±0,09	3,72±0,23
Стресс	5,52±0,32*	4,00±0,21*	0,06±0,003*	0,50±0,02**	3,30±0,19*
В					
Интактные	5,72±0,53	3,70±0,19	0,05±0,001	0,35±0,02	5,01±0,33
Стресс	6,80±0,33*	2,91±0,11**	0,08±0,003*	0,43±0,031*	4,50±0,27*
А	5,23±0,16	4,00±0,27	0,07±0,002	0,28±0,01	5,47±0,21

Примечание. Разница достоверна относительно интактных крыс; * — p<0,05–0,02; ** — p<0,01–0,001.

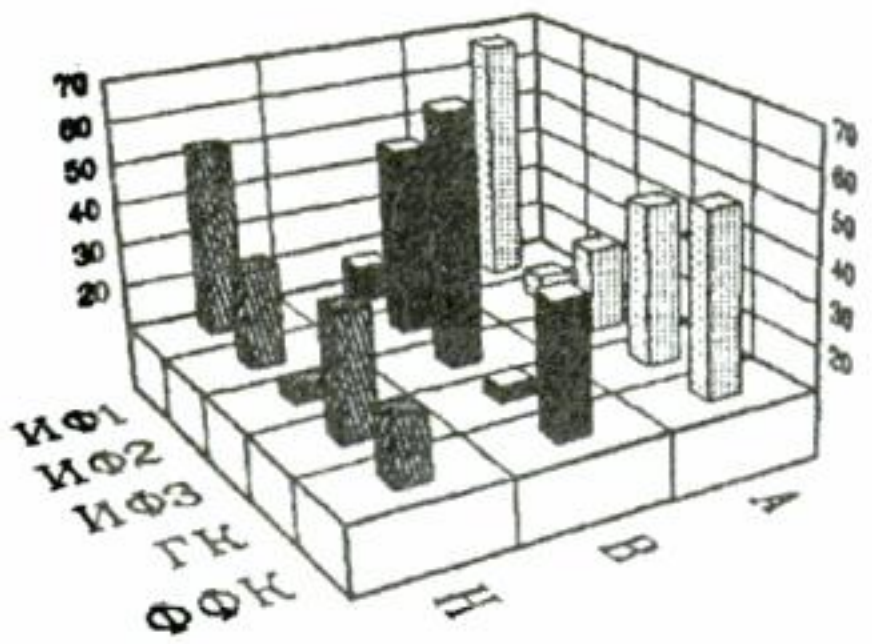
Изучение особенностей энергетического обмена у животных групп Н, В, А показало, что в миокарде животных линии Август активность ключевых ферментов гликолиза (ГК и ФФК) и скорость фосфорилирования в митохондриях (табл. 1, 2) у животных группы Н выше, чем у животных групп В и А. Однако дыхательный контроль выше у животных группы Н, а у животных групп В и А почти одинаков. Транспорт кальция в митохондрии у животных группы Н значительно ниже, чем у животных групп В и А. Следовательно, животные различных линий отличаются по интенсивности энергетических процессов в миокарде. В целом продукция АТФ в миокарде, а значит, и уровень обменных процессов выше у животных группы А.

При стрессе концентрация ИФ в миокарде животных всех групп увеличивается, причем у животных группы Н — в 2,5, группы В — 2, группы А — в 1,5 раза. Изменяется их фракционный состав: у крыс группы Н соотношение между фракциями сохраняется, у крыс группы В содержание ИФ3 увеличивается в 3 раза, а ИФ2 — в 2 раза, т.е. увеличивается процентное содержание ИФ3. У крыс группы А содержание ИФ1 увеличивается в 4 раза, ИФ2 — в 1,2 раза, ИФ3 — в 1,5 раза, но в процентном отношении преобладающей является фракция ИФ3. Оценка этих данных позволяет предположить, что у животных всех групп при стрессе увеличивается гидролиз фосфолипидов мембран.

Интенсивность обмена ИФ у крыс группы Н после стресса не меняется, а у крыс групп В и А увеличивается. Преобладание фракции ИФ3 и значительное увеличение фракций ИФ1 и ИФ2 у животных этих групп косвенно свидетельствуют о перегрузке кардиомиоцитов кальцием, что влечет за собой изме-

Матеріал, захищений авторським правом

нение сократительной способности миокарда. Известно, что ишемия уже небольшой продолжительности приводит к снижению сократительной функции сердца, которая определяется циклическими изменениями концентрации ионов кальция в миоплазме [5].



Изменение показателей в сердце крыс в условиях стресса (проц. в отношении к интактным крысам)

Изучение особенностей протекания энергетических процессов показало, что у животных всех групп после стресса увеличивается активность гликолитических ферментов, причем в наибольшей степени у животных группы А: активность ГК у них изменяется в 1,9 раза, а ФФК — в 2 раза. Интенсивность же окислительного фосфорилирования у животных снижается, причем в группе В больше, чем в группе Н. Вероятно, причиной этого является изменение фосфорилирования мембран и как следствие снижение дыхательного контроля (табл. 2, рисунок). Снижается также активность гидролазных реакций, т.е. в условиях стресса в миокарде животных увеличивается наработка АТФ за счет анаэробного гликолиза и снижается синтез АТФ аэробным путем. Так как энергетическая ценность гликолитических процессов гораздо меньше, чем окислительного фосфорилирования, можно предположить, что после воздействия экстремальных факторов в миокарде животных изучаемых групп создается дефицит АТФ, что может явиться причиной нарушения его функции. Вероятно, наибольшая степень риска повреждения миокарда у животных группы А, у которых уровень метаболизма и потребления АТФ выше, чем у животных групп Н и В.

Анализ полученных данных позволяет предположить, что сердечно-сосудистая система животных группы А обладает меньшей устойчивостью к действию экстремальных факторов, чем животных групп Н и В. По-видимому, особенности реакции внутриклеточных механизмов регуляции являются одной из основных причин, которые определяют низкую устойчивость животных к действию экстремальных факторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Антипенко А.Е.* Вторичные посредники в клетках сердца и гладких мышц сосудов // Биохимия. – 1991. – 56, № 4. – С. 589–621.
2. *Бровкович В.М., Никитченко Ю.В., Лемешко В.В.* Нарушение Ca^{2+}-транспортирующей функции и липидного компонента мембран саркоплазматического ретикулума при тотальной ишемии миокарда крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1987. – № 11. – С. 546–548.
3. *Кондрашева М.Н., Маевский Е.И.* Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. – М., 1978. – С. 5–14.
4. *Курский М.Д., Шмигер Г.Н., Воробец З.Д.* Влияние Ca^{2+}-фосфолипидзависимого фосфорилирования на пассивный транспорт кальция в сарколеме миокарда // Укр. биохим. журн. – 1989. – 61, № 6. – С. 60–65.
5. *Малая Л.Т., Белоус А.М., Ярмыш Н.В. и др.* Исследование структуры и функции Ca^{2+}-насоса саркоплазматического ретикулума при гипотермической ишемии миокарда крыс // Докл. АН Украины. – 1992. – № 2. – С. 144–147.
6. *Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., Шабунина Е.В. и др.* Стресс-лимитирующие системы организма и предупреждение фибрилляции сердца // Вестн. АМН СССР. – 1987. – № 6. – С. 47–53.
7. *Постнов Ю.В., Орлов С.Н.* Альтерация клеточных мембран как патогенетический фактор гипертонической болезни: роль нарушения внутриклеточного распределения кальция // Артериальная гипертензия. – М.: Медицина, 1980. – С. 183–191.
8. *Романец С.М.* Особенности действия мембранотропных препаратов на сердечный цикл в условиях общей гипотермии // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 2. – С. 45–48.
9. *Berridge M.J., Irvin K.F.* Inositol phosphates and cell signalling // Nature. – 1989. – 341, № 6201. – P. 197–205.

Матеріал, захищений авторським правом

10. *Berridge M.J.* Inositol triphosphates and diacylglicerol as second messengers // Biochem. J. – 1984. – 220. – P. 345–360.
11. *Edes J., Kranias E.G.* Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum function by phospholamban // Membrane Biochem. – 1987–1988. – 7, № 3. – P. 175–192.
12. *Knardahl Stein, Hendley Edith D.* Cardiovascular responsiveness to stress in relation to behavior and hypertension // Clin. and Exp. Hypertens. A. – 1991. – 13, № 5. – P. 873–874.
13. *Maclver D.H., Durkin H., Heagertu A.M.* Myocardial phosphoinositide metabolism a comparison with arterial smooth and skeletal muscle //J. Mol. and Cell. Cardiol. – 1990. – 22, № 3. – P. 3.
14. *Michell R.H.* Inositol lipids in cellullar signalling mechanisms // Trends Biochem. Sci. – 1992. – 17, № 8. – P. 274–276.
15. *Monton R., Huisamen B., Yordan N.M. et al.* Stimulation of phosphatidylinositol metabolism during-adrenergic stimulation and reperfusion metabolism during-adrenergic stimulation and reperfusion of ischaemic rat heart // J. Mol. and Cell. Cardiol. – 1990. – 22, № 3. P. 3–5.

Ин-т терапии АМН Украины, г. Харьков
Харьковский гос. мед. ун-т МЗ Украины

Поступила 27.12.96

М.Г.СЕРГІЄНКО, Т.О.ЧЕНЧИК

СПЕЦИФІЧНІСТЬ МЕХАНІЗМІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ В СЕРЦІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ВПЛИВАХ

Інститут терапії АМН України, м. Харків
Харківський державний медичний університет МОЗ України,

Вивчено вплив екстремальних чинників на поліфосфоінозитний цикл і енергетичний обмін в серці щурів різних ліній. Виявлені відміни фракційного складу інозитолфосфатів (ІФ1, ІФ2, ІФ3), продуктів деградації поліфосфатидилінозитольних ліпідів і енергетичного обміну в серці щурів, схильних до серцево-судинних захворювань.

N.G.SERGIENKO, T.A.CHENCHIK

THE SPECIFIC CHARACTER OF GEARS OF INTRACELLULAR REGULATION IN HEART OA RAT AT EXTREME INFLUENCES

Institute of Therapy AMS of Ukraine, Kharkov
Kharkov State Medical University Ministry of Health Care of the Ukraine

The influence of extreme factors on the polyphosphoinositide cycle and energetic exchange in heart of rats various lines is investigated. At action of extreme factors the differences of fracntion composition of inositolphosphares (IP1, IP2, IP3), degradation products polyphosphoinositide lipids and power-generating exchange in heart of rats, inolind to heart-vessel desease are revealed.

УДК 616.018.3:612.75

Н.Г.Малова

ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ КРИОВОЗДЕЙСТВИИ

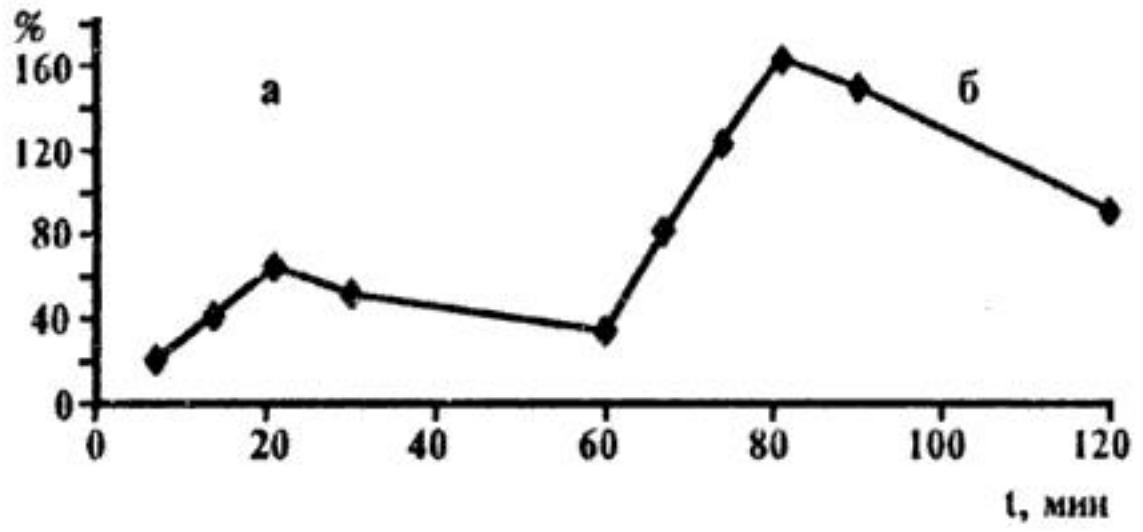
Изучены особенности репаративного остеогенеза при замедленной консолидации длинных костей с формированием ложных суставов в условиях локального криовоздействия. Установлено, что дополнительное повреждение структур ложного сустава приводит прежде всего к сосудистым реакциям гиперемического типа и на этой основе — к интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по остеогенному типу.

Проблема изучения процессов репаративного остеогенеза является одной из ведущих в ортопедии и травматологии, а поиск методов и способов его стимуляции был и остается актуальным направлением в биологии и медицине [3, 4, 6].

Экспериментально-клинические исследования, посвященные изучению особенностей репаративного остеогенеза, позволили установить его закономерности, а в ряде случаев по-новому подойти к возможностям регуляции процессов регенерации кости при переломах [1, 2, 5].

Матеріал, захищений авторським правом

Среди различных направлений особого внимания заслуживают методы локального криовоздействия [2, 7], так как они достаточно обоснованы в различных областях медицины и, в частности, в ортопедии и травматологии.



Относительный показатель остеогенной активности (ОПОА): *а* — ложный сустав аваскулярного типа; *б* — локальное криовоздействие на ложный сустав аваскулярного типа

В данной работе приведены результаты изучения локального криовоздействия при формировании ложных суставов у экспериментальных животных. Объектом модели являлся двукостный сегмент голени у 35 крыс. Формировалась зона перелома с диастазом между фрагментами до 0,5 мм диаметра кости, в который помещали этактиловую вставку, что обеспечивало сохранение подвижности отломков кости. Через 60 сут в зоне перелома определялась структура сформированного ложного сустава с характерными морфологическими признаками. Согласно морфометрическим данным из общей площади регенерата 3 % занимают деструктивно измененные ткани, 5 % — клеточно-волокнистая ткань, 23 % — хондроидная ткань, 19 и 50 % — мелко- и крупнопетлистая сеть костных трабекул соответственно. Относительный показатель остеогенной активности (ОПОА) при этом составляет 34,4, что свидетельствует о снижении регенерационной активности к этому сроку (рисунок, *а*). Локальное криовоздействие осуществляли с помощью аппарата "Криозонд КМ-22" с экспозицией 3 мин. Гистологические исследования срезов проводили, как описано в работе [6]. Выявлено, что на 67-е сутки после локального криовоздействия в интермедиальной зоне обнаруживалась выраженная гетерогенность структуры, так как наряду с дифференцированными структурами ложного сустава наблюдались участки вторично образовавшихся кровоизлияний, отека, дистрофически измененных клеток.

