



ISSN 0233-7673

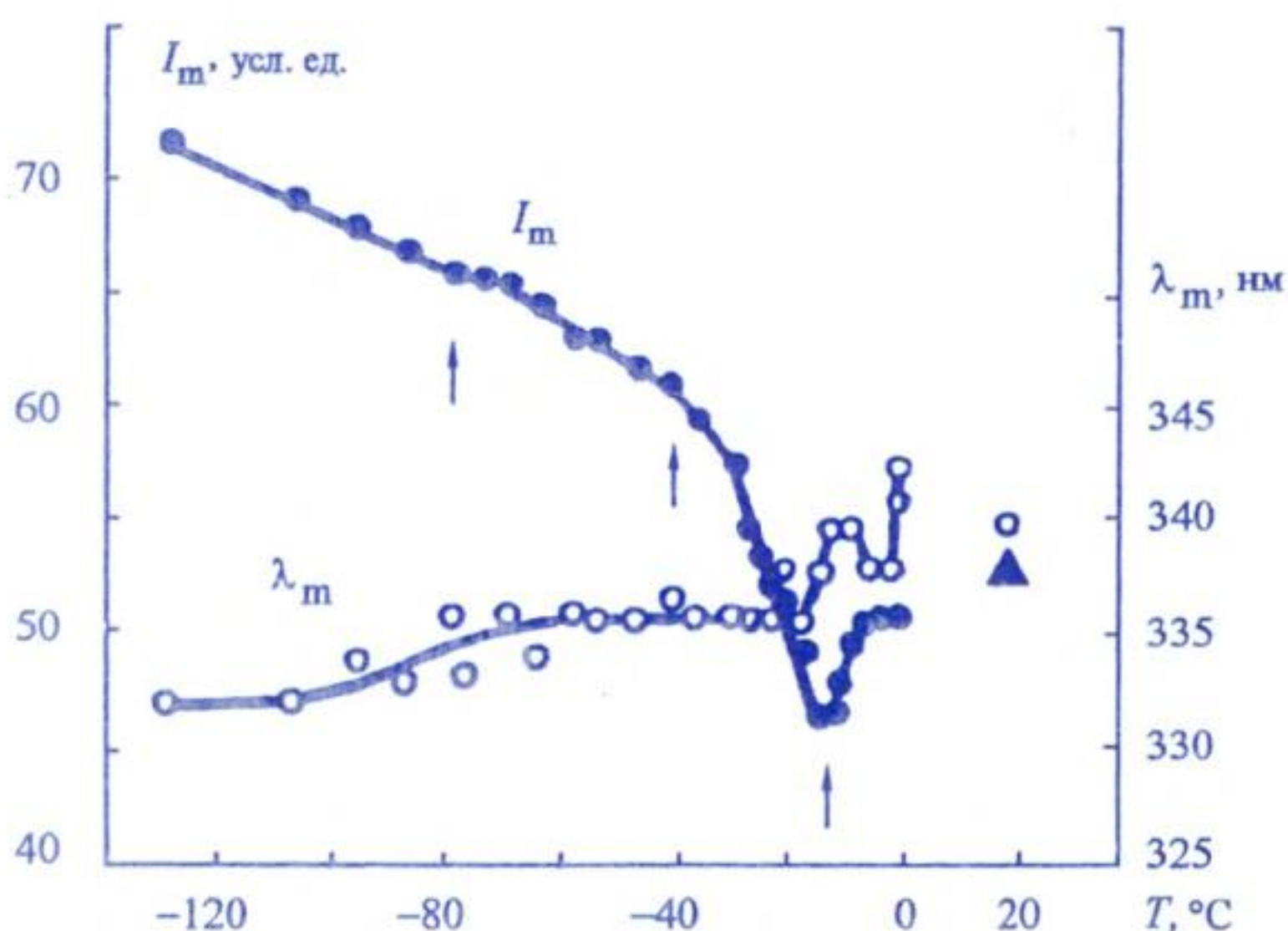
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ  
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1993

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ  
МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ *О.А.Нардид, С.В.Репина, Т.С.Дюбка*

УСЛОВИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ  
ПРИ 4°C *Л.П.Кравченко, А.Н.Андриенко*

ИССЛЕДОВАНИЕ НА-ТИПИРОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ И  
СОЗДАНИЕ БАНКА СТЕВЛОВЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

*Ма Ен-пу, Лю Ан, Вей Хан-донг, Ву Чу-це, Конг Фан-хуа, Джин Ли*

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), А.М.Гурин (Минск), Г.Ф.Жегунов (Харьков), В.Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (ФРГ), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (ЧСФР), Е.Я.Панков (Харьков), Ю.Ф.Пастухов (Санкт-Петербург), Ф.А.Приходько (ответственный секретарь, Харьков), Н.С.Пушкар (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.M.Gurin (Minsk), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (CSFR), H.T.Meryman (USA), E.Ya.Pankov (Kharkov), Yu.F.Pastukhov (Sankt-Petersburg), F.A.Prihodko (Executive Secretary, Kharkov), N.S.Pushkar (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

#### 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

# 1

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ  
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОСНОВАН В 1985 ГОДУ  
ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

1993

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Загоруйко Г.Е.</i> Электронно-микроскопическое исследование процесса аккумуляции витамина В <sub>12</sub> изолированными криоконсервированными гепатоцитами . . . . .                                     | 3  |
| <i>Нардид О.А., Репина С.В., Дюбо Т.С.</i> Влияние низких температур на структурные перестройки мембраносвязанных белков . . . . .                                                                           | 12 |
| <i>Терентьев А.Н., Зинченко А.В., Зинченко В.Д., Мусатов В.И., Щетинский М.И.</i> Влияние некоторых криопротекторов на состояние воды в клетках <i>Y. pestis</i> EV76 при замораживании-оттаивании . . . . . | 20 |
| <i>Леонов Б.Н.</i> Влияние замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 на структуру бычьего сывороточного альбумина . . . . .                                                                   | 27 |

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Краченко Л.П., Андриенко А.Н.</i> Условия длительного хранения изолированных гепатоцитов при 4 °С . . . . .                                                                | 33 |
| <i>Ма Ен-пу, Лю Ан, Вей Хан-донг, Ву Чу-це, Конг Фан-хуа, Джин Ли.</i> Исследование HLA-типирования эмбриональных тканей и организация банка гемопоэтических клеток . . . . . | 38 |
| <i>Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Обозная-Печенежская Э.И.</i> Морфофункциональные особенности криоконсервированных эмбриональных гемопоэтических клеток . . . . .            | 45 |

### ХРОНИКА

### ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

This One



3W42-NC1-F1GA

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Zagoruyko G.E.</i> The electron microscopic investigation of the accumulation of vitamin B <sub>12</sub> by isolated cryopreserved hepatocytes . . . . .                                            | 3  |
| <i>Nardid O.A., Repina S.V., Dubko T.S.</i> The effect of low temperatures on structural changes in membrane-bound proteins . . . . .                                                                  | 12 |
| <i>Terentyev A.N., Zinchenko A.V., Zinchenko V.D., Musatov V.I., Shchetinsky M.I.</i> The effect of cryoprotectants on the state of water in <i>Y. pestis</i> EV76 cells upon freeze-thawing . . . . . | 20 |
| <i>Leonov B.N.</i> The effect of freezing and polyethylene glycol of molecular weight 600 on the structure of bovine serum albumin . . . . .                                                           | 27 |

### CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Kravchenko L.P., Andriyenko A.N.</i> Conditions for long-term storage of isolated hepatocytes at 4 °C . . . . .                                                                  | 33 |
| <i>Ma En-pu, Liu An, Wei Han-dong, Wu Chu-tse, Kong Fan-hua, Jin Li.</i> Studies on the HLA-typing of fetal tissues and the establishment of a hemopoietic stem cell bank . . . . . | 38 |
| <i>Lobyntseva G.S., Votyakova I.A., Oboznaya-Pechenezhskaya E.I., Oleynik S.T.</i> Morphofunctional characteristics of cryopreserved fetal hemopoietic cells . . . . .              | 45 |

### CHRONICLE

### DEFENSE OF THESES

Адрес редакции:  
310015 Харьков, 15,  
ул. Переяславская, 23,  
тел. (0572) 72-10-39

Научный редактор *А.М.Белоус*  
Редактор *З.В.Линевич*  
Компьютерный набор и верстка: *И.А.Жутченко, З.В.Линевич, Л.В.Смык*

Подл. в печ. 8.04.93. Формат 70×108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.  
Тираж 500 экз. Цена 50 крб. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16, 310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

### ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА АККУМУЛЯЦИИ ВИТАМИНА В<sub>12</sub> ИЗОЛИРОВАННЫМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ ГЕПАТОЦИТАМИ

Проведено электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование кинетики аккумуляции и цитоархитектоники электронно-плотных мицелл витамина В<sub>12</sub> во внутриклеточных компонентах криоконсервированных гепатоцитов половозрелых свиней. В условиях 60-минутной эквilibрации суспензии клеток печени с физраствором кобаламина выявлены две последовательные стадии аккумуляции витамина В<sub>12</sub> в гепатоцитах. Первая стадия  $T \leq 20$  мин характеризуется ростом концентрации макромолекулярных агрегатов кобаламина  $d \in 130-150$  нм на  $100 \text{ мкм}^2$  площади среза цитоплазмы клеток от 0 до 180 частиц. Вторая стадия  $T \leq 20-60$  мин характеризуется убылью числа частиц до 30. Эта убыль обусловлена биотрансформацией мицелл: диссоциацией макромолекулярных агрегатов на ультрадисперсные частицы, взаимодействие последних с полипептидами и белками везикул гладкой эндоплазматической сети с образованием конъюгатов. Установлено, что биотрансформации подвергаются до 83% всего количества мицелл ксенобиотика витамина В<sub>12</sub> аккумуляированного в цитоплазме криоконсервированных гепатоцитов.

В последние десятилетия во всех промышленно развитых странах мира наблюдается резкое ухудшение экологической обстановки, обусловленное широким внедрением в производство новых технологий, химических соединений, искусственных материалов. В окружающей среде непрерывно накапливаются различные токсические химические соединения, биологически активные вещества, радионуклиды, оказывающие негативное влияние на животный и растительный мир [2, 7]. Загрязнение продуктов питания различными ксенобиотиками приводит, в конечном итоге, к росту заболеваемости органов пищеварения человека и в первую очередь печени [1, 10]. Несмотря на то, что ретикулоэндотелиальная система печени в интегральном единстве с гепатоцитами осуществляет сложнейшие физико-химические превращения по нейтрализации различных ксенобиотиков, детоксикационная способность клеточных элементов не беспредельна, и в условиях нарушения обмена веществ в печени развиваются острые и хронические изменения вплоть до некроза. При некротических гепатитах вирусной и токсикоаллергической природы, ожогах, отравлениях, наблюдается повышение в крови уровня полипептидов, аминокислот, мочевой кислоты, свободных жирных кислот и других малоизученных продуктов тканевого и клеточного распада, которые могут вызвать глубокие нарушения структурно-функциональной организации жизненно важных систем организма человека [3, 13].

Известно, что низкомолекулярные ксенобиотики попадают в паренхиматозные клетки печени из кровеносного русла путем диффузии и активного трансмембранного транспорта, а высокомолекулярные соединения, в том числе токсины – путем эндоцитоза [3, 13, 14]. Внутриклеточная биотрансформация ксенобиотиков происходит в элементах эргастоплазмы гепатоцитов, преимущественно в цистернах гладкой эндоплазматической сети [13, 14]. В этот сложный энергозависимый процесс вовлекаются элементы сетчатого аппарата, лизосомы и митохондрии.

Изолированные гепатоциты в условиях *in vitro* сохраняют многие функционально-метаболические свойства интактной печени, в том числе функцию инактивации токсических соединений. Эта детоксикационная способность суспензии гепатоцитов используется в современных клинических методах лечения тяжелой формы печеночной и печеночно-почечной недостаточности. С этой целью проводят экстракорпоральную очистку крови больных путем ее перфузии через гемосорбенты, в составе которых применяют живые изолированные или криоконсервированные паренхиматозные клетки печени [5, 9, 16].

Однако, наряду с положительным клиническим эффектом применения многослойных гемосорбентов, многие этапы внутриклеточного процесса детоксикации ксенобиотиков в цитоплазме криоконсервированных гепатоцитов остаются неясными и малоизученными. В связи с актуальностью проблемы создания высокоэффективных многослойных гемосорбентов целью настоящей работы явилось электронно-микроскопическое изучение кинетики аккумуляции маркера экзогенных токсинов – витамина В<sub>12</sub> изолированными криоконсервированными ксеногепатоцитами.