На 74-е сутки после локального криовоздействия рассасывание участков поврежденных тканей и сосудистая реакция приводят к интенсификации процессов десмо-, хондро- и остеогенеза, которые на гистотопограммах носят гиперпластический характер. Наибольшая интенсификация процессов остеогенеза обнаруживалась в области периостальных зон и в межбалочных пространствах мелкопетлистой сети костных трабекул.

На 81-е сутки в структуре ложного сустава выявляется увеличение дифференцированных структур, среди которых из общей площади 19 % занимает клеточно-волокнистая ткань с многочисленными сосудами, а 3 % — хондроидная ткань в виде отдельных участков, перестраивающихся в мелкопетлистую сеть (20 %) костных трабекул. На 90-е сутки обнаруживается формирование целостной структуры кости, в которой 39 % занимает мелкопетлистая сеть костных трабекул, преимущественно в области формирующегося костномозгового канала, а 42 % — крупнопетлистая сеть костных трабекул без четких границ, переходящая в формирующийся новообразованный кортикальный слой. На 120-е сутки обнаруживается целостная структура кости в зоне бывшего ложного сустава. В области костно-мозгового канала среди клеточно-жирового костного мозга выявляются участки мелкопетлистой (8 %) и крупнопетлистой сети (38 %) костных трабекул, которые подвергаются вторичной резорбции, а также определяется новообразованный кортикальный слой с несколько беспорядочной структурой костных каналов различного диаметра. Таким образом, на 120-е сутки формируется уже достаточно полноценная структура восстановленной кости с небольшим количеством резорбирующихся структур.

Матеріал, захищений авторським правом

Следовательно, дополнительное повреждение структур ложного сустава (рисунок 1, *б*), связанное с замораживанием-отогревом, приводит к сосудистым реакциям гиперемического типа, что способствует интенсификации пролиферативных реакций и процессов дифференциации по остеогенному типу. К 81-м суткам процессы перестройки сопровождаются трансформацией ложного сустава в гиперпластический тип, а к 90–120-м суткам — к восстановлению целости кости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Демичев Н.П.* Развитие криогенного метода в костной онкологии: Обзор // Вестн. хирургии им. Грекова. – 1987. – № 11. – С. 70–72.
2. *Колонтай Ю.Ю., Литвин Ю.П.* Применение холода в лечении повреждений опорно-двигательной системы // Ортопед., травматол. и протезир. – 1987. – № 8. – С. 61–66.
3. *Корж А.А., Белоус А.М., Панков Е.Я.* Репаративная регенерация кости. – М.: Медицина, 1972. – 132 с.
4. *Лиознер Л.Д.* Регенерация и развитие. – М.: Наука, 1982. – 167 с.
5. *Скляренко Е.Г., Бруско А.Т., Юрченко А.П.* Гистологические изменения в кости при криовоздействиях // Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур: Тез. докл. Всесоюз. симп. (Харьков, 1977). – Киев: Наук. думка, 1977. – С. 80–81.
6. *Ткаченко С.С., Руцкий В.В.* Локальное и опосредованное воздействие физических способов стимуляции репарации кости // Вестн. хирургии им. Грекова. – 1982. – 128. – № 6. – С. 88–92.
7. *Шумада И.В., Скляренко Е.Т., Пашков Б.П. и др.* Применение криогенных методов в травматологии и ортопедии //Ультразвук и криогенный метод в оперативной ортопедии. – Саратов, 1985. – С. 15–17.

Харьковский ин-т усовершенствования
врачей МЗ Украины

Поступила 30.10.96

Н.Г.МАЛОВА

ОСОБЛИВОСТІ ДЕСТРУКТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ І РЕПАРАТИВНИХ ЗМІН У КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ ПРИ ЛОКАЛЬНІЙ КРІОДІЇ

Харківський інститут удосконалення лікарів МОЗ України

Вивчено особливості репаративного остеогенезу при уповільненій консолідації довгих кісток з формуванням хибних суглобів в умовах локальної кріодії. Встановлено, що додаткове пошкодження структур хибного суглоба приводить перш за все до судинних реакцій гіперемічного типу і на цій основі — до інтенсифікації проліферативних процесів і процесів диференціації по остеогенному типу.

N.G.MALOVA

THE PECULIARITIES OF DESTRUCTIVE-DYSTROPHIAL AND REPARATIVE CHANGES IN BONE TISSUE AT LOCAL CRYOEFFECT

Kharkov Advanced Learning Institute for Doctors of Ukraine

The peculiarities of reparative osteogenesis in case of slow consolidation of long bones with the formation of false joints under conditions of local cryoeffect are studied. It has been studied that an additional injure of structures of the false joint provokes, first of all, vessel reactions of hyperemic type and on the basis, intensification of proliferative processes and the ones of differentiation of osteogenetic type.

УДК 612.111.22

Е.Е.Нипот

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ КАК ФАКТОРА, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ И ПОСТГИПЕРТОНИЧЕСКОМУ ЛИЗИСУ

Показано, что инкубация эритроцитов при низких температурах в гипертонических растворах неэлектролитов в значительной степени предотвращает развитие постгипертонического лизиса клеток при последующем их возвращении в изотоническую среду по сравнению с гипертониче-

Матеріал, захищений авторським правом

ской инкубацией при 37 °С. Установлено, что для предотвращения развития постгипертонического лизиса необходимо осуществлять гипертоническое воздействие при низких температурах. При этом протектирующий эффект низких температур слабо зависит от продолжительности гипертонической инкубации.

При переносе эритроцитов из гипертонических условий в изотонические необратимо повреждается часть клеток в результате постгипертонического лизиса (ПЛ) [3–6]. Величина ПЛ зависит от тоничности и состава сред дегидратации и регидратации [2, 4, 6], времени выдержки в гипертонических растворах и температурных режимов. При одинаковой тоничности дегидратирующих растворов экспозиция клеток при 37 °С приводит к значительно большему гемолизу при переносе клеток в изотонию, чем при 0 °С [1]. Это указывает на важную роль температурного фактора в гибели клеток на этапе ПЛ. Согласно модели, описанной в работе [2], чувствительность клеток к ПЛ, которую они приобретают при экспонировании в гипертонии при 37 °С, не должна изменяться, если до этого они в течение нескольких минут были выдержаны при 0 °С. Цель данной работы — проверить эту гипотезу исследованием зависимости ПЛ от времени инкубации в гипертоническом растворе сахарозы (1,2 М) при 37 °С в условиях предварительной экспозиции при 0 °С в этой же среде.

Эритроциты донорской крови трижды отмывали физиологическим раствором (10 мМ *трис*HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и хранили при 4 °С. 20 мкл осадка помещали в 200 мкл сахарозной среды (1,2 М сахароза, 5 мМ фосфатный буфер), предварительно нагретой до 37 °С или охлажденной до 0 °С, и перемешивали. При использовании охлажденного раствора пробирку с клетками либо сразу переносили в баню при 37 °С, либо выдерживали при 0 °С в течение 10 или 30 мин, а затем переносили в баню при 37 °С. Через определенные промежутки времени 4 мкл клеток из инкубируемой суспензии переносили в 2 мл физиологического раствора и кинетику ПЛ измеряли спектрофотометрически на длине волны 720 нм [3]. Степень ПЛ рассчитывали по формуле $ПЛ=(1-A/A_0)\times100\ \%$, где A — оптическая плотность исследуемого образца через 150 с после начала ПЛ (за это время ПЛ проходит практически полностью); A_0 — оптическая плотность контрольного образца при отсутствии ПЛ. Уровень гипертонического лизиса (ГЛ) измеряли при таких же условиях, как и уровень ПЛ, только к 2 мл физиологического раствора предварительно добавляли 1 мМ Zn^{2+}, который является блокатором ПЛ [4]. Это позволяло выделить в исследуемом образце популяцию клеток, пролизировавших в гипертонии, поскольку добавляемая концентрация Zn^{2+} полностью блокировала ПЛ. Степень ГЛ рассчитывали по формуле $ГЛ=(1-A/A_0)\times100\ \%$, где A — оптическая плотность исследуемого образца (в присутствии 1 мМ Zn^{2+} она практически не меняется во времени); A_0 — оптическая плотность контрольного образца при отсутствии ГЛ.

На рис. 1 изображена зависимость величины ПЛ эритроцитов от времени их инкубации в гипертонической сахарозе при 37 °С. Видно, что при предварительной инкубации при 0 °С ПЛ клеток в 2–3 раза меньше, чем без нее, несмотря на то, что в первом случае клетки находятся в гипертонических условиях более длительное время. Этот эффект практически не зависит от того, были ли клетки сразу же нагреты до 37 °С после помещения в 0 °С или же они некоторое время были преинкубированы при 0 °С перед нагреванием до 37 °С.

Противоположную направленность имеет влияние предварительной инкубации при 0 °С на гипертонический лизис в 1,2 М сахарозе при 37 °С. Из рис. 2 видно, что при инкубации до 1 ч уровень гипертонического лизиса как при наличии предварительной инкубации при 0 °С перед нагреванием суспензии клеток до 37 °С, так и без нее достоверно не различаются. При инкубации свыше 1 ч появляется небольшая, но достоверная разница в уровнях гипертонического лизиса пре- и непреинкубированных клеток. А именно преинкубированные при 0 °С клетки становятся менее устойчивыми к гипертоническому

Матеріал, захищений авторським правом

лизису, чем непреинкубированные, хотя обладают большей устойчивостью к ПЛ (см. рис. 1). Этот эффект также не зависит от времени выдержки клеток в гипертонии при 0 °С (данные не приведены).

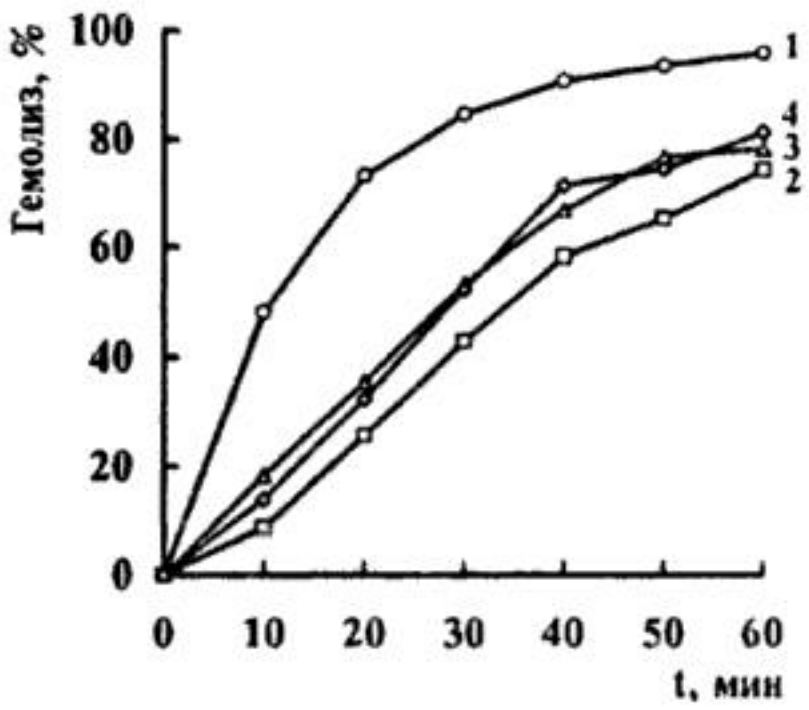


Рис. 1. Зависимость степени постгипертонического лизиса от времени инкубации в гипертоническом растворе сахарозы (1,2 М) при 37 °С: *1* — клетки не были преинкубированы при 0 °С; *2* — клетки помещены в раствор сахарозы при 0 °С и нагреты до 37 °С; *3* — клетки были преинкубированы при 0 °С 10 мин; *4* — клетки были преинкубированы при 0 °С 30 мин. Показаны средние значения из 4-х экспериментов

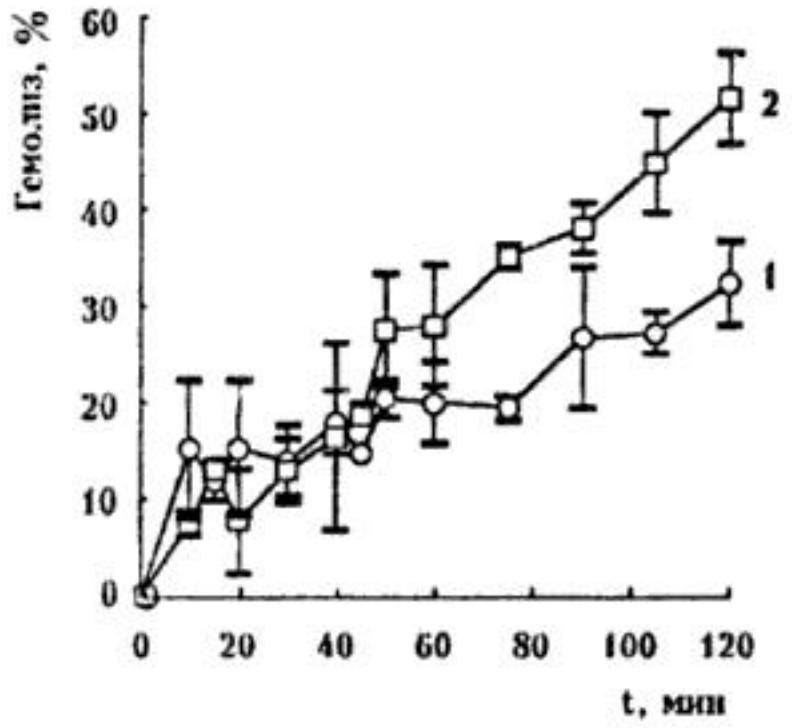


Рис. 2. Зависимость уровня гипертонического лизиса от времени инкубации в гипертоническом растворе сахарозы (1,2 М) при 37 °С: *1* — клетки не были преинкубированы при 0 °С; *2* — клетки помещены в раствор сахарозы при 0 °С и нагреты до 37 °С. Показан доверительный интервал для p=0,95

Из представленных данных видно, что температура, при которой осуществляется инкубация в гипертоническом растворе, первые 1–2 мин играет определяющую роль в развитии дальнейшего повреждения клеток в процессе их инкубации в гипертонии, поскольку клетки, предварительно инкубированные в гипертоническом растворе при 0 °С и затем нагретые до 37 °С, отличаются от непреинкубированных по чувствительности как к ПЛ, так и ГЛ. Этот результат не может быть представлен в рамках модели, описанной в [2], согласно которой устойчивость эритроцитов к ПЛ при 0 °С объясняется только медленным течением биохимических реакций, что приводит к созданию эластичных структур, включающих комплекс мембрана-цитоскелет-цитогель, в отличие от инкубации при 37 °С, в процессе которой формируются неоднородные дефектные структуры вследствие течения тех же реакций, но с большей скоростью. В соответствии с этим кратковременная инкубация при 0 °С практически не должна была бы влиять на процесс формирования таких структур при последующем нагревании и инкубации при 37 °С. Однако она оказывает существенное влияние на повреждение клеток при 37 °С.