Эксперимент проведен на суспензии криоконсервированных гепатоцитов, полученных из печени половозрелых свиней. В качестве ультрамикроскопического маркера ксенобиотика нами использован цианокобаламин, лиганд, обладающий высокой электронной плотностью и молекулярной массой  $\approx 1355$  дальтон [11]. В чистые стеклянные бюксы (5 шт) объемом 5 см<sup>3</sup> вносили по 0,2 мл концентрированной взвеси криоконсервированных ксеногепатоцитов и по 1,0 мл раствора для инъекций витамина В<sub>12</sub>. Контролем служила суспензия гепатоцитов без витамина. Для предотвращения возможной агрегации гепатоцитов в условиях длительной эквilibрации суспензии клеток с физиологическим раствором витамина В<sub>12</sub> проводили с помощью шутеля легкое ритмичное встряхивание бюксов. Через 10, 20, 30, 40 и 60 мин после начала эквilibрации при комнатной температуре (20 °С) отбирали клеточные пробы для последующего их электронно-микроскопического исследования. С этой целью суспензию клеток центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2–3 мин для осаждения гепатоцитов. Надосадочную жидкость удаляли, а в осажденные гепатоциты осторожно приливали охлажденный префиксатор – 2,0 % глутаральдегид на фосфатном буфере (рН 7,2). Через 4 ч префиксатор сливали и постфиксировали гепатоциты в 1 %-ном растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере. После завершения процесса химической фиксации осадок гепатоцитов промывали фосфатным буфером до полного удаления остатков тетраоксида осмия. Затем осадок ксеногепатоцитов обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, абсолютном ацетоне, пропитывали эпоксидными смолами и полимеризовали при 60 °С в течение 24 ч. Полимеризованные блоки с клетками печени резали на ультрамикротоме. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. После промывки и сушки ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе ЭВМ-100Л при ускоряющем напряжении 75 кВ. Морфометрический анализ электронно-плотных высокомолекулярных агрегатов – мицелл витамина В<sub>12</sub>, расположенных в цитоплазме гепатоцитов, проводили с помощью прибора ПМА-1 [12]. С этой целью на негативы срезов гепатоцитов, полученных при увеличении  $\times 20000$ , накладывали прозрачную тест-систему, на лицевой стороне которой изображены эталонные квадраты одинаковой площади. Внутри квадратов подсчитывали количество мицелл витамина В<sub>12</sub>. Затем для каждой опытной группы в серии негативов определяли среднее число мицелл витамина В<sub>12</sub> на единице площади

среза цитоплазмы клеток. На основе полученных морфометрических данных строили графики кинетики аккумуляции коллоидных частиц витамина криоконсервированными гепатоцитами в зависимости от времени эквilibрации. Стабилизированные значения средних величин и погрешность измерений ( $\pm \epsilon$ , %) определяли с помощью графико-аналитического метода [6].

Ранее нами было установлено, что наряду с малоизмененными клетками в суспензии криоконсервированных гепатоцитов свиней выявляется до 50 % печеночных клеток с повреждениями ультраструктур различной степени выраженности. Наиболее характерными изменениями являются следующие:

- мультивезикуляция и разрывы плазмолеммы;
- тотальная умеренная вакуолизация элементов гладкой эндоплазматической сети и аппарата Гольджи;
- фрагментация канальцев гранулярной эндоплазматической сети, уменьшение количества прикрепленных рибосом;
- набухание митохондрий и появление темных уплотненных и просветленных органелл;
- снижение содержания общего хроматина в ядрах клеток;
- значительная убыль количества гранул гликогена (рис.1).

На этапах криоконсервирования гепатоцитов минимальные структурные изменения выявляются в лизосомах и липидных включениях.

В проведенных исследованиях установлено, что через 10 мин после нача-

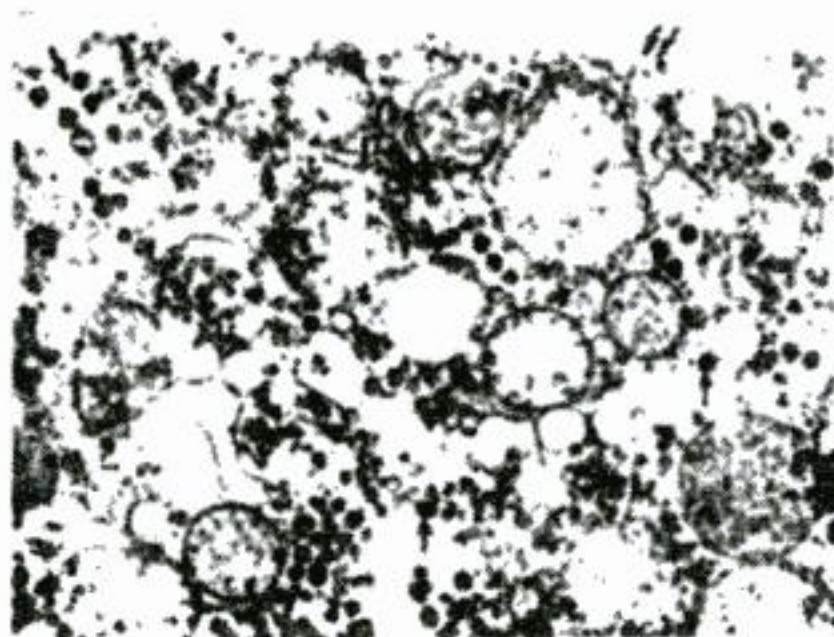
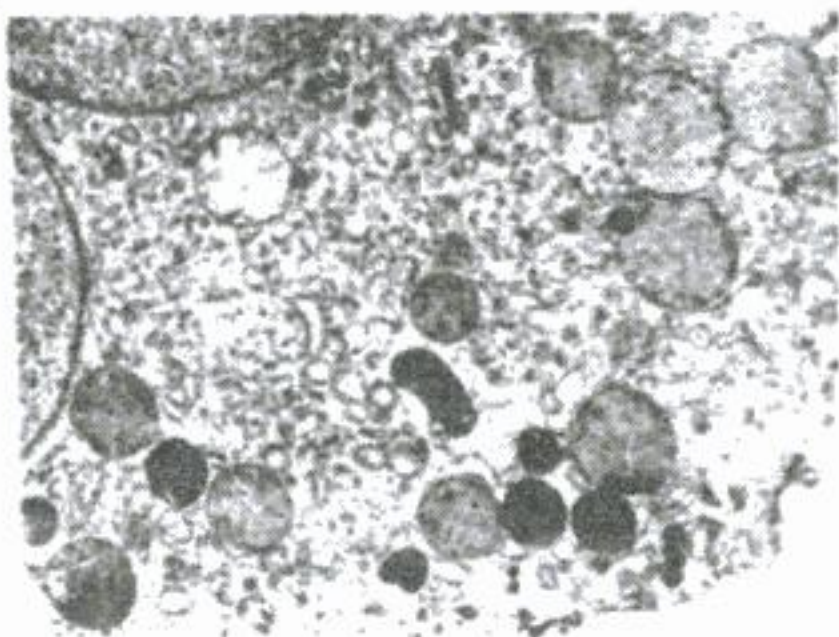


Рис.1. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов свиней, контроль. Тотальная умеренная везикуляция элементов гладкой эндоплазматической сети, аппарата Гольджи. Темные и светлые митохондрии. Ув. 10000

Рис.2. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов через 10 минут эквilibрации с раствором витамина B<sub>12</sub>. Повреждение плазмолеммы (↑ ↑), мицеллы кобаламина в гиалоплазме клеток (↑). Ув. 20000

ла эквilibрации суспензии гепатоцитов с раствором витамина B<sub>12</sub> электронно-микроскопически в периферическом слое клеток обнаруживаются многочисленные звездчатой формы плотные частицы – мицеллы. Эти высокомолекулярные агрегаты витамина B<sub>12</sub> определяются преимущественно в цитозоле клеток между набухшими элементами эргастоплазмы (рис.2).

Довольно много мицелл расположено в эктоплазме, вблизи от участков повреждений (мультивезикуляции и фрагментации) плазмолеммы. На интактной поверхности наружной клеточной мембраны определяются единич-

ные прикрепленные мицеллы. Характер распределения мицелл в периферическом слое криоконсервированных гепатоцитов свидетельствует о том, что коллоидные частицы витамина B<sub>12</sub> свободно проникают через перфорированную поверхность плазмолеммы клеток и, распределяясь в объеме цитозоля, редко вступают в этот период в контакт с мембранами элементов эргастоплазмы.

Через 20 мин после начала опыта коллоидные частицы витамина B<sub>12</sub> равномерно и хаотично распределяются по всему объему гепатоцитов в промежутках между везикулами эндоплазматического ретикулума и митохондриями (рис. 3).

Определенное количество мицелл витамина B<sub>12</sub> определяется внутри цистерн гладкой эндоплазматической сети и на поверхности наружной митохондриальной мембраны. Однако мицеллы витамина характеризуются низким

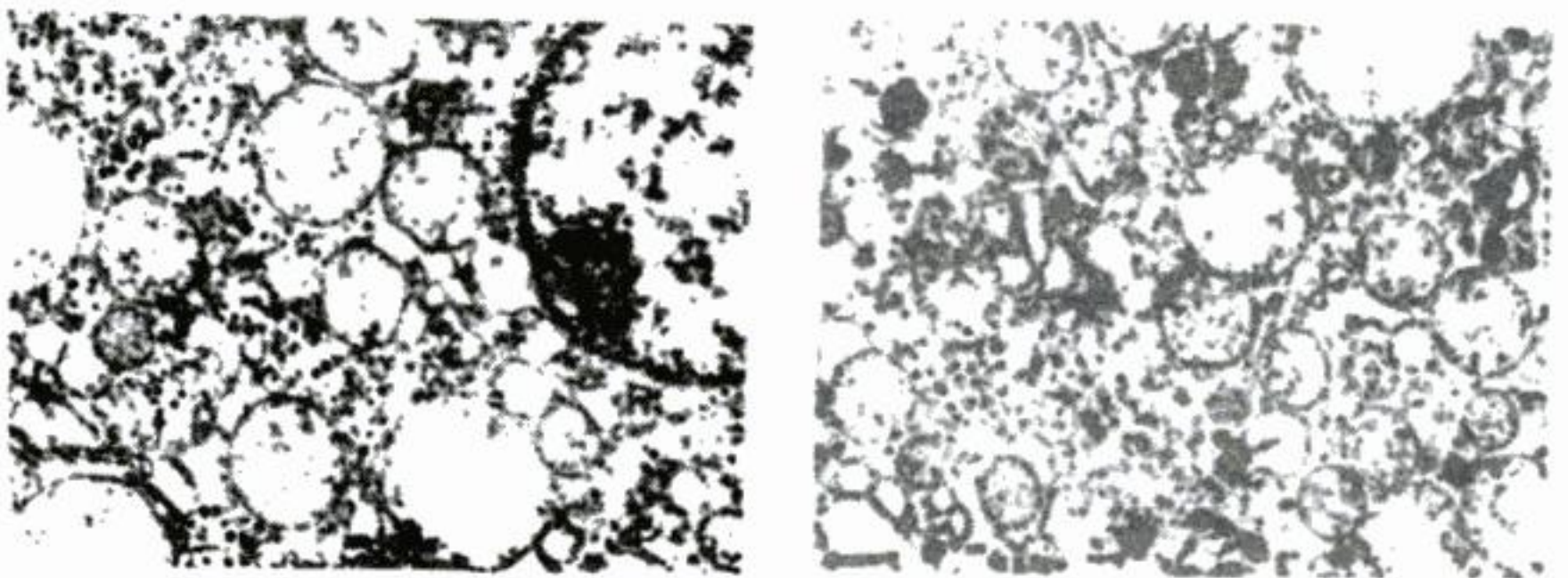


Рис.3. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов через 20 мин эквilibрации с физраствором кобаламина. Мицеллы витамина в околоядерной зоне клетки (↑). Ув. 20000

Рис. 4. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов через 30 мин эквilibрации с физраствором витамина B<sub>12</sub>. Агрегация кобаламина в везикулах гладкой эндоплазматической сети (↑). Ув. 15000

уровнем сродства к плазмолемме и наружной мембране ядерной оболочки.

Через 30 мин обнаруживаются изменения ультраструктуры мицелл витамина B<sub>12</sub>, изменяется характер их распределения в цитоплазме гепатоцитов. Выявляются две фракции мицелл витамина B<sub>12</sub>. Мелкодисперсная фракция представлена коллоидными частицами округлой формы, расположенными в цитозоле клеток, и крупнодисперсная фракция – агрегаты коллоидных частиц, локализованные внутри везикул гладкой эндоплазматической сети (рис. 4).

Результаты этих исследований позволяют предположить, что в цитоплазме криоконсервированных гепатоцитов наблюдается процесс биотрансформации ксенобиотика витамина B<sub>12</sub>, заключающийся в изменении формы, степени дисперсности макромолекул витамина и места их внутриклеточной локализации. Нами установлено, что в цитозоле гепатоцитов происходит частичная диссоциация мицелл витамина B<sub>12</sub>. Коллоидные частицы звездчатой формы уменьшаются в размерах вследствие разрушения их периферического слоя, а оставшаяся “сердцевина” приобретает округлую форму. Диссоциированные субъединицы мицелл витамина из цитозоля проникают вовнутрь цис-

терн гладкой эндоплазматической сети, где аккумулируются и образуют крупные конгломераты.