По-видимому, процессы, протекающие за это время в клетке, определяют характеристики клетки, которые контролируют ее чувствительность к воздействию гипертонического раствора. Наиболее вероятно, что такими процессами являются обезвоживание и сопутствующая ему деформация клетки, которые, как известно, протекают очень быстро [5] и могут зависеть от температуры. Как следует из [5], скорость диффузии воды через плазматическую мембрану эритроцита меньше при более низкой температуре дегидратирующей среды, что предположительно может обеспечивать более мягкие условия для деформации клеток при дегидратации, а именно уменьшить скорость обезвоживания клетки. В зависимости от условий деформации дегидратированные клетки будут обладать различными характеристиками. Таким образом, температура дегидратации задает параметры клеток, которые определяют их чувствительность к ПЛ и ГЛ, модулируя последующий ход повреждения клеток при их инкубации в гипертоническом растворе. К таким параметрам, которые будут отличаться при высокой и низкой температуре, вероятно, можно отне-

Матеріал, захищений авторським правом

сти взаимную ассоциацию компонент мембраны, цитоскелета и цитозоля в момент дегидратации клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. и др.* Единый механизм повреждения клеток при термальном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
2. *Руденко С.В., Бондаренко В.А.* Роль изменения объема эритроцитов в постгипертоническом лизисе // Моделирование криобиологических процессов: Сб. науч. тр. – Харьков, 1988. – С. 55–66.
3. *Руденко С.В., Нипот Е.Е., Павлюк О.М.* Влияние ионов Zn на гемолиз эритроцитов, индуцированных мелиттином // Биохимия. – 1995. – 60, № 5. – С. 723–733.
4. *Руденко С.В., Папеларос С.В.* Активирующее и ингибирующее влияние двухвалентных катионов на постгипертонический гемолиз эритроцитов // Биол. мембраны. – 1995. – 12, № 4. – С. 374–384.
5. *Smoll W.S., Goldstein J.H.* The effect of changing extracellular osmolality on water transport in yhe human red blood cell as measured by the cell water residance time and activation energy of water transport // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – 640. – P. 430–438.
6. *Woolgar A.E., Morris G.J.* Some combined effects of hypertonic soluton and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells // Cryobiology. – 1973. – 10, № 1. – P. 82–86.
7. *Zode-oppen A.M.M.* Posthypertonic hemolysis in sodium-chloride systems // Acta Physiol. Scand. – 1968. – 73. – P. 341–364.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 14.01.97

О.Є.НІПОТ

РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРИ ЯК ФАКТОРА, ЯКИЙ ВИЗНАЧАЄ ЧУТЛИВІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ДО ГІПЕРТОНІЧНОГО І ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ЛІЗИСУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Показано, що інкубація еритроцитів при низьких температурах у гіпертонічних розчинах неелектролітів у значній мірі запобігає розвитку постгіпертонічного лізису при наступному поверненні клітин в ізотонічне середовище у порівнянні з гіпертонічною інкубацією при 37 °С. Установлено, що для запобігання розвитку постгіпертонічного лізису необхідно здійснювати гіпертонічний вплив при низьких температурах. При цьому проектуючий ефект низьких температур мало залежить від тривалості інкубації.

E.E.NIPOT

THE ROLE OF TEMPERATURE AS A FACTOR DETERMINING THE ERYTHROCYTES SENSITIVITY TO THE HYPERTONIC AND POSTHYPERTONIC LYSIS

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

It has been shown that the erythrocytes incubation at low temperatures in hypertonic solution of non-electrolyte prevents to a considerable extent the development of cell posthypertonic lysis at their following returning to isotonic medium in comparison with hypertonic incubation at 37 °C. It has been established, that it is nessesary to carry out the hypertonic influence at low temperatures.

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.17: 612.82: 591.4:616.45-001.1/.3

Т.А.Ченчик

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ИНОЗИТОЛФОСФАТОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ

Проведено сравнительное исследование фракционного состава инозитолфосфатов (ИФ): инозитолмонофосфата (ИФ1), инозитолбифосфата (ИФ2), инозитолтрифосфата (ИФ3) в структурах головного мозга крыс линии Вистар (низковозбудимые (Н) и высоковозбудимые (В)) и линии Август (А) в условиях действия стресса. Установлены особенности изменения фракционного состава ИФ как для каждой изучаемой структуры головного мозга, так и между группами крыс. Анализ полученных данных дает возможность предположить, что формирование физиологического ответа на действие стрессорных факторов в значительной степени зависит от генетических особенностей крыс.

У крыс экстремальные факторы воздействия, в том числе холод, вызывают комплексную, но однообразную нейроэндокринную активацию, характеризуемую мощной адренокортикальной секрецией и прекращением секреции соматотропного гормона [3, 4].

Установлено, что при воздействии на клеточную мембрану многих гормонов и нейротрансмиттеров активируется часть рецепторов, которые связаны с изменением метаболизма минорных компонентов мембран-фосфатидилинозитолов (ФИ) [12, 13, 18]. Активация метаболизма ФИ приводит к повышению концентрации в мембране и цитозоле различных продуктов превращения ФИ, из которых инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ3) и 1,2-диацилглицерол являются "вторичными мессенджерами" [14, 15, 17]. Продукты метаболизма ФИ способны индуцировать вход кальция из внешней среды по градиенту концентрации, выход кальция в цитозоль из внутриклеточных депо, а также активировать фосфолипид-зависимую протеинкиназу С [9, 16]. Эти процессы влияют на уровень фосфорилирования белка, что взаимосвязано с формированием физиологического ответа клетки под влиянием различного рода стрессовых воздействий [5, 11, 19].

Обнаружено, что полимерное состояние белков цитоскелета, играющего важную роль в стабилизации клеток к воздействию различных экстремальных факторов, и степень их ассоциации с мембранными структурами клетки регулируются несколькими системами контроля, одной из которых является система фосфоинозитидов [2]. Показана роль вторичных мессенджеров и цитоскелетных структур в избирательном транспорте из крови в мозг норадреналина и ацетилхолина при ритмичных холодовых воздействиях [1]. Выявлена взаимосвязь между состоянием липидного обмена и устойчивостью к стрессорным воздействиям [8].

Огромная роль в формировании и реализации стресс-реакции принадлежит структурам гипоталамуса и лимбической системы [7, 10]. В то же время состояние регуляторных систем и, в частности системы фосфоинозитидов, в этих органах остается мало изученным. Известно, что стресс выполняет роль своеобразного посредника между средой и генетическим аппаратом [6].

Цель работы — изучение особенностей состояния системы фосфоинозитидов в структурах головного мозга, ответственных за формирование стресс-реакции у крыс различных генетических линий.

Исследование выполнено на крысах-самцах линии Вистар (две группы) и линии Август (одна группа) с массой тела 160-180 г. Из общей популяции крыс линии Вистар, предварительно тестированных в открытом поле, отбирали особей с низкой (группа Н) и высокой (группа В) возбудимостью нервной системы. После тестирования крысы находились в состоянии покоя в течение 2-х недель, затем они подвергались стрессорному воздействию типа "конфликт афферентных возбуждений" (по Ф.П.Ведяеву) в течение 60 мин.

Матеріал, захищений авторським правом

Крыс забивали декапитацией, быстро извлекали головной мозг и на охлажденных пластинах (на льду), используя атлас "де Грота" головного мозга, выделяли следующие структуры: темпоральную кору, области миндалевидного комплекса , прозрачной перегородки, латерального (ЛТ) и вентро-медиального (В/М) ядер гипоталамуса, вентральный и дорсальный гиппокамп, области черной субстанции, голубого пятна, ядер шва и мезэнцефалической ретикулярной формации (МРФ). Сведения об экстракции и разделении инозитолфосфатов см. с. 82.

Выявлены различия в содержании ИФ1, ИФ2, ИФ3 в одноименных структурах мозга крыс изучаемых групп. Различия в соотношении фракций ИФ отмечаются также в отдельных структурах мозга в пределах каждой исследуемой группы крыс. У крыс группы Н по сравнению с одноименными структурами головного мозга животных групп А и В высокий уровень фракции ИФ1 обнаружен почти во всех изучаемых структурах, кроме областей, в которых локализованы основные моноаминоергические ядра: области ядер шва, черной субстанции и голубоватого пятна (рис. 1).

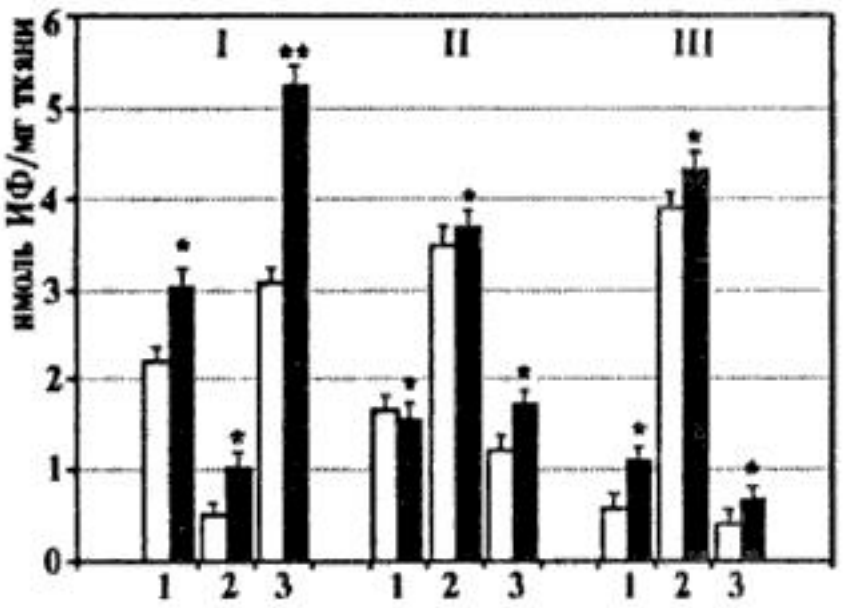


Рис. 1. Содержание инозитолмонофосфата (нмоль ИФ/мг ткани, n=5–7) в структурах головного мозга крыс различных групп: I – область голубого пятна, II – область ядер шва, III – область черной субстанции; 1 – низковозбудимые крысы линии Вистар, 2 – высоковозбудимые крысы линии Вистар, 3 – крысы линии Август. Белые столбики – интактные крысы до воздействия стресса, черные — после воздействия стресса. Степень достоверности результатов: * – P<0,05–0,02; ** – P<0,01–0,001

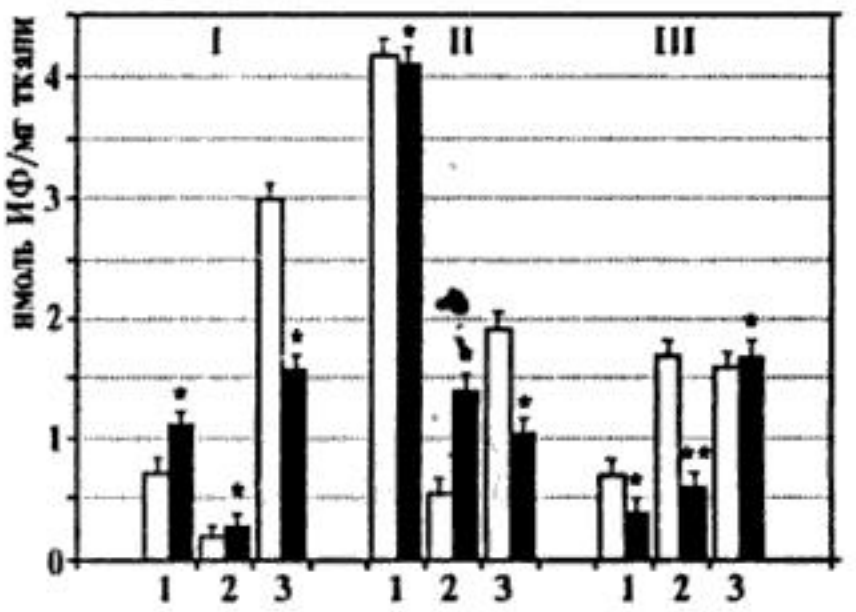


Рис. 2. Содержание инозитолбифосфата (нмоль НФ/мг ткани, n=5–7) в структурах головного мозга крыс различных групп: I – область голубого пятна, II – область ядер шва, III – область МРФ. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Как показали исследования, стресс приводил к изменению фракционного состава ИФ. Однако характер изменений был различным. Снижение фракции ИФ1 у крыс всех групп под влиянием стресса происходило в области прозрачной перегородки — структуре, предположительно являющейся связующим звеном между лимбической и экстрапирамидальной двигательными системами.

Наиболее вариабельной у всех исследуемых групп крыс оказалась фракция ИФ2. У крыс группы Н высокие уровни ИФ2 выявлены в областях ядер шва (4,17±0,37 нмоль ИФ/мг ткани), гиппокампа вентрального (5,14±0,43) и дорсального (1,67±0,03). Высокие концентрации фракции ИФ2 у высоковозбудимых крыс были обнаружены в областях прозрачной перегородки (6,03±0,48), вентро-медиальных ядер гипоталамуса (3,79±0,09), черной субстанции и мезэнцефалической ретикулярной формации (1,7±0,05). У крыс линии Август высокий уровень ИФ2 (рис. 2) находился в областях голубого пятна и латерального гипоталамуса (2,14±0,09).

Содержание фракций ИФ1, ИФ2 и ИФ3 у крыс группы Н после стресса уменьшалось в области ядер шва (основной серотонинергической структуре). У всех изученных групп крыс снижение фракции ИФ2 под влиянием стресса

Матеріал, захищений авторським правом

происходило в области вентрального гиппокампа, а у группы Н также снижался и уровень ИФ3.

Следует отметить, что в областях гиппокампа вентрального, прозрачной перегородки и мезэнцефалической ретикулярной формации у крыс линии Август снижение содержания ИФ2 после стресса было небольшим, однако в остальных структурах, где уровень ИФ2 падал, он снижался почти в 2 раза, а в области миндалины даже больше. Важно отметить, что самые низкие уровни фракции ИФ3 во всех изучаемых структурах головного мозга обнаружены у низковозбудимых крыс, а высокое их содержание характерно для высоковозбудимых крыс и крыс линии Август.

У группы Н высокие, по сравнению с другими изучаемыми структурами, уровни ИФ3 находились в областях гиппокампа вентрального и ядер шва. У высоковозбудимых крыс высоким содержанием ИФ3 отличались: области вентро-медиального и латерального ядер гипоталамуса, а также гиппокампа вентрального. Для группы А высокое содержание фракции ИФ3, по сравнению с другими изучаемыми структурами (рис. 3, 4), выявлено в областях гиппокампа дорсального и вентрального, а также в области ядер шва и мезэнцефалической ретикулярной формации (3,05±0,7).

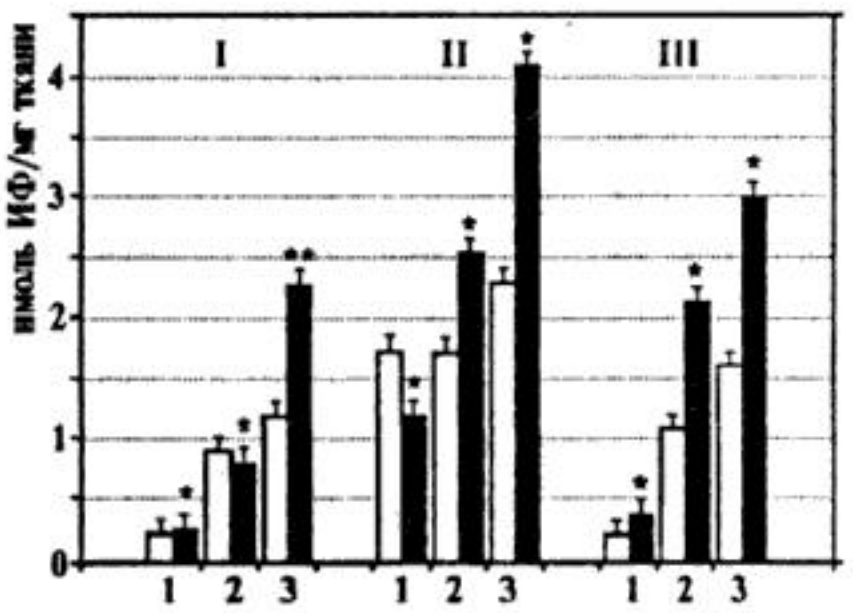


Рис. 3. Содержание инозитолтрифосфата (нмоль НФ/мг ткани, n=5–7) в структурах головного мозга крыс различных групп: I – область голубого пятна, II – область ядер шва, III – область черной субстанции. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

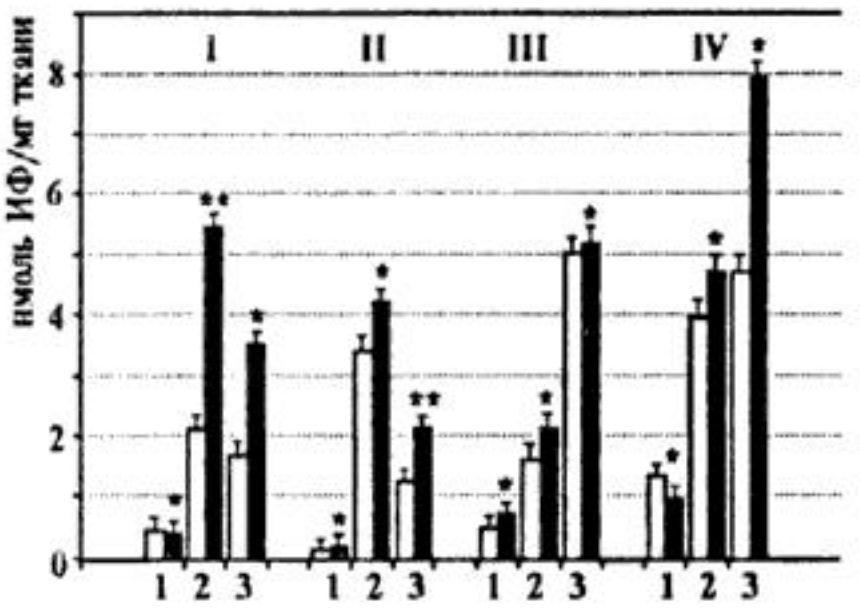


Рис. 4. Содержание инозитолтрифосфата (нмоль ИФ/мг ткани, n=5–7) в структурах головного мозга крыс различных групп: I – гипоталамус В/М, II – гипоталамус ЛТ, III – гипокамп Д, IV – гипокамп В. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Наибольшее содержание ИФ3 обнаружено у крыс группы Август, меньшее — группы В и еще меньшее — группы Н в ядрах, содержащих тела катехоламинергических нейронов: области голубого пятна и черной субстанции. В других исследуемых структурах мозга отмечалась та же закономерность.

Таким образом, у крыс групп А и В в структурах, связанных с формированием эмоционального состояния и регуляцией висцеральных функций, преобладает фракция ИФ3. Однако, как видно из рисунков, под влиянием стресса в большинстве структур головного мозга увеличивается содержание ИФ. Очевидна взаимосвязь между устойчивостью крыс к воздействию стресса и степенью фосфорилирования ИФ: у низковозбудимых крыс линии Вистар под влиянием стресса в основном возрастает содержание ИФ1 и ИФ2, а у высоковозбудимых крыс линии Вистар и крыс линии Август — ИФ2 и ИФ3.

Исходя из полученных данных о содержании фракций ИФ в структурах головного мозга низковозбудимых крыс в норме и при стрессе, можно предположить, что у этой группы крыс более высоким уровнем метаболизма ИФ характеризуются такие основные структуры лимбической системы, как области вентрального гиппокампа, вентро-медиальных и латеральных ядер гипоталамуса, а также область ядер шва.

По-видимому, такая взаимосвязь метаболизма ФИ- и НА-, СТ- и ДА-ергических нейромедиаторных систем гиппокампа вентрального, ядер шва, ги-

Матеріал, захищений авторським правом

поталамуса латерального и черной субстанции характерна для низковозбудимых животных. Выявленные нами уровни метаболизма ИФ характеризуют своеобразный уровень равновесия между влиянием возбуждающих и тормозных факторов между НА , ДА и СТ системами, т.е. повышение уровня одной и снижение другой — взаимокомпенсирующие эффекты.

Таким образом, крысы, отличающиеся высокой возбудимостью и выраженными реакциями сердечно-сосудистой системы на стресс, характеризуются большей выраженностью ИФ-зависимых процессов в центральной нервной системе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Марченко Л.Н., Алтуева Е.В.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 5. Гематоэнцефалический барьер как структурно-функциональное звено центральных нейротрансмиттерных механизмов терморегуляции // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 1. – С. 22–29.
2. *Белоус А.М., Семенченко О.А.* О возможном участии полифосфатидилинозитольного цикла в регуляции структурно-функционального состояния белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 4. – С. 3–11.
3. *Гладкова А.И., Алесина М.Ю., Литвинова Л.Б.* Гормональный гомеостаз в условиях разных видов стресса // Развитие физиологии в Украинской ССР за 1986-1990 гг.: Сб. материалов XIII съезда Укр. физиолог. об-ва им. И.П. Павлова. – Киев : Наук. думка, 1990. – С. 62.
4. *Гуляева Н.В.* Ауторегуляция свободнорадикальных процессов при стрессе — механизм, обеспечивающий адаптивные возможности мозга // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1994. – № 2. – С. 202.
5. *Комиссаров И.В., Абрамец И.И.* Модуляция эффективности межнейронных связей биорегуляторами и фармакологическими средствами. – Киев: Наук. думка, 1994. – 189 с.
6. *Маркель А.Л., Бородин П.М.* Стресс как фактор регуляции генетической изменчивости. Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. – Новосибирск: Наука, 1990. – С. 148–160.
7. *Несен К.И.* Роль лимбических структур в регуляции деятельности гипофиз-адреналовой системы // Пробл. физиологии гипоталамуса. – 1981. – Вып. 15. – С. 84–89.
8. *Овсянников С.Е., Никитченко Ю.В., Мазалов В.К., Луговой В.И.* Перекисное окисление липидов в динамике самоотогрева после острого охлаждения организма крыс // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 1. – С. 37–41.
9. *Расмусен Г.* Циркуляция кальция и внутриклеточная передача внешних сигналов // В мире науки. – 1989. – № 12. – С. 36–43.
10. *Сергиенко Н.Г., Грищенко В.И., Логвинова Г.А.* Биогенные моноамины и возбудимость головного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 148 с.
11. *Терновой В.А., Яковлев В.М.* Адаптационные и дезадаптационные изменения молекулярной структуры фосфолипидов в мембранах при низкотемпературных воздействиях // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция. – М., 1989. – С. 558.
12. *Швец В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В.* Миоинозит и фосфоинозитиды. – М.: Наука, 1987. – 248 с.
13. *Berridge M.J.* Cell signalling through phospholipid metabolism // J. Cell Sci. – 1986. – Suppl. 4. – P. 137–153.
14. *Berridge M.I., Irvin K.F.* Inositol phosphates and cell signalling // Nature. – 1989. – 341, № 6201. – P. 197–205.
15. *Ikeda M., Yoshida S., Busto K. et al.* Poliphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia // J. Neurochem. – 1986. – 47. – P. 123–132.
16. *Irvin R.F., Letcher A.J., Dawson R.M.C.* Phosphatidylino sitol-4,5-bisphospate phosphodiesterase and phosphomono esterase activities of rat brain i some properties and possible control mechanism // Biochem. J. – 1984. – 218. – P. 177–185.
17. *Michell R.H.* Inositol lipids in celullar signalling mechanisms // Trends Biochem. Sci. – 1992. – 17, № 8. – P. 274–276.
18. *Nathason J.A., Greergard P.* "Second messengers" in the brain // Sci. Amer. – 1977. – 237, № 2. – P. 108.
19. *Raskovsky S., Medina J.H.* Acute stress stimulates H-inositol phosphates accumulation in rat cerebral cortex // Funct. Neurol. – 1992. –7, № 4. – P. 309–313.

Ин-т терапии АМН Украины, г. Харьков
Харьковский гос. мед. ун-т МЗ Украины

Поступила 27.12.96

Матеріал, захищений авторським правом

Т.А.ЧЕНЧИК

СТАН СИСТЕМИ ІНОЗІТОЛФОСФАТІВ В УМОВАХ СТРЕСУ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ РІЗНИХ ЛІНІЙ

Інститут терапії АМН України, м. Харків
Харківський державний медичний університет МОЗ України

Проведено порівняльне дослідження фракційного вмісту інозитолфосфатів (ІФ): інозитолмонофосфату (ІФ1), інозитолбіфосфату (ІФ2), інозитолтрифосфату (ІФ3) у структурах головного мозку щурів лінії Вістар (низькозбудливих (Н) та високозбудливих (В)) і лінії Август (А)в умовах дії стресу. Встановлені специфічні зміни фракційного вмісту ІФ як для кожної структури мозку, що вивчається, так і поміж групами щурів. Аналіз отриманих даних дає можливість припустити, що формування фізіологічної відповіді на дію стресорних факторів у значній мірі залежить від генетичних особливостей щурів.

T.A.CHENCHIK

THE INOSITOLPHOSPHATES SYSTEM IN BRAIN STRUCTURES OF THE STRESSED RATS OF DIFFERENT GENETICAL LINES

Institute of Therapy AMS of Ukraine, Kharkov
Kharkov State Medical University Ministry of Health Care of the Ukraine

The comparative stady of inositolphosphates fractional contents (inositolmonophosphate, inositoldiphosphates, inositoltriphosphates) in the rat brains structures of the Vistar-line (with low and high exitability) and August-line rats under the stress condition has been conducted. We have found the specifical differences of the shifts of the investigated parameters (IP-fractions) in each studied brain structures and among the animals groups too. The analyses of the data obtaind makes it possible to of physiological answer to the stress-factors is strongly depended on the genetical especiallities of the animals.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 612.111+547.422

Л.А.Бабийчук

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КРИОПРОТЕКТОРА ПЭО-1500

Проведенные электронно-микроскопические и морфометрические исследования свидетельствуют о динамике ультраструктуры и направленности конформационных изменений эритроцитов в зависимости от режимов инкубации их с криопротектором ПЭО-1500. Показано, что у клеток, эквилибрированных с криопротектором при 22 °С, повреждения и необратимая трансформация переходных форм дискоцитов в гемолитические происходят уже во время эквилибрации клеток с криопротектором. Эквилибрация эритроцитов с ПЭО-1500 при 0 °С способствует сохранению нативной формы клеток, что может явиться важным фактором в сохранении стабильности клеток и в цикле замораживания-отогрева.

Изучение механизмов повреждения клеток при охлаждении и замораживании-отогреве показывает, что одной из важных цитоплазматических структур, обеспечивающих стабильность и нестабильность клетки, является система мембранных цитоскелетных белков [1–3]. При изменении температуры и добавлении к эритроцитам осмотически-активных веществ, в частности непроникающих криопротекторов, реакция белков цитоскелета проявится прежде всего в изменении объема и формы клеток [8].

Были проведены электронно-микроскопические и морфологические исследования эритроцитов, подвергнутых инкубации с криопротектором ПЭО-1500.

Материалом исследования служили эритроциты донорской крови человека, которые эквилибрировали с 30%-м криопротектором ПЭО-1500 на 0,01 моль/л фосфатном буфере, содержащем 150 ммоль/л NaCl при 22 или 0 °С.

Матеріал, захищений авторським правом

Криопротекторы вводили одномоментно или по каплям и выдерживали 40 мин при заданной температуре.

Ультраструктуру эритроцитов изучали согласно [4] и исследовали в электронном микроскопе ЭВМ-100 АК при ускоряющем напряжении 50 кВ. Морфометрический анализ плоских изображений сечений эритроцитов проводили в соответствии с рекомендациями [5].