Через 40 мин после начала опыта в цитоплазме гепатоцитов продолжается процесс биотрансформации витамина В<sub>12</sub>. В это время в цитозоле клеток значительно реже выявляются электронно-плотные мицеллы. Большое количество ультрадисперсных микрочастиц кобаламина накапливается внутри элементов эргастоплазмы, образуя в везикулах четко контурированные дискретные скопления (рис. 5).

Существенно изменяется ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов. Наблюдается тотальная вакуолизация эргастоплазмы, увеличива-

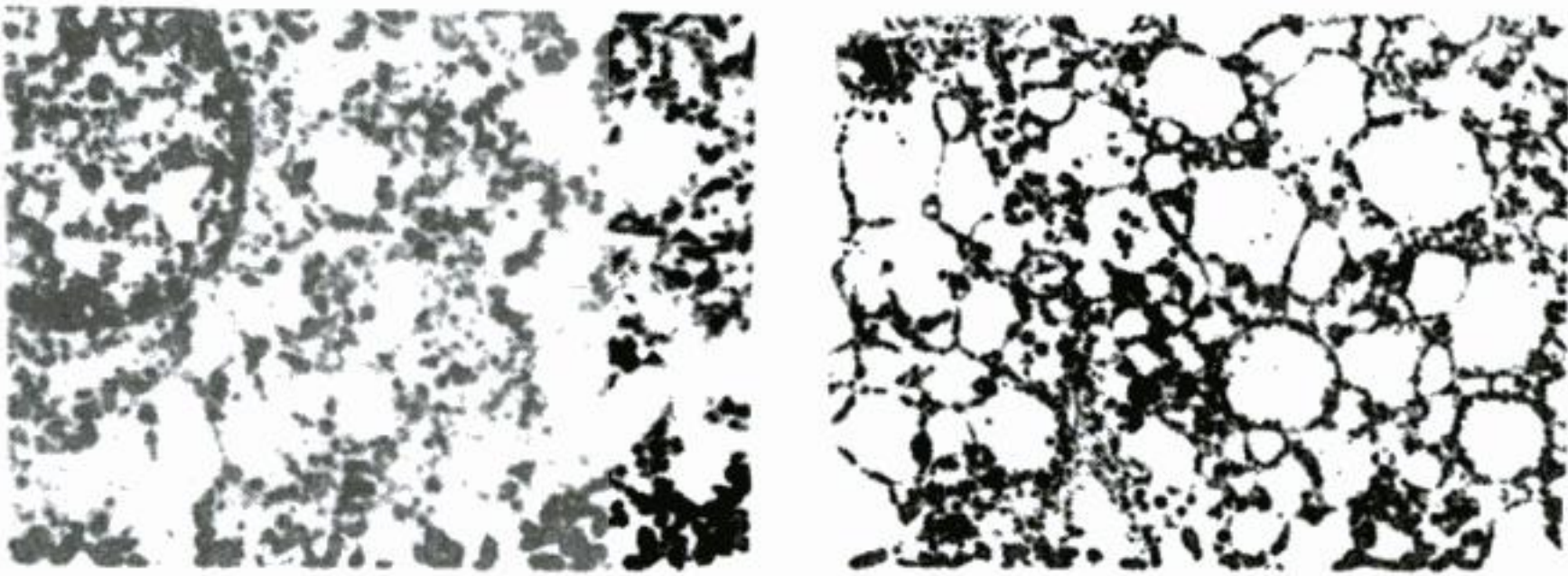


Рис. 5. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов через 40 мин эквilibрации с физраствором витамина В<sub>12</sub>. Локальные скопления коллоидных частиц кобаламина в везикулах эргастоплазмы. (↑). Ув. 25000

Рис. 6. Ультраструктура криоконсервированных гепатоцитов через 60 мин эквilibрации с физраствором витамина В<sub>12</sub>. Везикулярно сетчатое строение эргастоплазмы клеток, единичные мицеллы кобаламина внутри везикул. (↑). Ув. 20000

ются размеры везикул, значительно уменьшается объем гиалоплазмы. Гепатоциты увеличиваются в размерах и приобретают округлую форму. В цитоплазме клеток выявляются поврежденные лизосомы, определяются участки лизиса и разрежения субклеточных структур эргастоплазмы. Эти данные позволяют предположить, что деструкция мицелл кобаламина в цитозоле криоконсервированных гепатоцитов обусловлена воздействием лизосомальных ферментов. Образующиеся в результате ферментативной диссоциации мицелл многочисленные ультрадисперсные частицы кобаламина взаимодействуют с полипептидами цитозоля, белок-липидными комплексами везикул эргастоплазмы и в конечном итоге рассеиваются по всему объему клеток.

Через 60 мин эксперимента в суспензии гепатоцитов определяются преимущественно вакуолизированные клетки, в цитоплазме которых уже не удастся дифференцировать отдельные органеллы. Эргастоплазма таких гепатоцитов представлена сложно организованной сетчатовезикулярной структурой, в ячейках которой обнаруживаются единичные мицеллы кобаламина (рис. 6).

Нами проведены измерения диаметров сечений мицелл витамина B<sub>12</sub>, расположенных в цитозоле гепатоцитов в условиях 10-минутной эквilibрации суспензии клеток с раствором кобаламина. Анализ полученной цифровой информации позволил определить наиболее вероятный диаметр коллоидных частиц кобаламина, который оказался равным  $d \in 130-150$  нм.

На рис. 7 представлен график кинетики изменения концентрации мицелл витамина B<sub>12</sub> на единице площади среза цитоплазмы гепатоцитов, равной  $100 \text{ мкм}^2$ . Анализ эмпирической кривой позволил выявить точку экстремума с временной координатой ( $t = 20$  мин), в которой наблюдается смена двух последовательных стадий аккумуляции витамина B<sub>12</sub> в цитоплазме клеток. Первая стадия продолжительностью 20 мин характеризуется быстрым монотонным ростом количества мицелл в объеме гепатоцитов. В этот период концентрация макромолекулярных агрегатов витамина B<sub>12</sub> на единице площади среза цитоплазмы клеток возрастает от 0 до  $(180 \pm 20)$  частиц. Линейный ха-

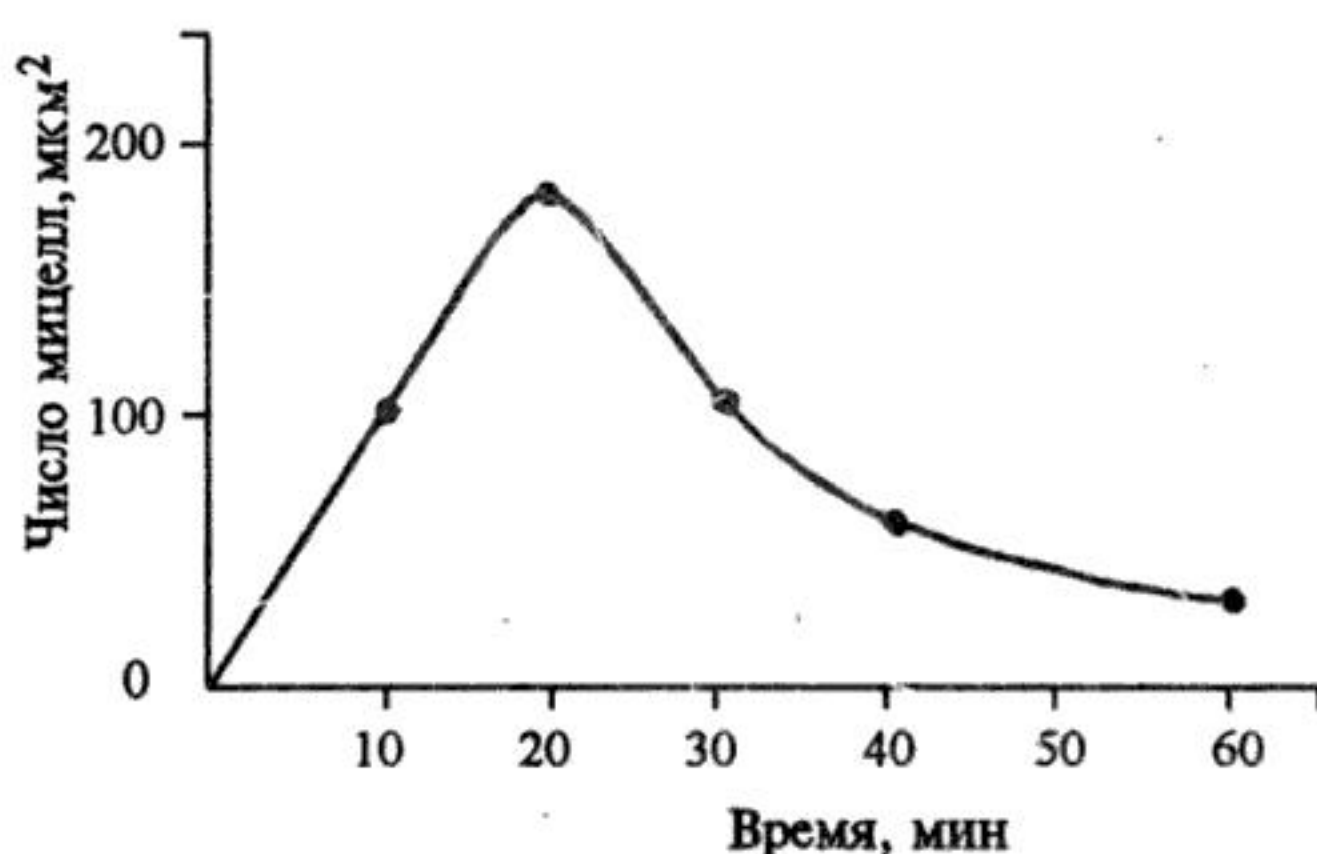


Рис. 7. Кинетика аккумуляции мицелл витамина B<sub>12</sub> в цитоплазме криоконсервированных гепатоцитов. По оси ординат — количество коллоидных частиц кобаламина на  $100 \text{ мкм}^2$  площади среза цитоплазмы клеток; по оси абсцисс — время эквilibрации гепатоцитов с физраствором витамина B<sub>12</sub>

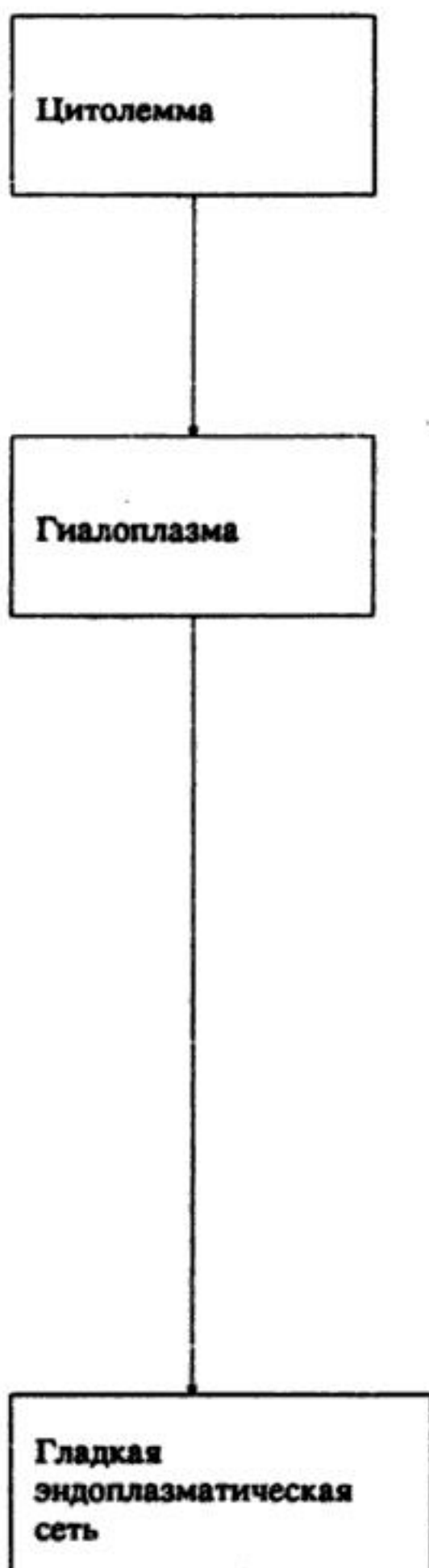
актер роста количества мицелл в клетках печени в первые 10–15 мин эксперимента и отсутствие латентного периода свидетельствует о наличии направленной облегченной диффузии микрочастиц из раствора в цитоплазму криоконсервированных гепатоцитов. Исходя из размеров мицелл кобаламина, можно заключить, что диффузия через плазмолемму клеток возможна при наличии достаточного количества пор в поврежденной “перфорированной” наружной клеточной мембране, диаметр которых должен быть не менее 150 нм. Вторая стадия продолжительностью 40 мин ( $T \in 20-60$  мин) характеризуется монотонной убылью концентрации мицелл в цитоплазме клеток от 180 до 30 частиц на  $100 \text{ мкм}^2$  площади среза гепатоцитов. Эта убыль обусловлена процессом биотрансформации мицелл: диссоциации агрегатов кобаламина на множество ультрамикродисперсных частиц, взаимодействие последних с полипептидами гиалоплазмы и белок-липидными комплексами в везикулах эргастоплазмы. Если принять максимальную концентрацию частиц (180) на единице площади среза гепатоцитов за 100%, то в течении 40 мин биотрансформации подвергаются до 83% (30) всего количества мицелл ксенобиотика витамина B<sub>12</sub>, аккумуляированного в криоконсервированных гепатоцитах.