При оценке конформационных изменений эритроцитов наиболее информативными являются следующие метрические характеристики [5]: больший линейный размер сечений эритроцитов, площадь среза и показатель фактора формы их сечения. Вышеперечисленные метрические показатели характеризуют динамику структурных изменений и деформируемость эритроцитов. Графики статистических распределений показателей факторов формы сечения эритроцитов имеют большое значение для оценки конформационных изменений клеток по типу "дискоцито-сфероцит" или "сфероцит-нормоцит" в условиях воздействия на клетку различных факторов криоконсервирования.

Внутреннее содержимое эритроцитов в норме представлено электронно-плотной массой, которая равномерно заполняет весь объем эритроцитов, а их популяция в норме состоит из многочисленных нормоцитов с характерными для них сечениями в форме "гантели", вытянутого эллипса, иногда диска, полудиска и кольца. Среди разнообразных по форме сечений определяются фигуры, полученные в результате срезов эритроцитов с отростками, эритроциты в форме "тутовой ягоды", куполообразных эритроцитов и деформированных сфероцитов. Кристаллы гемоглобина, "тени" эритроцитов не обнаружены.

Морфометрический анализ показал, что в условиях нормы диапазон линейных размеров (Д) сечений эритроцитов лежит в ограниченном интервале Д $\in$ (0,5–9,5) мкм (рис. 1, кривая *1*). Данный эмпирический график обладает выраженной левосторонней ассиметрией и характеризует логнормальный тип распределения диаметров сечения эритроцитов. Значения ординаты вершины кривой составляют 13,5 %, а абсцисса — 7,0 мкм.

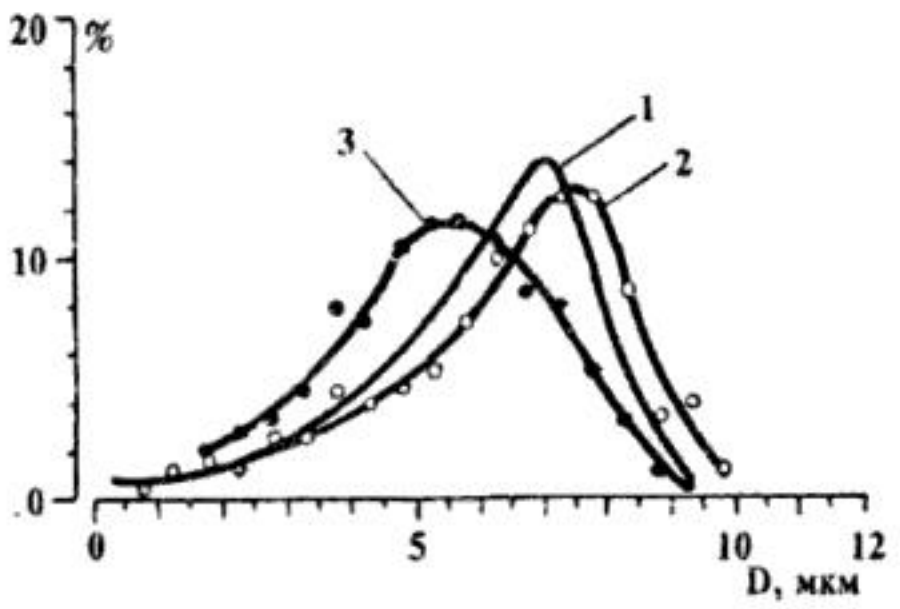


Рис. 1. График распределения эритроцитов в зависимости от величины большего линейного размера их сечений в норме (кривая *1*), после эквилибрации с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (кривая *2*) и при 22 °С (кривая *3*). По оси ординат — количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс — больший диаметр сечений эритроцитов, мкм

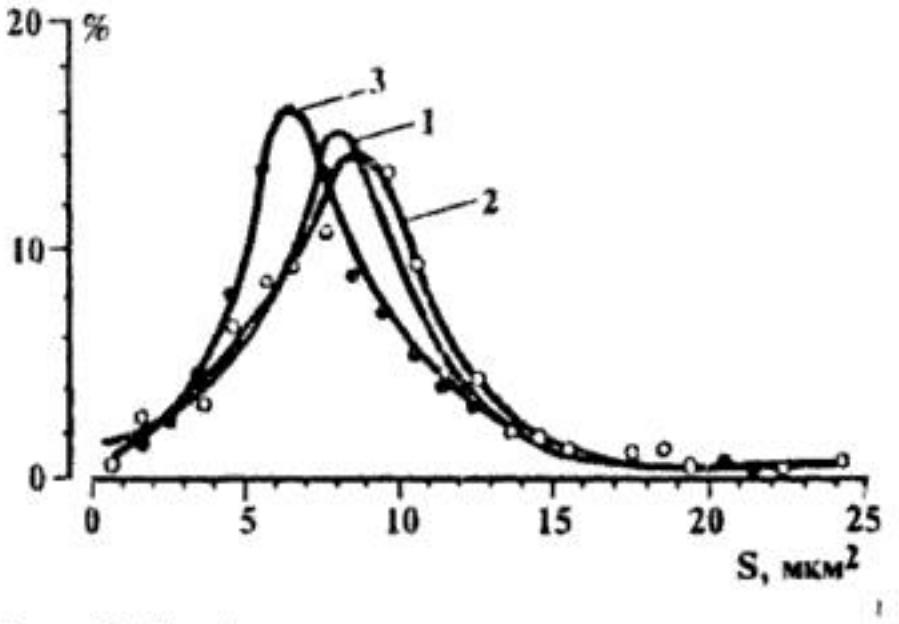


Рис. 2. График распределения эритроцитов в зависимости от величины площади сечений этих клеток в норме (кривая *1*), после эквилибрации с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (кривая *2*) и при 22 °С (кривая *3*). По оси ординат — количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс — площади сечений эритроцитов, мкм^2

Для получения информации о размерах сечения эритроцитов нами проведено исследование распределения их в зависимости от площади срезов (рис. 2, кривая *1*), которые свидетельствуют, что реальный диапазон площадей сечения эритроцитов лежит в ограниченном интервале S $\in$ (0,50–25,0) мкм^2. По кривым распределения полученных количественных данных определено, что наиболее вероятная площадь срезов эритроцитов 8,0+0,5 мкм^2. Фактор формы срезов λ в определенной мере характеризует степень их деформируемости.

Матеріал, захищений авторським правом

Так, при овальовидной и сферической формах клеток, когда λ=1,0, эритроциты утрачивают эластичность, теряют способность к деформации и разрушаются при механических воздействиях. Чем больше значение λ отличается от 1 (λ>1), тем большими потенциальными возможностями к деформации обладают эритроциты: растяжению, сжатию, сдвигу и изгибу. Из кривой распределения степени неравноосности срезов эритроцитов в норме (рис. 3, кривая *1*) следует, что диапазон цифровых значений показателя λ лежит в интервале $\lambda \in$ (1,0–8,5) усл. ед. При этом около 7 % всех сечений эритроцитов имеют фактор формы $\lambda \in$ (1,0–2,0) усл. ед., а срезы — форму овала и/или круга. Наиболее вероятным значением степени неравноосности сечения эритроцитов в норме является соотношение 4:1 (λ=4,0 усл. ед.).

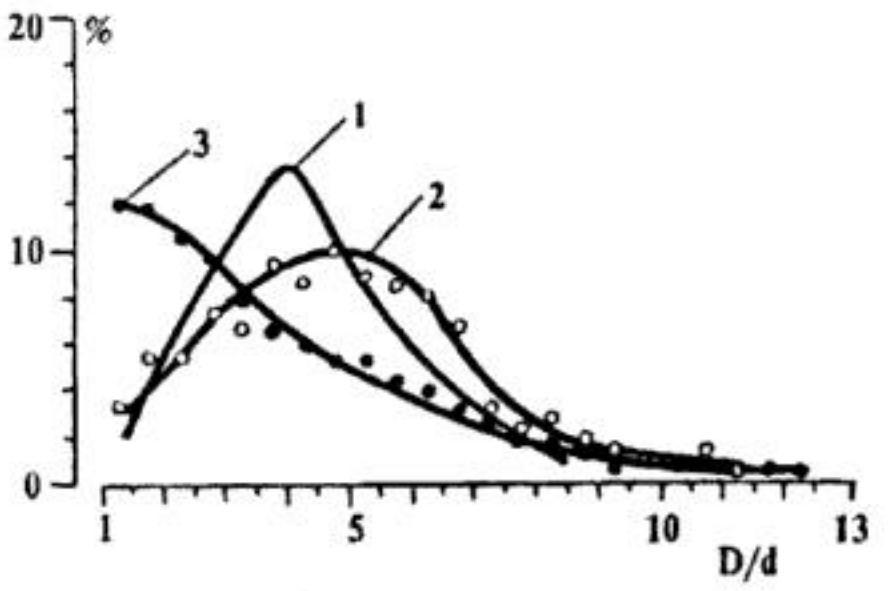


Рис. 3. График статистических распределений эритроцитов в зависимости от показателя фактора формы сечений этих клеток в норме (кривая *1*), после эквилибрации с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С (кривая *2*) и при 22 °С (кривая *3*). По оси ординат — количество сечений эритроцитов, %; по оси абсцисс — показатель фактора формы сечений эритроцитов, усл. ед.

Исследование ультраструктуры эритроцитов после эквилибрации их с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С показало, что в популяции эритроцитов возрастает общее количество нормоцитов. Сечения этих клеток имеют форму "восьмерки", вытянутого эллипса, "сигары". По сравнению с нормой имеется тенденция к "уплощению" эритроцитов, увеличению их большего линейного размера и одновременно к уменьшению толщины центральной зоны клеток. В отдельных полях зрения определяются сечения в форме диска и кольца.

Результаты морфометрических измерений (см. рис. 1, кривая *2*) свидетельствуют о том, что в условиях эквилибрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С наблюдается некоторое увеличение диапазона цифровых значений диаметра сечений клеток с Д $\in$ (0,5–9,5) мкм до Д $\in$ (0,5–10,0) мкм. Анализ сопоставления эмпирических кривых *1* и *2* позволяет предположить, что в условиях эквилибрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С наблюдается увеличение линейного размера сечений эритроцитов.

В условиях эквилибрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С наблюдается существенное уменьшение их линейных размеров, о чем свидетельствует характер распределения большего линейного размера сечений этих клеток (см. рис. 1, кривая *3*). Достоверно увеличивается количество эритроцитов, диаметр сечения которых принадлежит интервалу Д $\in$ ((1,75–5,5) мкм. Приведенные морфометрические данные свидетельствуют о том, что в условиях эквилибрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С уменьшаются линейные размеры клеток по сравнению с нормой.

При температуре эквилибрации 22 °С в популяции эритроцитов возрастает количество деформированных форм клеток, сечения которых имеют самые причудливые очертания. Анализ геометрии сечений эритроцитов позволяет заключить, что исследуемая эритромасса состоит из деформированных нормоцитов, куполообразных клеток, эритроцитов с гребнем, овалоцитов, клеток в форме "спущенного мяча". На ультратонких срезах выявляются эритроциты с различной толщиной ободка и центральной зоны клеток. Появление деформированных форм эритроцитов в исследуемой популяции клеток свидетельствует о повреждающем действии криопротектора ПЭО-1500 при 22 °С. Анализ эмпирических кривых распределений (рис. 2) позволяет заключить, что при 0 °С наблюдается некоторое увеличение цифровых значений

Матеріал, захищений авторським правом

площадей срезов эритроцитов. Сопоставление кривых *1* и *3* на рис. 2 позволяет заключить, что около 15 % эритроцитов, площади сечения которых в норме составляют 7,5–11,5 мкм^2, уменьшаются в размерах и площади их срезов "перемещаются" в интервал значений, равный 3,5–7,5 мкм^2.

Следовательно, субпопуляция эритроцитов с площадью сечения клеток, принадлежащих интервалу $S_2 \in (7{,}5–11{,}5)$ мкм^2, является наиболее лабильной при взаимодействии с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С.

Анализ эмпирических графиков (рис. 3) позволил установить, что в условиях эквилибрации эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С наблюдается существенное расширение диапазона цифровых значений показателя λ. Сопоставление кривых *1* и *2* позволяет заключить, что после эквилибрации клеток с криопротектором ПЭО-1500 при 0 °С у 15 % эритроцитов наблюдается обратная трансформация по типу "деформированный дискоцит–уплощенный нормоцит", что сопровождается увеличением цифровых значений показателя λ сечения этих клеток. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами с помощью растровой электронной микроскопии [6].

Таким образом, эквилибрация эритроцитов с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С оказывает на клетки неблагоприятное воздействие. В популяции этих клеток увеличивается количество сфероцитов и овалоцитов, возрастает объемная доля деформированных форм эритроцитов.

Уменьшение линейных размеров и площадей сечений эритроцитов, по сравнению с нормой, может свидетельствовать о частичной дегидратации этих клеток в условиях эквилибрации с криопротектором ПЭО-1500 при 22 °С. Эквилибрация эритроцитов с криопротектором при 0 °С способствует сохранению нативной формы клеток, что может быть связано с тем, что низкая температура "фиксирует" объем и форму белкового цитоскелета и приобретенная стабильность формы может сохраняться в цикле криоконсервирования.

Механизм, лежащий в основе изменений устойчивости клеток в процессе температурно-осмотического воздействия при 0 °С, может быть связан с усилением взаимодействия в системе гликофорин-белок полосы 4.1 вследствие дегидратации, вызванной добавлением ПЭО-1500. Это приводит к дополнительному "пришиванию" узлов спектрин-актиновой решетки к мембране [7]. Такого рода модификация структуры цитоскелета, приводящая к ограничению деформации клеток и компенсирующаяся повышением механической прочности [7, 9, 10], может иметь важное значение в механизме повышения устойчивости клеток к замораживанию-отогреву.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бабийчук Л.А. и др.* Единый механизм повреждения клеток при температурном шоке, замораживании и постгипертоническом лизисе // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 25–32.
2. *Бондаренко В.А.* Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1989. – 34 с.
3. *Белоус А.М., Гулевский А.К., Бабийчук Л.А. и др.* Роль белков цитоскелета в изменении стабильности клеток при температурно-осмотическом воздействии // Криобиология. – 1990. – № 4. – С. 3–14.
4. *Карулу В.Я.* Электронная микроскопия. – Киев: Вища шк., 1984. – 208 с.
5. *Автандилов Г.Г., Невзоров В.П., Невзорова О.Ф.* Системный стереометрический анализ ультраструктур клеток. – Кишинев: Медицина, 1984. – 166 с.
6. *Белоус А.М., Бабийчук Л.А., Землянских И.Г.* Влияние дозированной обработки полиэтиленоксидом м.м. 1500 на изменение формы и проницаемости плазматической мембраны эритроцитов // Докл. АН УССР. – 1989. – № 7. – С. 59–63.
7. *Конев С.В.* Структурная лабильность мембран и регуляторные процессы. – Минск: Наука и техника, 1987. – 240 с.
8. *Glaser H.* Factors influencing the form of human erythrocytes // Biophys. Membrane Transp. Sch. Proc. – Part 1. – Wroclaw, 1976. – P. 147–184.
9. *Cohen C.M., Foley C.F.* Spectrin dependent and independent association of F actine with the erythrocytes memebrane // J. Cell. Biol. – 1980. – 86. – P. 694–698.