Результаты проведенных исследований однозначно свидетельствуют о том, что в криоконсервированных гепатоцитах отсутствует процесс эндоцитоза мицелл кобаламина. Следовательно, не определяется одна из важнейших характеристик физиологического состояния нативных клеток — активный

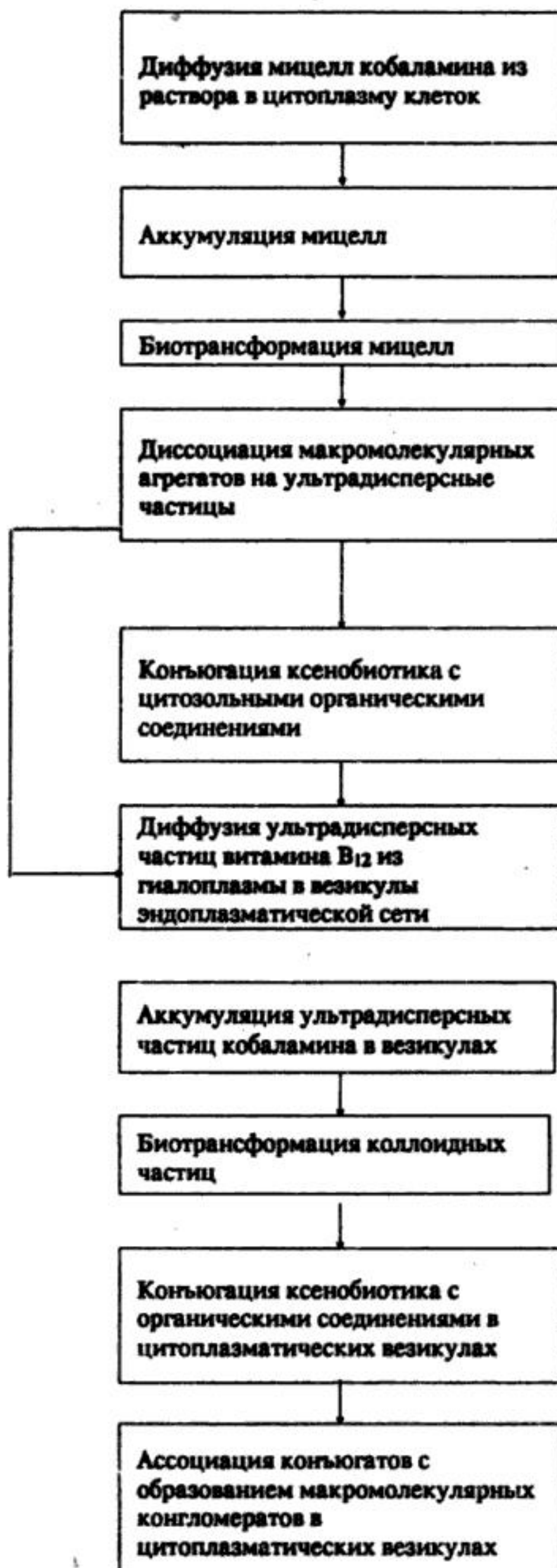
**С х е м а**

**Пути аккумуляции и биотрансформации витамина В<sub>12</sub> в суспензии криоконсервированных гепатоцитов**

**Компартменты  
криоконсервированных  
гепатоцитов**



**Последовательность  
физико-химических  
превращений**



трансмембранный перенос мицелл ксенобиотика путем эндоцитоза из внешней среды в гиалоплазму гепатоцитов.

Линейный характер процесса массопереноса коллоидных частиц витамина В<sub>12</sub> из раствора вовнутрь клеток печени в первые 10–15 мин эквilibрации, отсутствие латентного периода накопления мицелл позволяет заключить, что в условиях проведенного эксперимента криоконсервированные гепатоциты ведут себя как *пористые биологические объекты* и, в отличие от нативных клеток, характеризуются следующими новыми физическими качествами [4,8]:

- значительной диффузионной проницаемостью:
- высокими сорбционными свойствами:
- развитой активной внутренней поверхностью, образованной множеством везикул эргастоплазмы:
- пористостью – наличие в объеме клеток свободного пространства.

Электронно-микроскопически установлено, что свободное пространство внутри криоконсервированных гепатоцитов заполнено гиалоплазмой и образует трехмерный замкнутый на себя и частично изолированный от внешней среды перфорированной плазмолеммой *лабиринт*, в котором аккумулируются в большом количестве многочисленные мицеллы витамина В<sub>12</sub>. Обнаруженный нами эффект интенсивного накопления во внутриклеточном пространстве (гиалоплазме) кобаламина обусловлен более высокой по сравнению с физраствором вязкостью внутриклеточной среды. Поэтому мицеллы витамина В<sub>12</sub> в процессе эквilibрации будут накапливаться в цитоплазме криоконсервированных гепатоцитов в концентрациях больших, чем в окружающем физиологическом растворе.

В обобщенном виде результаты опытов могут быть представлены в виде схемы последовательности физико-химических превращений ксенобиотика витамина В<sub>12</sub> в компонентах цитоплазмы криоконсервированных изолированных гепатоцитов (см. схему).

Следовательно, проведенные исследования позволили:

- установить механизм элиминации из раствора мицелл витамина В<sub>12</sub> в цитоплазму криоконсервированных гепатоцитов;
- определить кинетику аккумуляции и цитоархитектонику распределения мицелл кобаламина в клетках паренхимы печени;
- выявить наличие и последовательность процессов сорбции и биотрансформации мицелл витамина В<sub>12</sub> в различных компонентах цитоплазмы криоконсервированных гепатоцитов.

Автор искренне признателен профессору Б.П.Сандомирскому за предоставленную возможность выполнить научные исследования в отделе криомедицины ИПКиК АН Украины, а также научному сотруднику В.Ф.Тарасову за помощь в проведении эксперимента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаев Н.Х., Ксримов Х.Я. Печень при интоксикациях гепатотропными ядами. – Ташкент: Медицина, 1989. – 96 с.
2. Алексеев В.А. Экологические проблемы энергетики. – Новосибирск: Наука, 1989. – 276 с.
3. Альберт А., Адриен Н. Избирательная токсичность. Т.2. – М.: Медицина, 1989. – 432 с.
4. Гринчик Н.И. Процессы переноса в пористых средах, электролитах и мембранах. – Минск: АНК «ИТО» им.А.В.Лыкова АН БССР, 1991. – 251 с.
5. Грязнов В.Н. Использование гелевых сорбентов в экспериментальной и клинической хирургии. – Воронеж: ВГУ, 1990. – 84 с.
6. Загоруйко Г.Е. Графико-аналитический метод в морфометрическом анализе ультраструктур мышечных клеток сердца // Научно-технический прогресс в кардиологии. – 1986. – С.11–14.
7. Кесслер Г. Ядерная энергетика. – М.: Энергия. – 1986. – 260 с.
8. Коллинз Р. Течение жидкостей через пористые материалы. – М.: Мир, 1964. – 350 с.

9. Маргулис М.С., Ерухимов Е.А., Андрейман Л.А. и др. Гемоперфузия через взвесь живых донорских гепатоцитов при лечении тяжелой печеночной недостаточности // Хирургия. – 1987. – N12 – С. 107–110.
10. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. – М.: Медицина. – 1991. – 272 с.
11. Николаев В.Г., Ситренко В.В. Гемосорбция на активированных углях – Киев: Наукова думка, 1979. – 287 с.
12. Офицеров В.Н., Загоруйко Г.Е. Механическое устройство для морфометрического и ориентационного анализа биологических структур // Бюл. эксперим. биологии. – 1979. – 88, N 11. – С.625 – 626.
13. Розен В.Б., Матарадзе Г.Д., Смирнова О.В., Смирнов А.Н. Половая дифференцировка функций печени. – М.: Медицина, 1991. – 336 с.
14. Титунов Л.А. Основные механизмы метаболизма ксенобиотиков в организме человека и животных // Метаболизм ксенобиотиков в организме человека и животных: Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. – М.: ВИНТИ, 1981. – Т.12. – 157 с.
15. Шумаков В.И., Арзуманов В.С., Онищенко Н.А. и др. Лечение тяжелой печеночной недостаточности перфузией крови больных через взвесь криоконсервированных гепатоцитов // Хирургия. – 1990. – N2. – С.113 – 116.

НИИ биологии при ХГУ, Харьков

Поступила 31.03.92

Г.Е.ЗАГОРУЙКО

# ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ АКУМУЛЯЦІЇ ВІТАМІНУ В<sub>12</sub> ІЗОЛЬОВАНИМИ КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ ГЕПАТОЦИТАМИ

НДІ біології при ХГУ, Харків

Проведено електронно-мікроскопічне і морфометричне дослідження кінетики акумуляції і цитоархітекτονіки розподілу електронно-щільних міцел вітаміну В<sub>12</sub> у внутріклітинних компонентах кріоконсервованих гепатоцитів статеводорілих свиней. В умовах 60-хвилинної еквілібрації суспензії клітин печінки з фізіологічним кобаламіном виявлені дві послідовні стадії акумуляції вітаміну В<sub>12</sub> у гепатоцитах. Перша стадія  $T \leq 20$  хв характеризується зростанням концентрації макромолекулярних агрегатів кобаламіну  $d \in 130-150$  нм на  $100 \text{ мкм}^2$  площини зрізу цитоплазми клітин від 0 до 180 частинок. Друга стадія  $T \leq 20-60$  хв характеризується спаданням числа частинок до 30. Це спадання обумовлене біотрансформацією міцел: дисоціацією макромолекулярних агрегатів на ультрадисперсні частинки, взаємодія останніх з поліпептидами та білками везикул рівної ендоплазматичної мережі з утворенням кон'югатів. Встановлено, що біотрансформації піддаються до 83% кількості міцел ксенобіотика вітаміну В<sub>12</sub>, акумульованого у цитоплазмі кріоконсервованих гепатоцитів.

G.E.ZAGORUYKO

# THE ELECTRON MICROSCOPIC INVESTIGATION OF THE ACCUMULATION OF VITAMIN B<sub>12</sub> BY ISOLATED CRYOPRESERVED HEPATOCYTES

Research Institute for Biology at the State University of Kharkov

The accumulation kinetics and cytoarchitectonics of electron dense micelles of vitamin B<sub>12</sub> in the intracellular components of cryopreserved hepatocytes of adult pigs has been studied by the methods of electron microscopy and morphometry. Two subsequent stages of vitamin B<sub>12</sub> accumulation in hepatocytes have been found under conditions of 60 min equilibration of the liver cellular suspension in a physiological solution of cobalamin. An increase in concentration of macromolecular cobalamin aggregates  $d \in 130-150 \text{ nm}$  per  $100 \text{ }\mu\text{m}^2$  area of cell cytoplasm section from 0 to 180 particles is peculiar to stage 1 ( $T \leq 20 \text{ min}$ ). A decrease in number of particles to 30 is typical for stage 2  $T \in 20-60 \text{ min}$ . The decrease is caused by the biotransformation of micelles, namely by the dissociation of macromolecular aggregates into ultradispersed particles and their interaction with polypeptides and proteins of smooth endoplasmic reticulum vesicles forming conjugates. It has been found that nearly 83% of the total micelles of xenobiotic vitamin B<sub>12</sub> accumulated in cytoplasm of cryopreserved hepatocytes were subject to biotransformation.

**ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ**

В работе приведены результаты исследований по влиянию замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и последующего отогрева на параметры спектров собственной флуоресценции периферических и интегральных белков в растворе и в составе искусственных и природных мембран. Установлено, что структурные нарушения исследованных белков, несмотря на некоторые отличия, связанные с заменой фосфолипидного состава протеолипосом, изменением ионной силы и ионного состава среды замораживания, имели одинаковую направленность и необратимый характер и проявлялись в длинноволновом сдвиге положения максимума спектров флуоресценции. При этом более выраженные изменения наблюдались в случае периферического белка.

Важное значение в повреждениях биологических объектов на этапах низкотемпературного консервирования может иметь изменение белок-липидных взаимодействий с последующим нарушением проницаемости мембранных структур и всеми вытекающими из этого последствиями для клеток. Несмотря на то, что к настоящему времени имеется значительное количество работ по изучению влияния низких температур на растворимые белки [4, 10, 12] и белки в составе мембран [5, 9, 16], они, однако, не дают адекватного представления о роли белок-липидных взаимодействий в процессе криоповреждения. В связи с этим необходимо дальнейшее накопление экспериментального материала как о структурных перестройках белков при низкотемпературном воздействии в зависимости от их окружения и локализации в липидном бислое, так и о роли мембранных белков в реакции клеточных структур в целом на низкие температуры.

Исходя из этих предпосылок мы исследовали влияние низких температур на структурные перестройки интегральных и периферических белков в растворе и в составе искусственных и природных мембран по спектрам собственной флуоресценции биомакромолекул.

В качестве объектов для этих исследований использовали растворы цитохрома Р-450 из микросом печени кроликов и спектрина из эритроцитов донорской крови. Кроме этого были исследованы цитохром Р-450 в составе протеолипосом из яичного фосфатидилхолина и его смеси в весовом соотношении 4:1 с фосфатидилсерином, а также скелетные и интегральные белки в составе природных мембран эритроцитов.

Цитохром Р-450 (форму LM2) выделяли из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал натрия в течение 5 дней [13]. Чистоту препарата контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Протеолипосомы, содержащие цитохром Р-450, получали диализом при  $4^{\circ}\text{C}$  против 0,01 М трис-НСL-буфера, содержащего 1 мМ ЭДТА, рН 7,4. Молярное отношение белка к липиду в них составляло 1:500.

Белые тени эритроцитов получали гипертоническим гемолизом [11]. Фракцию спектрина освобождали инкубацией белых теней в 0,1 мМ ЭДТА, рН 8,0 (разведение 1:7) в течение 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  и последующим центрифугированием при 120 000 g в течение часа [2]. Раствор спектрина концентрировали ультрафильтрацией.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметрах "Hitachi" при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм. При слабо разрешенных

спектрах флуоресценции использовали накопление в течение 2 с. Измерения при положительных температурах проводили в термостатируемой кювете с точностью поддержания температуры  $\pm 1^\circ\text{C}$ , при отрицательных температурах - в охлаждаемом кварцевом капилляре. Положение максимумов спектров флуоресценции с точностью  $\pm 0,1$  нм определяли как точку обращения в ноль первой производной. Замораживание образцов проводили в полиэтиленовых пробирках погружением в жидкий азот. Отогрев производили на водяной бане с температурой  $40^\circ\text{C}$  до достижения образцом комнатной температуры.

Спектр испускания флуоресценции цитохрома Р-450 в растворе в наших экспериментах имел максимум в области 324 нм. Как известно, форма и положение в шкале длин волн флуоресценции триптофансодержащих белков определяются наложением спектров флуоресценции отдельных триптофановых и тирозиновых остатков. Учитывая, что цитохром Р-450 наряду с одним остатком триптофана содержит 12 остатков тирозина, для характеристики эмиссионного спектра флуоресценции гемопroteина использовали параметры [6]:  $A = (I_{315}/I_{365})_{296}$ ,  $B = (I_{315}/I_{365})_{280}$ ,  $\Delta = (I_{315}/I_{365})_{280} - (I_{315}/I_{365})_{296}$ . Здесь  $I_{315}$  и  $I_{365}$  - интенсивность флуоресценции в спектре при длинах волн соответственно 315 и 365 нм, индексы при скобках - длины волн возбуждающего света. При возбуждении светом с длиной волны 296 нм вкладом тирозиновых остатков в спектр флуоресценции триптофансодержащих белков можно пренебречь. Поэтому величина  $A$  определяется триптофановой компонентой цитохрома Р-450. Тогда величина  $\Delta$ , являющаяся разностью интенсивностей при  $\lambda = 315$  нм в спектрах флуоресценции, измеренных при возбуждении светом с длиной волны 280 и 296 нм и приведенных к единице при длине волны 365 нм, характеризует вклад тирозиновых остатков в спектр при  $\lambda = 315$  нм.

Результаты выполненного с применением данного подхода анализа спектров флуоресценции цитохрома Р-450 приведены в таблице.

Из таблицы видно, что быстрое замораживание с последующим отогревом цитохрома Р-450 в 0,03 М трис-буфере приводит к длинноволновому сдвигу спектра общей его флуоресценции с 324,5 до 325,5 нм. Анализ формы спектра флуоресценции показал, что вклад тирозиновых остатков в суммарный спектр цитохрома Р-450 снижается с 0,94 до 0,88, в то время как положение максимума, интенсивность и вклад в суммарный спектр флуоресценции триптофана не изменяются. Таким образом, все изменения суммарного спектра флуоресценции цитохрома Р-450 в результате замораживания-отогрева обусловлены тирозиновой флуоресценцией. В то же время, учитывая известный факт, что спектры флуоресценции хромофоров тирозина по положению и форме практически не отличаются при значительных отклонениях свойств окружения, наблюдаемые изменения могут быть отнесены за счет вызванного замораживанием-отогревом конформационного изменения структуры цитохрома Р-450, приводящего к тушению флуоресценции тирозиновых остатков. Учитывая, что тушение флуоресценции при этом незначительное, можно предположить, что оно осуществляется молекулами воды путем взаимодействия их с поверхностными индольными группами, частично экранированными от такого взаимодействия до замораживания другими белковыми радикалами.

Перевод белка в липидное окружение при образовании протеолипосом сопровождается при комнатной температуре сдвигом максимума собственной флуоресценции гемопroteина от 324,5 нм в растворе до 313-316 нм в протеолипосомах, а также увеличением вклада тирозиновой флуоресценции в суммарный эмиссионный спектр. Увеличение же вклада тирозиновой компоненты в спектр флуоресценции цитохрома Р-450 связано, как было отмечено рань-

**Влияние быстрого замораживания-отогрева на форму и положение спектров флуоресценции цитохрома P-450 в растворе и мембранах**

| Среда                        | A    | B    | $\Delta$ | $I_{\text{макс}}, \text{нМ}$           |                                        |
|------------------------------|------|------|----------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|                              |      |      |          | $\lambda_{\text{возб}}=280 \text{ нМ}$ | $\lambda_{\text{возб}}=296 \text{ нМ}$ |
| <b>Трис-буфер</b>            |      |      |          |                                        |                                        |
| 30 мМ                        | 0,92 | 1,86 | 0,94     | 324,5                                  | 334,0                                  |
| После замораживания-отогрева | 0,92 | 1,80 | 0,88     | 325,5                                  | 334,0                                  |
| <b>ФХ-липосомы</b>           |      |      |          |                                        |                                        |
| 10 мМ                        | 1,00 | 2,54 | 1,54     | 315,0                                  | 332,5                                  |
| После замораживания-отогрева | 1,00 | 2,46 | 1,46     | 315,2                                  | 332,4                                  |
| 30 мМ                        | 0,94 | 2,41 | 1,47     | 315,5                                  | 332,4                                  |
| После замораживания-отогрева | 0,93 | 2,38 | 1,45     | 315,8                                  | 332,5                                  |
| 100 мМ                       | 0,93 | 2,33 | 1,40     | 316,0                                  | 332,6                                  |
| После замораживания-отогрева | 0,93 | 2,33 | 1,40     | 316,0                                  | 332,5                                  |
| <b>ФХ/ФС-липосомы</b>        |      |      |          |                                        |                                        |
| 10 мМ                        | 1,00 | 3,16 | 2,16     | 312,5                                  | 332,0                                  |
| После замораживания-отогрева | 1,02 | 3,04 | 2,02     | 314,0                                  | 332,0                                  |
| 30 мМ                        | 0,89 | 2,93 | 2,04     | 314,0                                  | 332,1                                  |
| После замораживания-отогрева | 0,88 | 2,80 | 1,92     | 315,5                                  | 332,1                                  |
| 100 мМ                       | 0,87 | 2,73 | 1,86     | 315,0                                  | 332,5                                  |
| После замораживания-отогрева | 0,87 | 2,67 | 1,80     | 315,0                                  | 332,4                                  |

Примечание: ФХ-фосфатидилхолин из яичного желтка; ФС-фосфатидилсерин.

ше, с изменением квантового выхода тирозиновой флуоресценции в фосфолипидном окружении. Исходя из современных представлений, такое возгорание тирозиновой флуоресценции может быть обусловлено как дополнительным излучением потушенных в водном растворе тирозиновых остатков, так и уменьшением эффективности переноса энергии с тирозина на триптофан. Но в любом случае это свидетельствует о конформационных перестройках гемопротейда при переходе в липидное окружение. Данные литературы свидетельствуют о том, что при этом затрагивается и вторичная структура белка [8].

Замораживание-отогрев протеолипосом приводит к длинноволновому сдвигу спектра собственной флуоресценции цитохрома Р-450 с одновременным уменьшением вклада тирозинового компонента.

Для получения дополнительной информации о характере конформационных изменений цитохрома Р-450, вызванных действием низких температур, мы исследовали тушение флуоресценции белка акриламидом. Тушение флуоресценции описывалось уравнением Штерна-Фольмера  $Q = (I_0/I) - 1 = KС$ , позволяющем легко графически оценивать эффективность тушения. Как видно из графиков Штерна-Фольмера, приведенных на рис. 1, замораживание-отогрев цитохрома Р-450 в растворе не изменяет эффективность тушения.

По-видимому, все поверхностные тирозиновые остатки, даже те, которые не тушатся водой до замораживания белка, как было отмечено ранее, изначально доступны акриламиду. Доступность же нейтральному динамическому тушителю мембраносвязанного цитохрома Р-450 после замораживания-отогрева возрастает как в фосфатидилхолиновых липосомах, так и в липосомах, содержащих фосфатидилсерин. Повышение эффективности тушения может быть вызвано двумя основными причинами: частичным разворачиванием белковой молекулы или повышением ее флуктуационной подвижности. Учитывая, что для мембраносвязанного белка второй фактор играет значительно меньшую роль, мы предполагаем, что более вероятной причиной повышения доступности люминофоров цитохрома Р-450 тушителю в этом случае являются конформационные изменения белка при низкотемпературном воздействии.

Исследование растворов спектрина показало, что его флуоресценция при длине волны возбуждения 280 нм имеет спектр с длиной волны в максимуме 342 нм, что свидетельствует о значительной доступности его ароматических остатков растворителю.

Количественный анализ аминокислотного состава субъединиц спектрина, приведенный в работе [15], предполагает, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы содержат приблизительно по 45 остатков триптофана и по 29 остатков тирозина. Однако оценка вклада тирозиновых остатков в общую флуоресценцию при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм по приведенным выше формулам показывает, что он не превышает 8 %. Это хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [7] и позволяет интерпретировать полученные результаты с точки зрения разработанных представлений о влиянии физико-химических факторов среды на параметры флуоресценции триптофановых хромофоров [1].

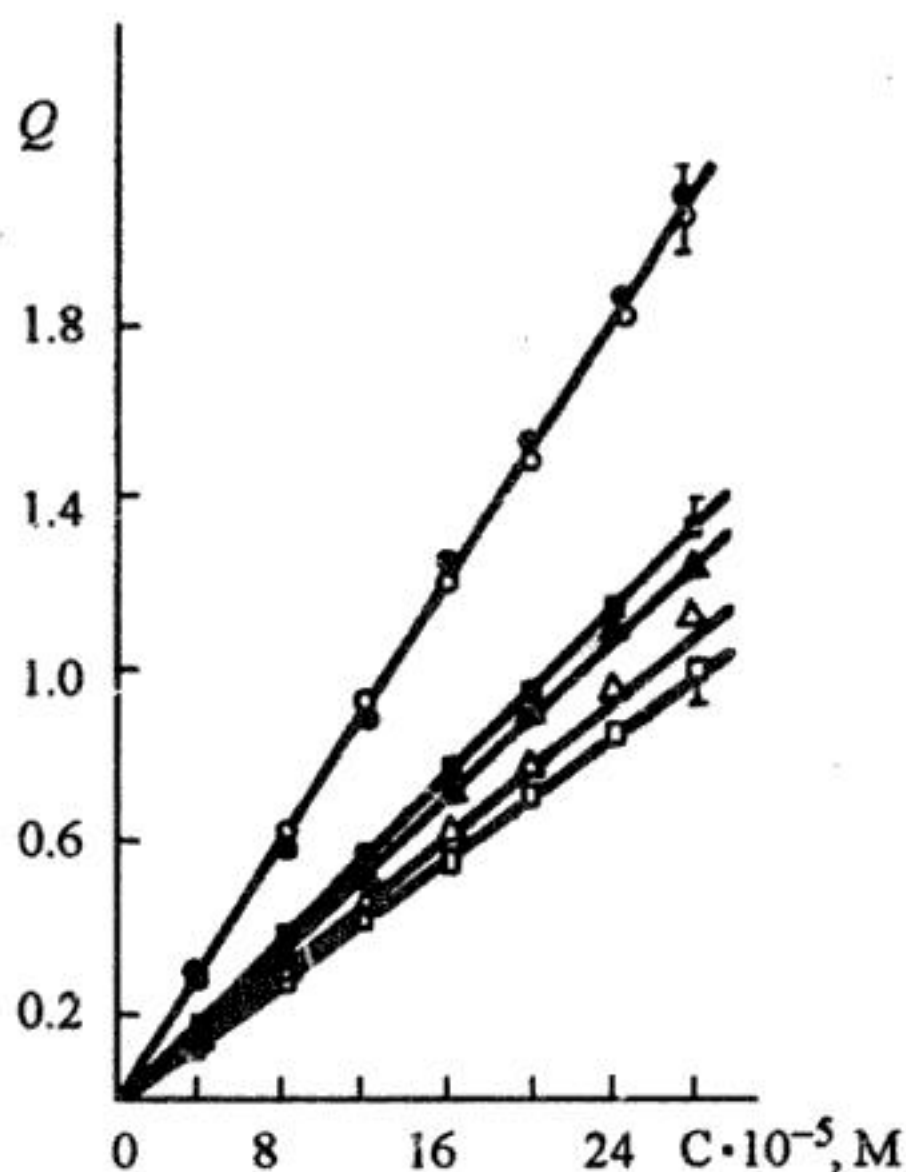


Рис. 1. Графики Штерна-Фольмера тушения флуоресценции цитохрома Р-450 акриламидом:  $\circ, \bullet$  — трис-буфер;  $\Delta, \blacktriangle$  — фосфатидилхолиновые протеолипосомы;  $\square, \blacksquare$  — протеолипосомы, образованные фосфатидилхолином и фосфатидилсерином;  $\circ, \Delta, \square$  — контроль;  $\bullet, \blacktriangle, \blacksquare$  — после замораживания-отогрева