Матеріал, захищений авторським правом

10. *Mohandas N.* Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeleton protein newtork // Phys. Med. and Biol. – 1988. – 33. – Suppl. № 1. – P. 354.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 29.01.97

Л.О.БАБІЙЧУК

КОНФОРМАЦІЙНІ ЗМІНИ ЕРИТРОЦИТІВ ПІД ВПЛИВОМ КРІОПРОТЕКТОРА ПЕО-1500

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Проведені електронно-мікроскопічні і морфометричні дослідження свідчать про динаміку ультраструктури і спрямованість конформаційних змін еритроцитів у залежності від режимів інкубації їх з кріопротектором ПЕО-1500. Показано, що у клітин, еквіліброваних з кріопротектором при 22 °С, пошкодження і необоротна трансформація перехідних форм дискоцитів у гемолітичні відбуваються вже під час еквілібрації клітин з кріопротектором. Еквілібрація еритроцитів з ПЕО-1500 при 0 °С сприяє збереженню нативної форми клітин, що може стати важливим фактором у збереженні стабільності клітин і у циклі заморожування-відігрівання.

L.A.BABIYCHUK

CONFORMATION CHANGES IN ERYTHROCYTES UNDER THE EFFECT OF PEO-1500 CRYOPROTECTANT

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

Conducted electron microscopic and morphometric studies testify to the dynamics of ultrastructure and direction of conformation changes in erythrocytes depending on their icubation regimens with the PEO-1500 cryoprotectant. It has been shown that in cells equilibrated with the cryoprotectant at 22 °C the damages and irreversible transfotmation of transitional forms of discocytes into hemolytic occur even during cell equilibration with cryoprotectant. Erythrocyte equilibration with PEO-1500 at 0 °C contributes to the preservation of cell native shape that may be consedered as an important factor for keeping cell stability and during the cycle of freeze-warming.

УДК 612.111:57.086.13

В.В.Кирошка

ЛИЗИС ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ХРАНЕНИИ В ПРИСУТСТВИИ ВИТРИФИЦИРУЮЩИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОНИКАЮЩИХ КРИОПРОТЕКТОРОВ

Изучено влияние витрифицирующих концентраций проникающих криопротекторов (этиленгликоля и 1,2-пропандиола) на эритроциты в условиях их гипотермического (4 °С) и низкотемпературного (–20 °С) хранения в зависимости от осмолярности и температуры насыщения. Установлено, что лизис клеток в этих условиях зависит от коэффициентов проницаемости используемых криопротекторов для клеток: чем выше коэффициент проницаемости, тем больше гибель клеток. Повышение осмолярности среды за счет увеличения концентрации NaCl усугубляет эффекты криопротекторов. Снижение температуры хранения уменьшает сенсибилизирующее действие витрифицирующих концентраций криопротекторов.

Одним из главных факторов, способных вызвать повреждение клеток, является повышение осмолярности, связанное с вымораживанием объемной воды при температурах, близких к эвтектическим [1, 3, 4]. Гибель клеток при действии высоких концентраций солей и неэлектролитов (включая высокие концентрации криопротекторов) зависит от осмотической дегидратации и сопутствующих изменений объема и формы клеток, а также от модификации структурного состояния комплекса цитоскелет-мембрана [1–3]. Степень указанных изменений во многом зависит от температуры, композиционного состава и осмолярности исходной среды. В то же время эти параметры могут изменяться за счет подбора состава среды, концентрации ее компонентов и

Матеріал, захищений авторським правом

скорости охлаждения. Важно иметь в виду, что осмотические эффекты, связанные с эвтектической кристаллизацией, могут быть предотвращены использованием высоких (витрифицирующих) концентраций криопротекторов [5, 6].

Нами был проведен анализ поведения эритроцитов в условиях их гипотермического (4 °С) и низкотемпературного (–20 °С) хранения в присутствии витрифицирующих концентраций криопротекторов в зависимости от концентрации NaCl в среде эквилибрации.

Эритроциты донорской крови человека, полученные по общепринятым методикам [2, 3], экспонировали в растворах этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД). Осмолярность среды варьировалась введением электролита (0, 25, 50, 100 мМ NaCl). Выход гемоглобина контролировали спектрофотометрически при длине волны 543 нм. Насыщение эритроцитов осуществляли при 4 и 37 °С ступенчато (10 → 20 → 40 → 60 %). Концентрация электролита на всех этапах насыщения была посточнной.

Результаты показали, что при гипотермическом хранении эритроцитов (4 °С) после их насыщения ЭГ при 37 °С (рис. 1, *а*) отмечается незначительный рост лизиса клеток в зависимости от концентрации Na^+ в наружной среде. Чем выше содержание Na^+, тем больше лизис клеток.

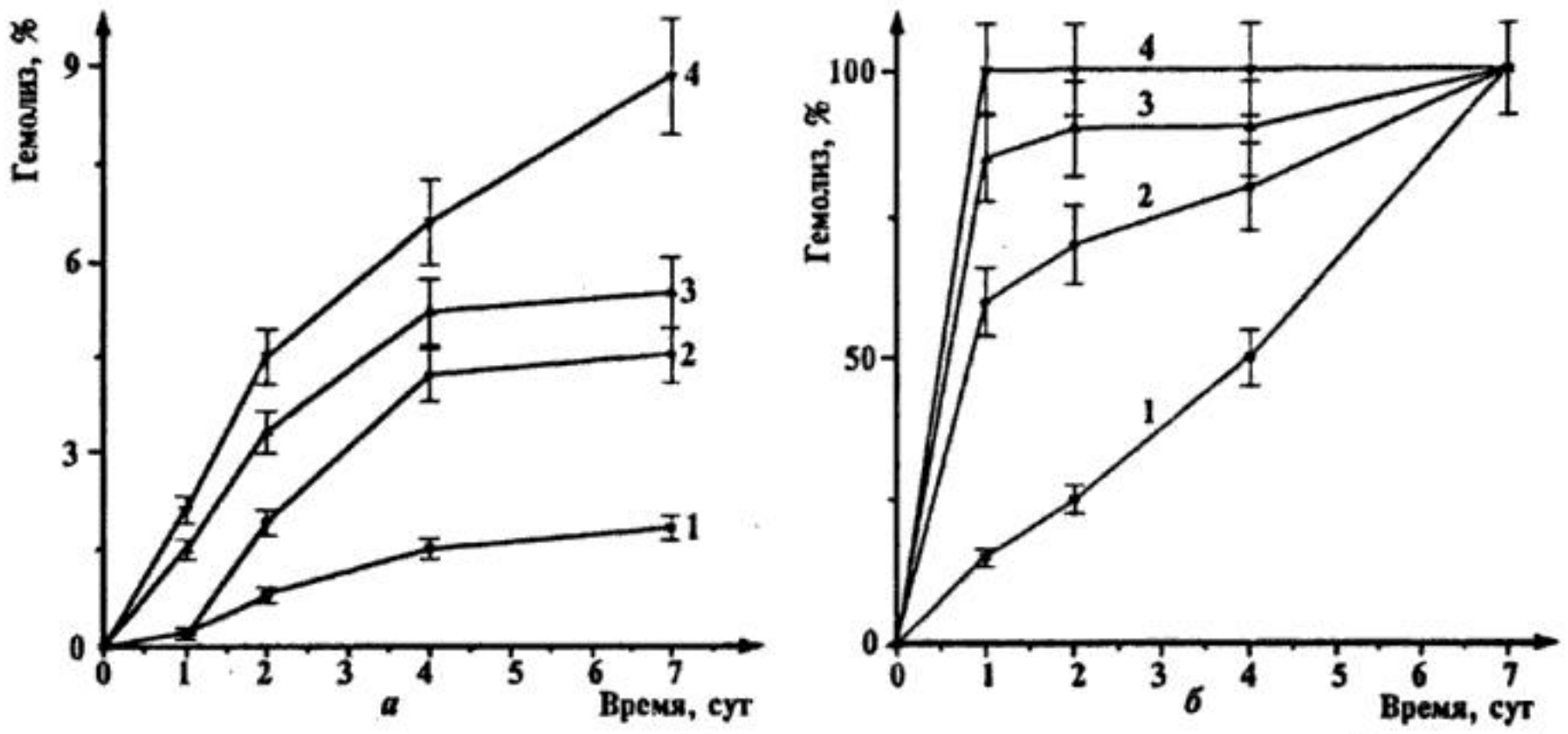


Рис. 1. Уровень гемолиза эритроцитов в условиях гипотермического хранения (4 °С) в витрифицирующих концентрациях: *а* — ЭГ, *б* — 1,2-ПД в зависимости от присутствия в среде насыщения при 37 °С KCl (150 мМ) и сахарозы (120 мМ) и различных концентраций NaCl (мМ): *1* — 0; *2* — 25; *3* — 50; *4* — 100

Этот фактор особо проявляется при замене ЭГ на 1,2-ПД, характеризующимся более высоким коэффициентом проницаемости [7] (рис. 1, *б*). Наиболее отчетливо различия в уровне лизиса клеток при изменении осмолярности среды видны при максимально используемых концентрациях внеклеточного Na^+. Так, на вторые сутки хранения в среде с минимальной осмолярностью (рис. 1, *б*, кривая *1*) лизис клеток составляет 30 %, а в средах, осмолярность которых возрастала за счет повышения концентрации NaCl в наружной среде, — 80–100 % (рис. 1, *б*, кривые *3–4*), к 4-м суткам хранения в средах, не содержащих NaCl в наружной среде (кривая *1*), лизис клеток составляет 75 %, а во всех остальных случаях достигает 90–100 %. К 7-м суткам в среде, не содержащей Na^+, остается 15 % сохранившихся клеток. Полученные результаты подтверждают роль исходной осмолярности среды насыщения и физико-химических характеристик используемых криопротекторов в контроле поведения клеток в условиях гипотермического хранения, оцениваемого по барьерной функции мембраны.

Снижение температуры гипотермического хранения до –20 °С (рис. 2, *а*) выявляет те же закономерности. Однако наблюдаемая картина позволяет го-

Матеріал, захищений авторським правом

ворить о том, что более низкие температуры хранения при одинаковом интервале времени сглаживают различия, зависимые от физико-химических характеристик используемых криопротекторов, и, помимо этого, пролонгируют во времени различия, обусловленные повышением концентрации Na^+ в среде насыщения и хранения. Так, при использовании 1,2-ПД (рис. 2, *б*, кривые *3–4*) при –20 °С не наблюдается резкого роста лизиса клеток на 4-е сутки, как это имеет место в условиях гипотермического хранения (4 °С). В этом случае уровень гемолиза эритроцитов на 7-е сутки хранения составляет 2–4 % (рис. 2, *б*, кривые *1–2*) и 10–16 % (рис. 2, *б*, кривые *3–4*), тогда как при 4 °С гибель клеток на 7-е сутки составляет 80–100 % (см. рис. 1, *б*).

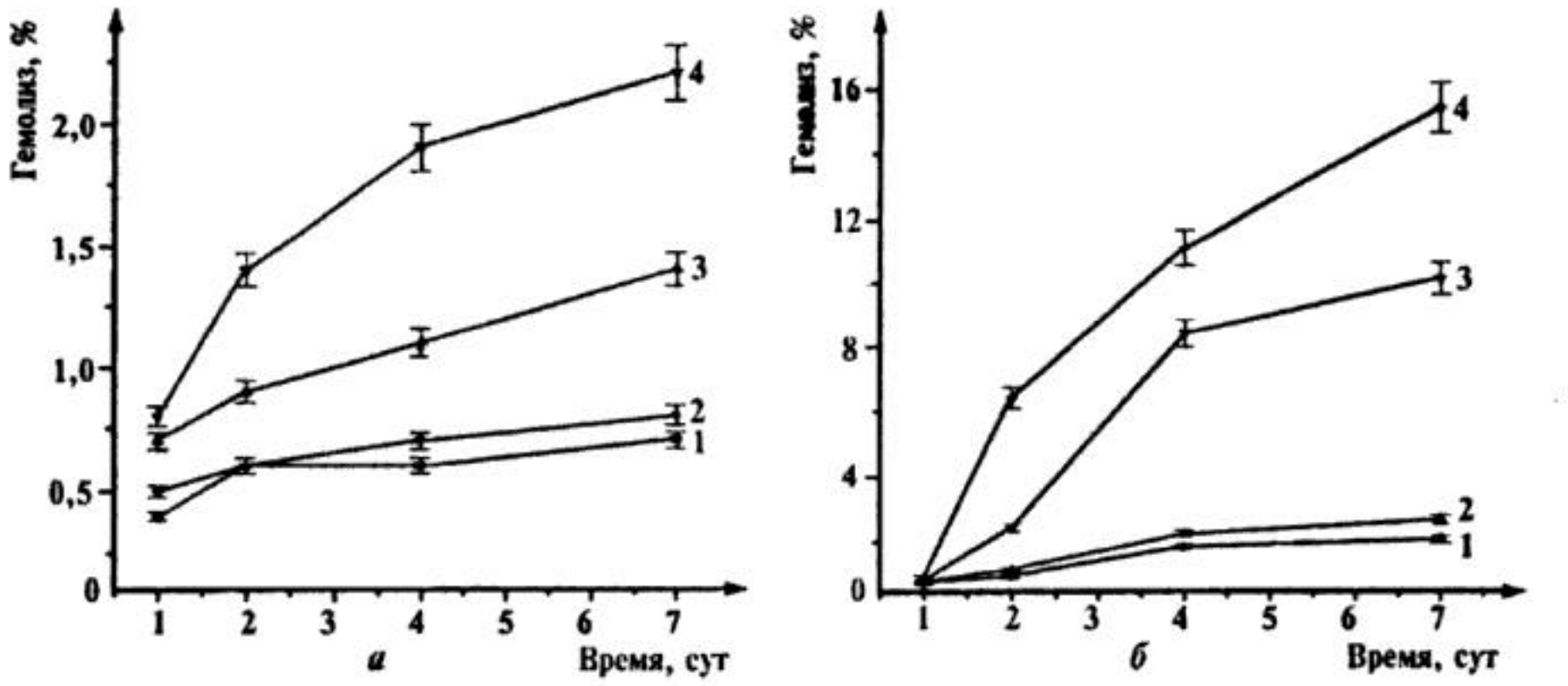


Рис. 2. Уровень гемолиза эритроцитов в условиях гипотермического хранения (–20 °С) в витрифицирующих концентрациях: *а* — ЭГ, *б* — 1,2-ПД в зависимости от присутствия в среде насыщения при 37 °С KCl (150 мМ) и сахарозы (120 мМ) и различных концентраций NaCl (мМ): *а* — 0; *2* — 25; *3* — 50; *4* — 100