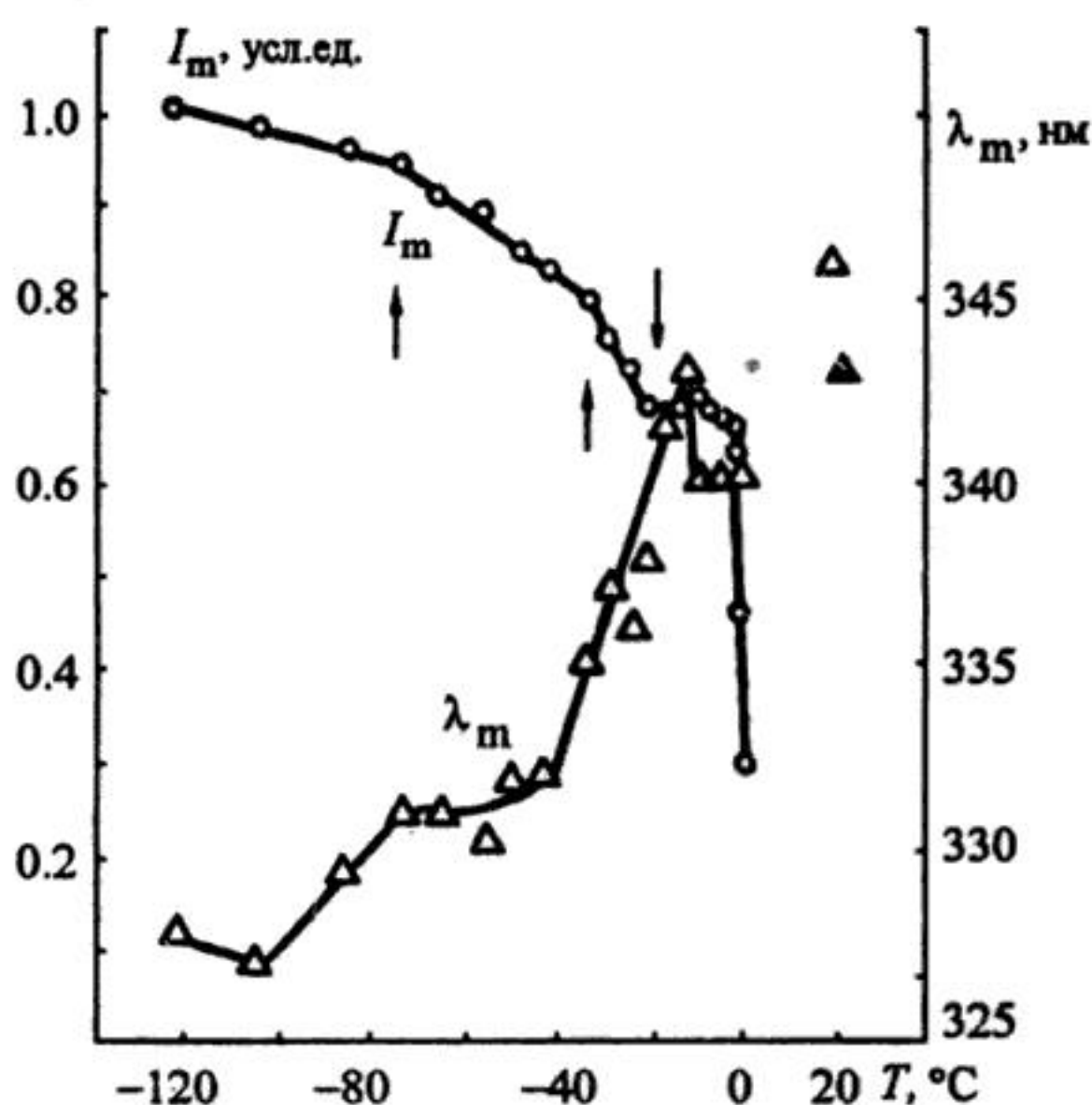


Рис. 2. Температурные зависимости спектральных параметров флуоресценции спектрина в среде экстракции. Отдельно обозначены значения  $\lambda_{\text{max}}$  положения спектров, зарегистрированных при 20 °С до (▲) и после (Δ) замораживания-отогрева

При замораживании спектрина в растворе происходит значительное коротковолновое смещение спектра (до 326 нм при  $-120^{\circ}\text{C}$ ) и увеличение интенсивности флуоресценции, что типично для большинства растворенных белков и является следствием «затормаживания» кооперативной системы белок-вода. Как видно из рис.2, при повышении температуры на фоне общего длинноволнового смещения спектра и снижения интенсивности флуоресценции наблюдаются немонотонные изменения параметров, что свидетельствует, по мне-

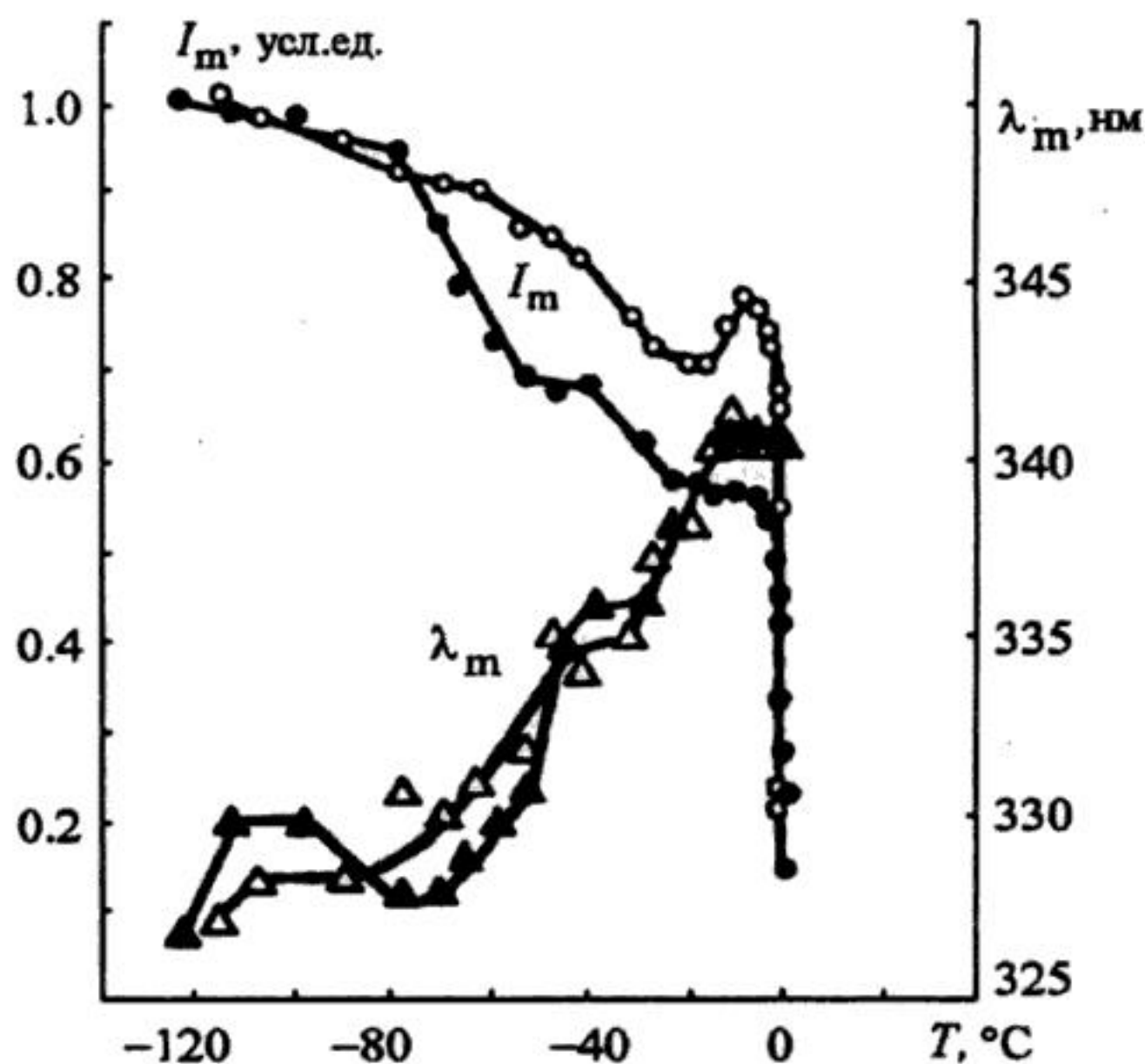


Рис. 3. Влияние хлорида натрия на низкотемпературное состояние спектрина. ▲, ○ — 5 мМ NaCl; ●, ● — 50 мМ NaCl.

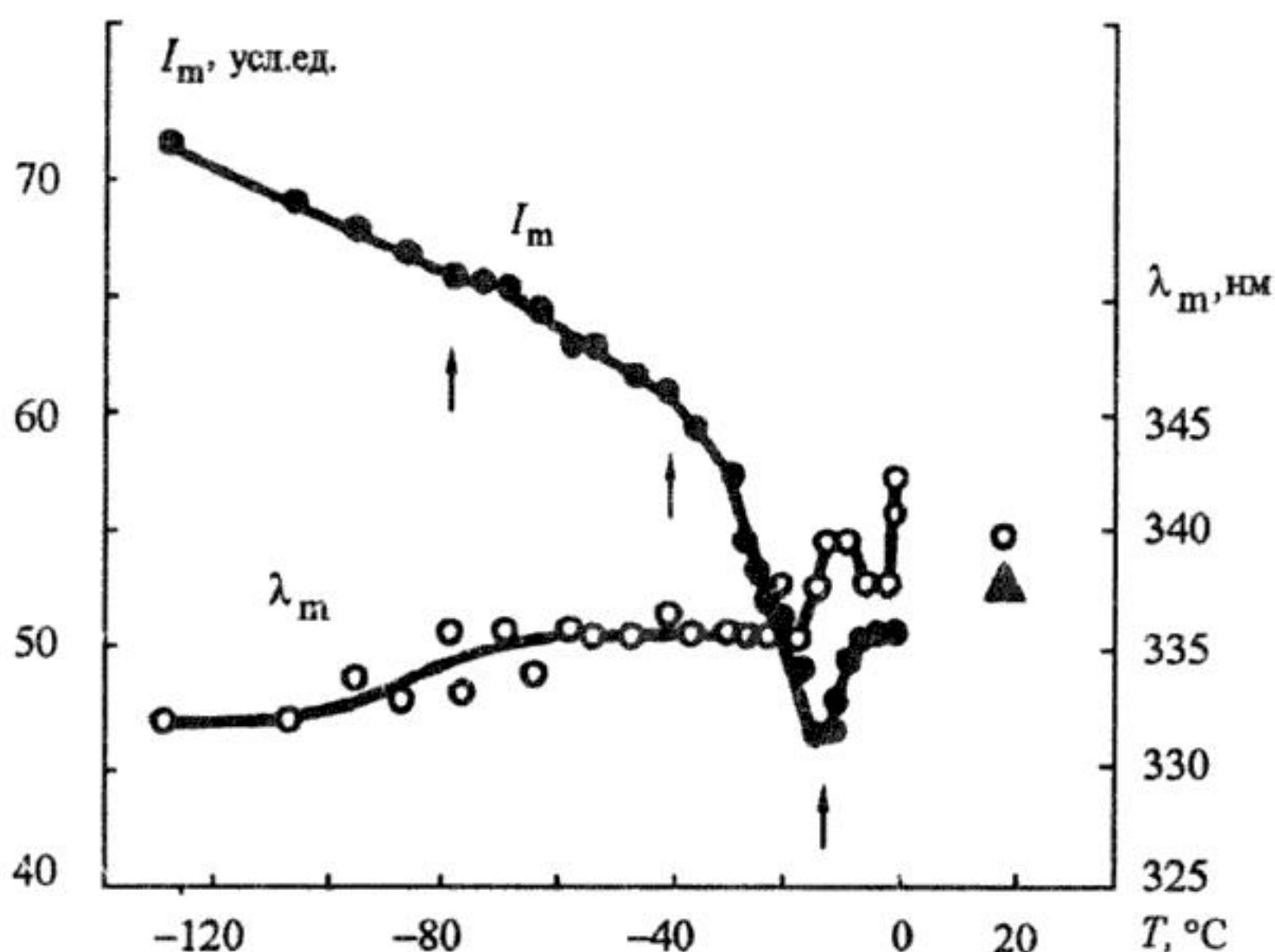


Рис. 4. Температурные зависимости спектральных параметров флуоресценции суммарных белков теней эритроцитов. Отдельно обозначены значения  $\lambda_{\text{макс}}$  положения спектров, зарегистрированных при 20 °С до (▲) и после (○) замораживания-отогрева

нию Э.А.Бурштейна [1], об изменении релаксационной подвижности ближайшего окружения триптофановых остатков - полярных групп спектрина и молекул связанной белком воды.

Такие перестройки наблюдаются при температурах около -80, -55 и -18 °С, причем последний переход сопровождается возгоранием флуоресценции и коротковолновым смещением спектра.

В результате замораживания-отогрева спектр флуоресценции спектрина претерпевает длинноволновый сдвиг на 3-4 нм, что сравнимо по величине эффекта с тепловой денатурацией [3] и интерпретируется как разрыхление белковой молекулы.

Добавление к раствору спектрина NaCl вызывает коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции на 2 нм, что отражает, по-видимому, компактизацию молекулы белка [14]. Присутствие этой соли в среде замораживания в концентрации 5 мМ практически не сказывается на виде температурных зависимостей интенсивности и  $\lambda_{\text{макс}}$  во всем температурном диапазоне, наблюдаются лишь слабые изменения в области -60 °С + -40 °С (рис. 3).

Повышение концентрации соли до 50 мМ усугубляет эти изменения, "проявляя" переходы при -60 и -40 °С. При этом эффективность температурного тушения повышается уже при температурах выше -80 °С. Присутствие соли также снижает возгорание флуоресценции при -18 °С. Однако оно не влияет на направленность изменений после отогрева: как и в контрольных образцах отмечается небольшое длинноволновое смещение спектра флуоресценции.

Триптофановая флуоресценция теней эритроцитов имела максимум испускания с длиной волны 338 нм, что так же, как и в случае с изолированным спектрином, свидетельствует о большой доступности люминофоров белка растворителю. В процессе замораживания до -120 °С спектр флуоресценции претерпевает коротковолновый сдвиг, обусловленный затормаживанием подвиж-

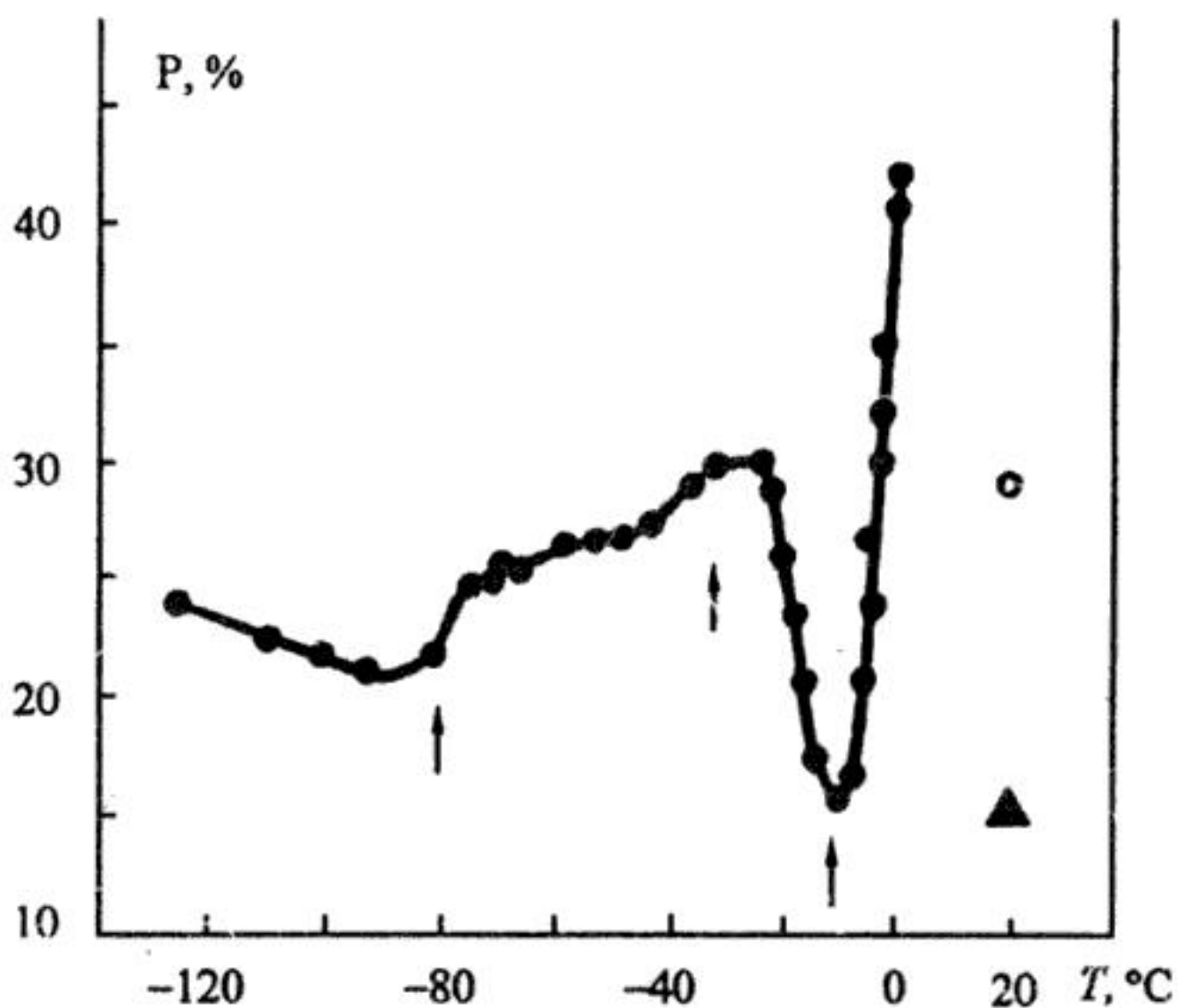


Рис. 5. Температурные зависимости и значения степени поляризации флуоресценции при 20 °С до (●) и после (▲) замораживания-отогрева теней эритроцитов

ности ближайшего микроокружения хромофоров. При отогреве (рис. 4) ход кривой температурного тушения флуоресценции в тенях эритроцитов имеет изменения наклона при температурах около  $-80$ ,  $-40$  и  $-12$  °С, причем последний переход, как и в изолированном спектрине, сопровождается возгоранием флуоресценции и коротковолновым смещением спектра. Изменение поляризации флуоресценции на этапе отогрева (рис. 5) коррелирует по температурным областям с изменениями спектральных параметров, вид температурных зависимостей которых представлен на рис. 4. Резкое изменение степени поляризации выше температуры  $-12$  °С, коротковолновый сдвиг максимума и возгорание флуоресценции указывают на наличие в этой области перестройки, связанной, вероятно, с изменением взаимного расположения белков и липидов, а значит и взаимодействий между ними, что приводит к уменьшению доступности тушителей, увеличению гидрофобности микроокружения и изменению упорядоченности белков.

Таким образом, результаты исследований показывают, что структурные изменения, связанные с криовоздействием, несмотря на некоторые различия, обусловленные природой белковых молекул, фосфолипидным и ионным окружением, имеют одинаковую направленность и необратимый характер, выражающийся в разрыхлении поверхности макромолекул. Одинаковы также низкотемпературные диапазоны структурных изменений во всех исследованных системах. Все это может свидетельствовать как о специфическом ответе белковых молекул на низкотемпературное воздействие, так и о ведущей роли в низкотемпературной динамике белковых комплексов связанной с ними воды. Но в любом случае вызванные низкотемпературным воздействием изменения конформации мембранных, в том числе цитоскелетных белков, могут обуславливать нарушения белок-липидных взаимодействий, вызывая аномальную проницаемость мембран, наблюдаемую зачастую при замораживании клеточных суспензий.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Т.Ф.Морозовой за помощь в получении и обсуждении результатов по исследованию спектрина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белка (природа и применение) // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – М.: ВИНТИ. – 1977. – Т.7. – 190 с.
2. Козлова Н.М., Слобожанина Е.И., Черницкий Е.А. Агрегация спектрина и эритроцитарных мембран под воздействием ионов кальция // Вести Академии наук БССР. Сер. биол. наук. – 1978. – N 5. – С. 49 – 54.
3. Козлова Н.М., Слобожанина Е.И., Воробей А.В., Черницкий Е.А. Температурные переходы спектрина в растворе и в эритроцитарных мембранах // Биофизика. – 1979. – 24, N 6. – С. 1111 – 1113.
4. Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Науменко Е.И. Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журн. – 1985. – 57, N 1. – С. 61 – 64.
5. Розанова Е.Д., Науменко Е.И. Влияние замораживания на встроенную в липосомы цитохромоксидазу // Влияние охлаждения на биологические объекты: Сб. науч. трудов. – Харьков: Б.и., 1990. – С. 131 – 133.
6. Туровец К.К., Щелчков Б.В. Исследование тепловой денатурации белков с помощью двухволнового метода регистрации изменений спектра их ультрафиолетовой флуоресценции // Биофизика. – 1970. – 15, N 6. – С. 965 – 972.
7. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И., Козлова Н.М., Ходан В.Б. pH-агрегация спектрина и эритроцитарных мембран // Вести Академии наук БССР. Сер. биол. наук. – 1977. – N 6. – С. 32 – 38.
8. Akhrem A.A., Andrianov V.I., Bokut S. et al. Thermotropic behavior of phospholipid vesicles reconstituted with rat liver microsomal cytochrome P-450 // Biochim. et biophys. acta. – 1982. – 692, N 2. – P. 287 – 295.
9. Ballas S.K. Red cell membrane protein changes caused by freezing // Transfusion. – 1979. – 19, N 5. – P. 643 – 644.
10. Crowe J.H., Carpenter J.F., Crowe L.M. Application of the preferential exclusion mechanism to preservation of proteins and phospholipid bilayers // Cryobiology. – 1989. – 26, N 6. – P. 535 – 536.
11. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.N. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. – 1971. – 10, N 13. – P. 2606 – 2617.
12. Fishbein W.N., Winkert J.W. Parameters of biological freezing damage in simple solutions: Catalase. 1. The characterization pattern of intracellular freezing damage exhibited in a membraneless system // Cryobiology. – 1977. – 14, N 4. – P. 389 – 398.
13. Haugen D.A., Coon M.J. Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and  $\beta$ -naphthoflavone-inducible microsomal cytochrome P-450 // J. Biol. Chemistry. – 1976. – 251, N 24. – P. 7929 – 7939.
14. Lammel B., Maier G. A spin labeling study of the effects of inorganic ions and pH on the conformation of spectrin // Biochim. et biophys. acta. – 1980. – 622. – P. 245 – 258.
15. Marchesi V.T. Spectrin: present status of a putative cytoskeletal protein of the red cell membrane // J. Membrane Biol. – 1979. – 51. – P. 101 – 131.
16. Skrabut E.M., Crowley J.P., Catsimpoilas N., Valeri C.R. The effect of cryogenic storage on human erythrocyte membrane proteins as determined by polyacrylamide-gel electrophoresis // Cryobiology. – 1976. – 13, N 4. – P. 395 – 403.

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

Поступила 04.06.92

О.А.НАРДІД, С.В.РЕПІНА, Т.С.ДЮБКО

#### ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СТРУКТУРНІ ПЕРЕБУДОВИ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ БІЛКІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків

У роботі наведені результати досліджень по впливу заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$  і наступного відігріву на параметри спектрів власної флуоресценції периферичних і інтегральних білків у розчині і складі штучних і природних мембран. Встановлено, що структурні порушення в досліджених білках, індуковані криовпливом, не дивлячись на деякі відмінності, пов'язані із заміною фосфоліпідного складу протеоліпосом, зміною йонної сили і йонного складу середовища заморожування, мали однакову спрямованість і необоротний характер і проявлялися у довгохвильовому здвигу положення максимуму спектрів флуоресценції. При цьому вирізніші зміни спостерігалися у випадку периферичного білка.