При гипотермическом хранении эритроцитов после их насыщения при 4 °С (рис. 3) в тех же средах (рис. 1 и 2) в присутствии ЭГ не обнаруживается временная динамика гибели эритроцитов. Лизис эритроцитов на 7-е сутки практически не возрастает по сравнению с начальным этапом хранения (рис. 3, *а*, кривые *1–3*). Исключение составляет среда, включающая максимальную концентрацию NaCl (рис. 3, *а*, кривая *4*). Начиная со вторых суток хранения, отмечается рост лизиса клеток, который к 7-м суткам достигает 30 %, а в средах с меньшим содержанием ионов Na^+ в наружной среде — 4–10 %. Тенденция к росту лизиса в интервале концентраций NaCl (0–50 мМ) в наружной среде, а также возрастание гемолиза в 3 раза на 7-е сутки в среде с концентрацией NaCl, равной 100 мМ, свидетельствуют, что осмолярность исходной среды детерминирует поведение клеток в условиях насыщения и гипотермического хранения в средах с витрифицирующими концентрациями (60 %) проникающих криопротекторов. Следует отметить, что вклад этого фактора в значительной мере зависит от природы используемого криопротектора, что иллюстрируется данными (рис. 3, *б*), полученными при использовании 1,2-ПД. В отличие от ЭГ лизис клеток в средах с меньшей осмолярностью (рис. 3, *б*, кривые *1* и *2*) не проявляет временной зависимости в первые 4 суток хранения, однако к 7-м суткам он возрастает до 50–60 %. При увеличении осмолярности среды (50 и 100 мМ NaCl, рис. 3, *б*, кривые *3* и *4* соответственно) после двух суток хранения развивается лизис клеток, который к 7-м суткам хранения достигает 80–100 %. Больший коэффициент проницаемости 1,2-ПД по сравнению с ЭГ [7] на фоне роста осмолярности среды насыщения вызывает, очевидно, такие изменения структуры мембраны, которые приводят к гибели клеток.

Матеріал, захищений авторським правом

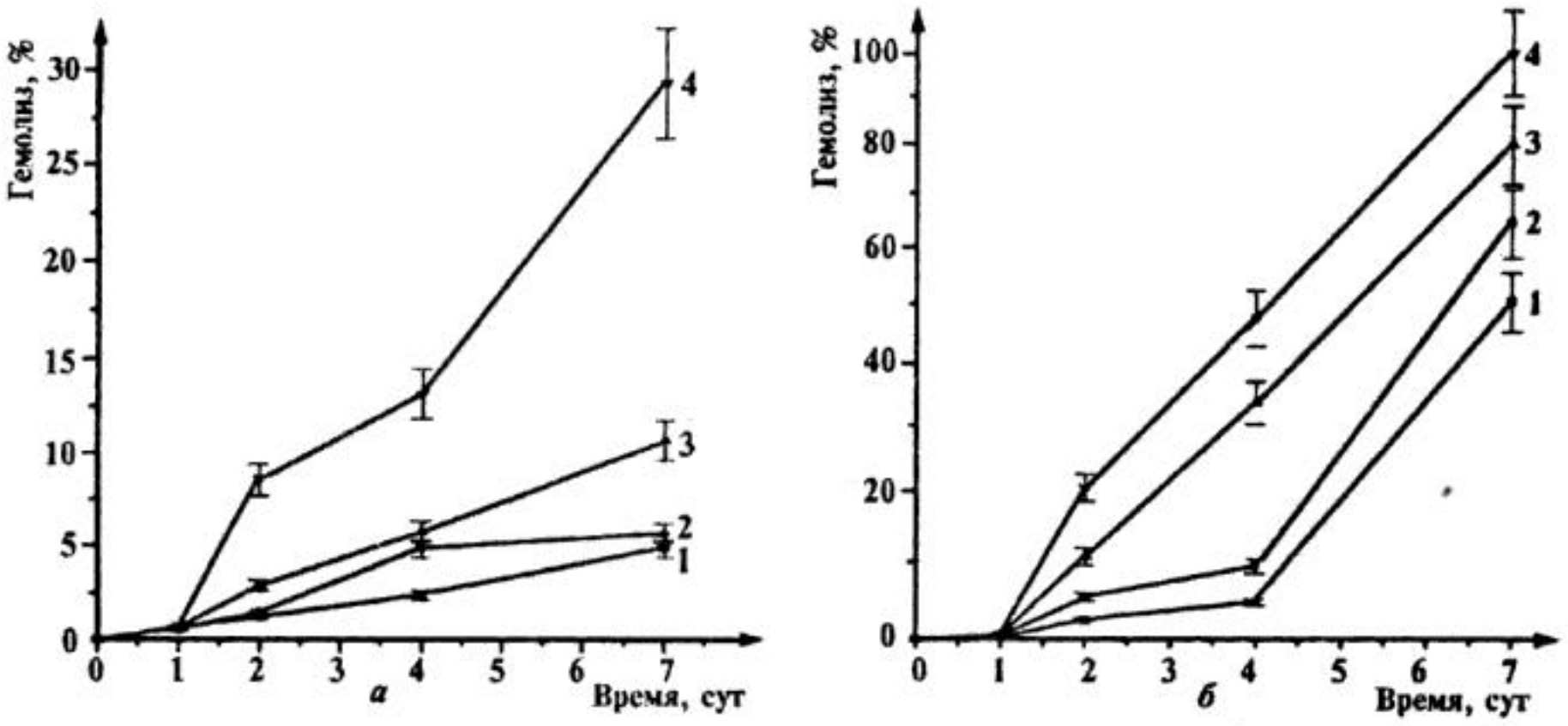


Рис. 3. Уровень гемолиза эритроцитов в условиях гипотермического хранения (4 °С) в витрифицирующих концентрациях: *а* — ЭГ, *б* — 1,2-ПД в зависимости от присутствия в среде насыщения при 4 °С KCl (150 мМ) и сахарозы (120 мМ) и различных концентраций NaCl (мМ): *1* — 0; *2* — 25; *3* — 50; *4* — 100

При низкотемпературном хранении (–20 °С) эритроцитов, насыщенных при 4 °С исследуемыми средами эквилибрации, гемолиз отсутствует на всех этапах хранения.

Известно, что лизис эритроцитов контролируется равновесием между двумя группами процессов [1, 2]. Первая включает процессы, связанные с формированием дефектов в структуре мембраны, эволюция которых способна привести к формированию трансмембранной поры. Лизис развивается тогда, когда пора достигает критического размера и увеличивается время ее жизни [2, 3]. Вторая — процессы, которые сопряжены со структурно-фазовыми переходами мембраны и изменением характера ассоциации ее компонентов. Их действие при отсутствии стабилизирующего влияния на пору периферических белков цитоскелета способно уменьшить время жизни поры и ее замыкание [1–3]. Насыщение эритроцитов высокими концентрациями криопротекторов характеризуется более низким уровнем лизиса клеток при 4 °С, чем при 37 °С. Это, по всей видимости, обусловлено тем, что при низкой температуре величина энергии, необходимая для формирования поры [1, 8, 9], значительно больше, чем при высокой. Если учесть, что критическим этапом лизиса эритроцитов является разрыв мембраны, тогда становятся понятны различия в поведении клеток, которые наблюдаются при одинаковых условиях, за исключением используемого криопротектора. В случае 1,2-ПД повреждения клеток в условиях насыщения более сильные, что можно объяснить более высоким коэффициентом проницаемости криопротектора, когда большее его поступление вызывает в конечном итоге набухание клеток, приводящее к разрыву мембраны.

Таким образом, можно сделать ряд выводов. Сохранность клеток при действии высоких концентраций проникающих криопротекторов связана с коэффициентами их проницаемости для клетки [7], а снижение температуры насыщения клеток позволяет снизить сенсибилизирующее действие высоких концентраций криопротекторов к последующим изменениям условий среды, сопутствующим гипотермическому и низкотемпературному хранению. Осмолярность среды имеет существенное значение и определяет состояние клеток при достижении предельных при данной экспериментальной постановке концентраций (60 %) криопротекторов.

Матеріал, захищений авторським правом

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. – Киев : Наук. думка, 1982. – 256 с.
2. *Бондаренко Т.П.* Осмолярность и температура как факторы, регулирующие чувствительность эритроцитов к охлаждению и осмотическому стрессу: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1995. – 48 с.
3. *Поздняков В.В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
4. *Поздняков В.В., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А.* Осмолярность среды как принцип устойчивости к замораживанию // Физико-химическое и биологическое действие криопротекторов. – Киев, 1990. – С. 124–130.
5. *Fahy G.M., Macfarlane D.R., Angell C.A. et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. //Cryobiology. – 1984. – 21, № 4. – P. 407–426.
6. *Fahy G.M., Saur J., Williams R.J.* Physical problems with vitrification of large biological system // Cryobiology. – 1990. – 27, № 5. – P. 492–510.
7. *McGrath J.J* 'embrane transport properties // Low tempera ture biotechnology. – 1988. – P. 273–321.
8. *Solomon A.K., Toon M.R., Dix J.A.* Osmotic properties of human red cells // J.Membrane Biol. – 1986. – 91, № 3. – P. 259–273.
9. *Watterson J.G.* A role for water in cell structure // Biochem. J. – 1987. – 248, № 2. – P. 615–617.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступила 08.10.96

В.В.КІРОШКА

ЛІЗИС ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ГІПОТЕРМІЧНОМУ ТА НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОМУ ЗБЕРІГАННІ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА УМОВ ПРИСУТНОСТІ ВІТРИФІКУЮЧИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПРОНИКАЮЧИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Вивчено вплив вітрифікуючих концентрацій проникаючих кріопротекторів (етиленгліколю та 1,2-пропандіолу) на еритроцити за умов дії гіпотермічного (4 °С) та низькотемпературного (–20 °С) зберігання в залежності від осмолярності та температури насичення. Встановлено, що лізис клітин у цих умовах залежить від коефіцієнтів проникності використовуваних кріопротекторів для клітин: чим вище коефіцієнт проникності, тим більше гине клітин. Підвищення осмолярності середовища за рахунок збільшення концентрації NaCl поглиблює ефекти кріопротекторів. Зниження температури зберігання зменшує сенсибілізуючу дію вітрифікуючих концентрацій кріопротекторів.

V.V.KIROSHKA

ERYTHROCYTE LYSIS AT HYPOTHERMIC AND LOW TEMPERATURE STORAGE IN THE PRESENCE OF VITRIFYING CONCENTRATIONS OF PENETRATING CRYOPROTECTANTS

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

The work is devoted to the study of vitrifying concentration of penetrating cryoprotectants (ethylene glycol and 1,2-propanedyol) on the erythrocytes under conditions of their hypothermic (4 °C) and low temperature (–20 °C) storage depending on osmolarity and temperature of saturation. It has been established that lysis of cells under these conditions depends on the coefficients of permeability of the cryoprotectants used for cells:the higher coefficient of permeability the higher cell's death. The increase in osmolarity of the medium aggravates the effects of cryoprotectants. Decrease in storage temperature reduces sensibilizyng action of vitrifying concentrations of cryoprotectants.

Матеріал, захищений авторським правом

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 57.043

Р.Моттерлини, Р.Форести, К.Дж.Грин.

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ БТШ32 (ГЕМ-ОКСИГЕНАЗЫ-1) В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СОСУДОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Гем-оксигеназа – белок (32 кДа), широко распространенный в клетках млекопитающих, представляет собой фермент, ответственный за диссимиляцию гема до биливердина и моноксида углерода. Очевидно предположение, что индуцируемая форма гем-оксигеназы (ГО-1) представляет собой белок теплового шока (БТШ32), который выделяется в стрессовых условиях и способный обеспечивать криозащиту от повреждения. Мы исследовали влияние гипоксии на активность и экспрессию ГО-1 в эндотелиальных клетках аорты быка. Клетки экспонировались в условиях гипоксии в герметичных камерах, обрабатываемых 95% N_2/5% CO_2, и хранились при 37 °С в течение разных периодов времени.

Выявлено, что активность эндотелиальной гем-оксигеназы повышалась от 226±38 до 1289±273 рМ билирубин/мг белок/ч спустя 12 ч гипоксии и достигала максимального уровня после 18 ч гипоксии (2425±157 рМ билирубин/мг белок/ч). Это воздействие было значительно ослаблено N-ацетилцистеином, предшественником глютатиона с антиоксидантными свойствами. Анализ Western blot и иммуноцитохимия обнаружили непосредственную связь между постепенным увеличением активности гем-оксигеназы и экспрессией в условиях гипоксии. Протопорфирин IX, конкурентный ингибитор гем-оксигеназы, полностью устраняет увеличение активности, но никак не воздействует на экспрессию белка ГО-1. Можно сделать вывод, что гипоксия индуцирует экспрессию стрессового белка ГО-1 в сосудистых эндотелиальных клетках и что это воздействие модулировано внутриклеточным уровнем соединений тиола. Данные результаты также предполагают, что экспрессия ГО-1 может рассматриваться как важный внутриклеточный показатель для определения ответной реакции на стресс в эндотелии тканей, подвергнутых низкому кислородному давлению.