O.A.NARDID, S.V.REPINA, T.S.DUBKO

## THE EFFECT OF LOW TEMPERATURES ON STRUCTURAL CHANGES IN MEMBRANE BOUND PROTEINS

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

The effect of freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  and subsequent thawing on the spectral parameters of intrinsic fluorescence of peripheral and integral proteins in solution and in artificial and natural membranes was studied. It has been found that despite of some differences due to changes in phospholipid composition of proteoliposomes, ionic strength and composition of the freezing medium, structural alterations in the studied proteins induced by freezing had a similar trend and were irreversible manifesting by a long wave shift in position of the fluorescence spectral peaks. The most pronounced changes were observed in the peripheral protein.

УДК 541.64-14.152.2:57.043

А.Н.Терентьев, А.В.Зинченко, В.Д.Зинченко, В.И.Мусатов,  
М.И.Щетинский

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СОСТОЯНИЕ ВОДЫ В КЛЕТКАХ *Y.PESTIS* EV76 ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ-ОТТАИВАНИИ

Методом ядерного магнитного резонанса определяли количество невымерзающей воды при температурах от 0 до  $-40^{\circ}\text{C}$  в клетках *Y.Pestis* EV76, суспендированных в физиологическом растворе и в криозащитных растворах: 1) 10% 1,2-пропандиола; 2) 10% полиэтиленгликоля молекулярной массы 400; 3) 10% поливинилпирролидона; 4) 10% сахарозы  $\pm 0,5\%$  тиомочевины; 5) 5% диметилсульфоксида. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии определяли температуру стеклования ( $t_g$ ), кристаллизации из переохлажденного состояния и плавления ( $t_m$ ) указанных растворов. Показано, что общее количество невымерзающей воды в диапазоне  $t_g < t < t_m$  в суспензиях клеток с добавками криопротекторов не подчиняется правилу простой аддитивности от суммы чисел гидратации отдельных компонентов и для практических задач криоконсервирования и лиофилизации его следует определять экспериментально.

Проблема состояния воды в биологических системах при глубоком охлаждении привлекает внимание исследователей, с одной стороны, как методический подход изучения гидратации биополимеров, а с другой стороны она представляет интерес для понимания механизмов криоповреждения и криозащиты биологических структур.

Влияние криопротекторов на незамерзающий компонент воды в биологических системах весьма сложным образом связано с гидратационными свойствами макромолекул и с межмолекулярными взаимодействиями криопротекторов с водой и с компонентами биологической системы. Известно, что даже в таких сравнительно простых системах, как растворы белков с добавками криопротекторов, вклад каждого из компонентов в суммарное количество незамерзающей воды зависит от концентрации другого компонента [2, 3, 6]. Однако, систематического исследования влияния криопротекторов различных типов на незамерзающий компонент воды в клетках до сих пор не проводили.

Настоящая работа посвящена экспериментальному определению количества незамерзающей воды в суспензии клеток *Y.Pestis* EV76 в присутствии криопротекторов проникающего и непроникающего типов, а также изучению процесса затвердевания этого компонента воды при понижении температуры образца.

Выбор в качестве объекта исследования клеток чумного микроба *Y. Pestis* EV76 связан прежде всего с тем, что изготовление вакцинного штамма *Y. Pestis* EV76 включает процессы замораживания в защитной среде и лиофилизацию [7]. В этой связи, сведения о физических характеристиках незамерзающего компонента воды в клетках и фазовых переходах в клеточных суспензиях при температуре ниже 0°C представляют определенный практический интерес.

В работе использовали вакцинный штамм чумного микроба *Y. Pestis* EV76 линии НИИЭГ. Бактерии выращивали на твердой питательной среде Хоттингера при 28°C в течение 48 ч. Культуру клеток смывали физиологическим раствором и суспендировали в криозащитных средах. Для этого использовали маточные растворы криозащитных веществ, приготовленные на физиологическом растворе с концентрацией криозащитного вещества 30–40%. Маточный раствор добавляли к клеточной суспензии по традиционной методике [5] небольшими порциями, во избежание осмотического шока клеток. Варьируя количество маточного и физиологического раствора, доводили концентрацию криозащитного вещества до требуемого значения и концентрацию клеток в суспензии до  $10^9$  кл/мл.

Для исследований использовали суспендирующие среды с различными криопротекторными веществами, со следующими составами: 1) среда СЖТ – 10% сахарозы, 1% желатины, 0,5% тиомочевины (эта среда широко используется для криоконсервирования и лиофилизации штаммов *Y. Pestis* EV76); 2) криопротекторы проникающего действия – 5% диметилсульфоксида и 10% 1,2-пропандиола; 3) криопротекторы непроникающего действия – 10% поливинилпирролидона и 10% полиэтиленгликоля молекулярной массы 400. Растворы готовили на бидистилляте, применяли полиэтиленгликоль фирмы “Merck” марки “Purum”, остальные реактивы отечественного производства марки ХЧ.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре высокого разрешения BS 567 А “Tesla” с рабочей частотой 100 МГц для протонов. Точность поддержания температуры образца  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Погрешность определения интенсивности сигнала 10%. Исследуемые образцы помещали в специально изготовленные фторопластовые ампулы диаметром 5 мм, которые не разрушаются при замерзании водных растворов. В качестве внешнего стандарта применяли тетраметилсилан (ТМС) в запаянном стеклянном капилляре, который помещали в ампулу с исследуемым образцом.

Методом ЯМР определяли количество незамерзшей воды в образцах при температурах ниже точки замерзания основной массы растворителя. В основе экспериментальной методики лежит метод Кюнтца [7], суть которого состоит в том, что при замерзании части воды в образце ее сигнал ЯМР уширяется и не регистрируется в спектрах высокого разрешения.

Сигнал незамерзшей воды регистрируется в спектре ЯМР в виде сравнительно узкой линии. Этот сигнал относят к фракции воды, связанной с гидрофильными центрами биополимеров, либо не переходящей в твердую фазу в силу действия других факторов (например, стерических ограничений). Таким образом, в замороженных биологических объектах основная масса “свободной воды” не вносит вклада в спектр ЯМР высокого разрешения, а интенсивность узкого сигнала служит источником информации о фракции невымерзающей воды.

Влияние криопротекторов на состояние воды в клетках *Y. Pestis* EV76 мы анализировали на основании сопоставления интенсивности сигнала ЯМР воды при температуре ниже 0°C в клеточной суспензии без криопротекторных до-

бавок, в образцах криозащитной среды без клеток и в суспензии клеток в криозащитной среде. Исследуемые системы готовили с одинаковыми концентрациями клеток и криозащитных добавок в каждой серии экспериментов для упрощения анализа результатов.

Методом ДСК измеряли теплопоглощение образцов в процессе их непрерывного нагрева от  $-196^{\circ}\text{C}$  до температуры полного плавления. Использовали калориметр, разработанный нами ранее [4]. Образцы массой 500 мг охлаждали погружением в жидкий азот, скорость нагрева в процессе измерения составляла  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , погрешность измерения температуры на термограммах равна  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

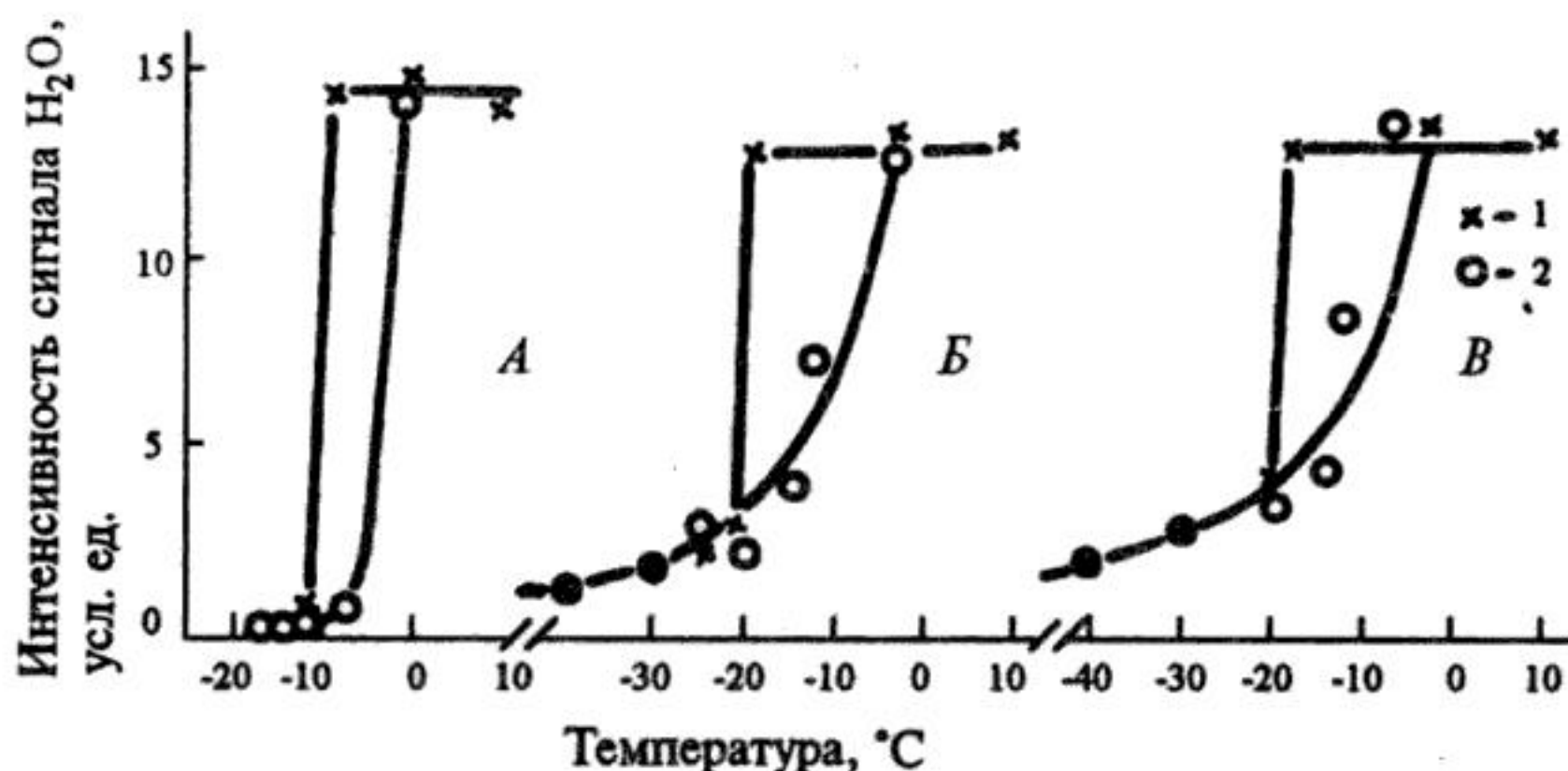


Рис. 1. Зависимость интенсивности сигнала ЯМР воды от температуры в суспензиях клеток *Y. Pestis* EV76 без криопротектора (А), в криозащитной среде 10% ПЭГ-400 (Б) и в системе, содержащей бактериальные клетки в среде 10% ПЭГ-400 (В): 1 – охлаждение; 2 – нагрев

На рис. 1 в качестве примера представлены зависимости интенсивности сигнала ЯМР воды от температуры в многокомпонентной среде СЖТ, в бактериальной массе без добавок и с добавками криозащитной композиции СЖТ.

Резкое уменьшение интенсивности сигнала ЯМР воды при охлаждении соответствует началу кристаллизации при некотором переохлаждении системы. В процессе оттаивания интенсивность сигнала меняется по другой ветви, соответствующей равновесному соотношению жидкой и твердой фаз при каждом значении температуры. Интенсивность сигнала при температурах  $-20 \div -30^{\circ}\text{C}$  определяется количеством связанной воды в системе, сохраняющей при этих температурах более высокую подвижность, чем вода в составе кристаллов льда. Значения интенсивности сигнала ЯМР ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , нормированные к интенсивности сигнала ТМС, представлены в табл. 1. Анализируя эти данные, можно видеть, что влияние исследуемых нами криозащитных сред на состояние воды в клетках *Y. Pestis* EV76 неодинаково. Например, отличие нормированных интенсивностей сигналов невымерзшей воды в суспензии клеток в растворе ПВП и в образце раствора ПВП без клеток лежит в пределах погрешности эксперимента. В образце суспензии, помещенной в 5% ДМСО, интенсивность сигнала невымерзшей воды несколько ниже, чем в растворе 5% ДМСО без клеток. В то же время в средах СЖТ и 10% ПЭГ-400 наблюдается обратная зависимость – некоторое увеличение интенсивности сигнала при добавлении клеток. Можно предположить, что наблюдаемое увеличение сигнала подвижной воды обусловлено появлением фракции невымерзающей воды (так назы-

Т а б л и ц а 1

Зависимость интенсивности сигнала ЯМР невымерзшей воды от температуры в суспензиях бактерий *Y.Pestis* EV76 и в различных криозащитных средах

| Исследуемый объект  | Интенсивность сигнала ЯМР (усл.ед.), $\pm 10\%$ |      |      |      |      |      |
|---------------------|-------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
|                     | Температура, °C                                 |      |      |      |      |      |
|                     | -12                                             | -15  | -20  | -25  | -30  | -40  |
| <i>Y.Pestis</i> EV7 | 0.30                                            | 0.28 | —    | —    