Ин-т медицинских исследований Портвик Парк,
Хэрроу, Великобритания

Поступило 25.03.97

УДК 612.111:57.086.13

С.Х.Межидов

К КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЮ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

В настоящее время отсутствует единый подход в подборе исходной концентрации криопротектора в растворе для криоконсервирования. Чаще всего исходную концентрацию криопротектора выбирают для условий, при которых соотношение клеточная масса:раствор равно 1:(1÷3) [1, 4, 5]. Такой подход, по нашему мнению, недостаточно экономичен, что следует из уравнения баланса масс, устанавливающего связь между исходным количеством криопротектора с учетом его концентрации и конечной его концентрацией в водной фазе суспензии.

$$C_0 \times V_0 = C_s(V_0 + V_s), \quad (1)$$

где C_0 и C_s — исходная и конечная концентрации криопротектора в водных фазах; V_0 — исходный объем криоконсерванта; V_s — объем водной фазы в эритромассе (исходный), в котором растворен криопротектор. Конечная концентрация криопротектора

$$C_s = \frac{C_0 V_0}{V_0 + V_s}. \quad (2)$$

Из уравнения (2) видно, если увеличивать C_0, но добавлять раствор так, чтобы количество добавляемого криопротектора было постоянным, т.е. $C_0 \times V_0 = \text{const}$, то конечная концентрация криопротектора C_s будет увеличиваться, так как уменьшается знаменатель в силу уменьшения V_0 пропорционально увеличению C_0. Вполне понятно, что увеличение C_0 при постоянном значении C_s должно привести к уменьшению количества криопротектора, используемого для криоконсервирования клеток, однако характер этой зависимости не совсем ясен и его следует изучать.

В связи с этим исследована зависимость количества используемого криопротектора m от концентрации исходного раствора C_0 и соотношения объемов V_s/V_0 при определенных конечных концентрациях C_s. Для проведения такого исследования необходимо знать значения C_s и V_s. Для их определения использован метод добавки, суть которого состоит в том, что к эритромассе, содержащей воду с неизвестным объемом V_s, добавляют раствор криопротектора с известной концентрацией C_0 и объемом V_0. Если определить конечную концентрацию криопротектора C_s в надосадке суспензии клеток, то из уравнения (2)

Матеріал, захищений авторським правом

$$V_s = V_0(C_0/C_s - 1). \quad (3)$$

Концентрацию C_s определили методом ^1H-ЯМР при условиях, когда к эритромассе объемом 10 мл добавили раствор 1,2-ПД с исходной концентрацией C_0=50 % и объемом V_0=5,5 мл. Полученное значение C_s оказалось равным 24±1 %, а значение V_s из уравнения [3] было равно 0,6. Таким образом, доля растворителя от объема эритроцитов, принятого за 1, составила 0,6. Допущение, что это значение не меняется при изменении концентрации криопротектора, позволило построить указанную выше зависимость, используя формулы

$$V_0C_0 = m; \quad (4)$$

$$C_0 = C_s(1 + V_s/V_0). \quad (5)$$

Значения конечной концентрации C_s и отношения V_s/V_0, которые задавались для построения зависимости m, приведены в таблице, из которой видно, что по мере увеличения концентрации криопротектора в исходном растворе криоконсерванта уменьшается количество используемого криопротектора при одной и той же конечной его концентрации. Экономия криопротектора и других компонентов при этом достигает до 40 % по сравнению с методом, где криоконсервант добавляют 1:1. По остальным параметрам затраты на электроэнергию (стерилизация криоконсерванта и его хранение в холодильнике), тару и ее подготовку (количество тары и ее очистка) в 2 и более раза меньше.

Зависимость количества расходуемого криопротектора m от исходной концентрации C_0, объема добавляемого консерванта V_0 и конечной его концентрации в надосадке C_s

Соотношение эритромасса:консервант	V_s/V_0	C_s							
		10		20		30		40	
		C_0	m	C_0	m	C_0	m	C_0	m
1:3	0,2	12	36	24	72	36	108	48	120
1:1,5	0,4	14	21	28	42	42	63	56	84
1:1	0,6	16	16	32	32	48	48	64	64
1:0,6	1,0	20	12	40	24	60	36	80	48
1:0,5	1,2	22	11	44	22	66	33	88	44
1:0,4	1,5	25	10	50	20	75	30	100	40
1:0,3	2,0	30	9	60	18	90	27	...	

Использование такого подхода позволило создать экономичные и эффективные методы криоконсервирования эритроцитов при азотных и умеренно низких температурах [2, 3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Грищенко В.И., Воротилин А.М., Гучок В.М. и др.* Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта "Пропандиосахароль": Метод. рекомендации. – Харьков: МЗ СССР, 1990. – 12 с.
2. *Грищенко В.И., Межидов С.Х., Моисеев В.А. и др.* Технология криоконсервирования эритроцитов в полимерной таре одноразового применения при умеренно низких температурах // Тези допов. III Укр. з'їзд гематол. трансфузіол. (Київ, 18–20 травня 1995) – Київ, 1995. – С. 83.
3. *Межидов С.Х., Воротилін О.М., Мойсссв В.О.* Спосіб консервування еритроцитів. Заявка № 93060622. Публ. ПВ. – 1994. – № 1. – С. 6.
4. *Суханов Ю.С., Семенова Н.В., Азовская С.А.* Криоконсервирование и деглицеринизация эритроцитов, хранившихся в электрохолодильниках при –30 °С: Метод. рекомендации. – М.: МЗ СССР, 1987. – 29 с.
5. *Терехов Н.Т., Петров М.М.* Эффективные трансфузионные эритроцитные среды. – Киев: Здоров'я, 1990. – 166 с.

Ин-т проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Поступило 14.01.97

Матеріал, захищений авторським правом

РЕКЛАМА

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ "КРИОСПЕКТР" ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ НАН УКРАИНЫ —

единственная организация в мире, которая может предоставить Вам эмбриональные ткани, замороженные по технологии, разработанной ведущими учеными-криобиологами и защищенной патентами Украины.

Руководитель НПО — академик Национальной Академии наук Украины профессор Грищенко Валентин Иванович.

Мы являемся изготовителями криоконсервированных препаратов из гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека, эмбриональных нервных клеток, а также мягких тканей, биологически активных веществ, амниотической оболочки, ткани плаценты, ткани яичника, которые широко используются в гематологии, гинекологии, онкологии, ревматологии, нейрохирургии, иммунологии и др.

Показания к применению: врожденные нарушения стволовых кроветворных клеток, острые хронические лейкозы, анемия, миелосклеротические состояния, цитостатическая болезнь, первичные и вторичные иммунодефицитные состояния, в том числе с инфекционным процессом (сепсис), аутоиммунные патологии, опухолевый процесс, протекающий с миелокарцинозом, офтальмологические заболевания, первично выявленный сахарный диабет, нарушения половой функции у мужчин, яичниковая недостаточность, опухоли головного мозга, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона, детский церебральный паралич, болезнь Дауна у детей, травмы центральной и периферической нервной системы.

Оказываем услуги по предварительному отбору больных, их обследованию, а также проведению трансплантации на клинических базах: Институт общей и неотложной хирургии, Украинский НИИ клинической и экспериментальной неврологии и психиатрии, кафедра офтальмологии УИУВ, кафедра глазных болезней ХГМУ, кафедра нейрохирургии ХГМУ, кафедра детской гематологии (16-я детская клиническая больница), кафедра акушерства и гинекологии ХГМУ (5-й роддом) и, по желанию, в клиниках заказчика.

Предлагаемые препараты безопасны, проходят полный бактериологический и вирусологический контроль, обладают уникальными свойствами. Сохранность клеток и тканей при получении, криоконсервировании, хранении и высокая эффективность гарантируются разработанной нами биотехнологией, защищенной патентами Украины.

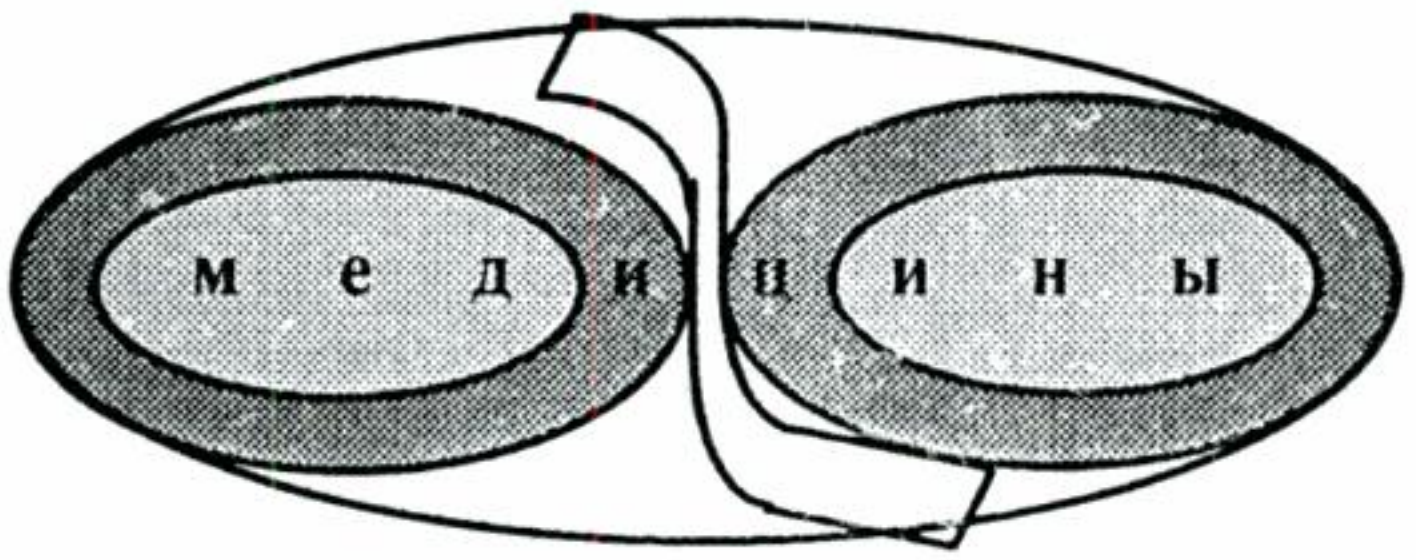
Мы работаем для каждого конкретного пациента. Будем рады научному и практическому контакту со всеми заинтересованными лицами.

Адрес: Харьков-15, ул. Переяславская, 23, ст. метро Холодная гора; трол. № 27, ост. ул. Елизарова

Контактные телефоны: 72-41-43, 72-10-39.

Матеріал, захищений авторським правом

УКРАИНСКИЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ



лицензия МЗ Украины №16088 - Ю Р

КОНСЕРВИРОВАНИЕ АЛЛО - КСЕНОКЛЕТОК

КОНСЕРВИРОВАНИЕ АЛЛО - КСЕНОТКАНЕЙ

в том числе **Ф Е Т А Л Ь Н Ы Х**

забор, препарирование, консервирование, сертификация согласно требованиям ***МЗ Украины*** *и* ***Европейской ассоциации тканевых банков*** *с соблюдением* ***Этического кодекса.***

ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ

ОБУЧЕНИЕ И ПОВЫШЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ

ПОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ

КЛЕТОЧНО - ТКАНЕВАЯ ТЕРАПИЯ

ИМПЛАНТАЦИЯ

Криоконсервированные биопрепараты из Украины

г. Харьков, т / ф (0572) 45-58-35

Матеріал, захищений авторським правом

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНЫ
НПО "КРИОСПЕКТР"

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

Уникальность биоматериала заключается в следующем:

— препарат является аналогом костного мозга. В одном образце содержатся стволовые кроветворные клетки, которые могут обеспечить кроветворение организма в течение всей жизни;

— клетки имеют пролиферативную активность в десятки раз выше, чем у костного мозга;

— эмбриональные кроветворные клетки не несут на своей поверхности антигены второго класса гистосовместимости, что делает их иммунологически толерантными к реципиенту;

— высокая чувствительность к гуморальным факторам, стимулирующим их пролиферацию, позволяет в короткий срок (5–7 дней) восстановить дефицит клеток эритроционного или миелоидного ростка кроветворения;

— наличие биологически активных веществ (эритропоэтина, α-фетопротеина, интерлейкинов и др.) делает препарат эффективным при снижении функциональной активности клеток, органов и тканей стареющего и пораженного организма;

— препарат обладает противоопухолевым действием в связи с наличием в нем α-фетопротеина;

— малые (1,5–4,5 мл) объемы вводимых клеток и отсутствие побочных реакций. Возможно дробное введение препарата по мере необходимости;

— клетки могут быть использованы в качестве объекта для генной технологии.

Эффекты, возникающие после трансфузии клеток:

— восстановление нарушений гемопоэза различной этиологии;

— снятие синдрома хронической усталости;

— улучшение эластичности сосудов и реологических свойств крови;

— улучшение функций внутренних органов (печени, сердца, почек, желудочно-кишечного тракта) и повышение аппетита;

— снятие остеохондрозных болей;

— устранение одышки;

— повышение мужской потенции;

— улучшение памяти.

Полученный нами материал абсолютно безопасен, проходит полный бактериологический и вирусологический контроль, обладает уникальными свойствами. Его получение и хранение гарантируется разработанной нами биотехнологией, позволяющей сохранить высокую функциональную активность клеток.

Клетки могут быть поставлены в криоконсервированном варианте. Мы можем предоставить Вам эмбриональные трансплантаты для пробного клинического применения.

Были бы рады научному и практическому контакту.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

— острые и хронические лейкозы, гранулоцитоз, гипо- и апластические анемии, глубокие железо-, B_{12}-, фолиеводефицитные анемии, миелосклеротические состояния;

— цитостатическая болезнь, включающая радиационные поражения;

— иммунодефицитные состояния, в том числе сопровождающиеся инфекционным процессом (сепсис), врожденные иммунодефицитные состояния; аутоиммунные патологии;

Матеріал, захищений авторським правом

— опухолевый процесс, протекающий с миелокарцинозом, а также угнетением противоопухолевого иммунитета;

— диффузные заболевания соединительной ткани, требующие иммунокоррекции;

— офтальмологические заболевания;

— синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания;

— первично выявленный сахарный диабет.

ФОРМА ПРИМЕНЕНИЯ. Гемопоэтические клетки предлагаются в дозах по 1–1,5 мл, количество клеток от 5 до $50x10^6$/мл, КОЕ-ГМ — от 3 до $60x10^3$ в жидком азоте при –196 °С .

Замораживание клеток проводится по специальной программе, обеспечивающей их высокую функциональную активность.

Материал проходит полный вирусологический, микоплазменный и бактериологический контроль.

Адрес: Харьков-15, ул. Переяславская, 23, ст. метро Холодная гора;
трол. № 27, ост. ул. Елизарова

Контактные телефоны: 72-41-43, 72-10-39.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1:2 1997

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

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

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to
Editor-in Chief V.I.Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of the Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84

1997. №1-2. 1-108 ИНДЕКС 70474
ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ.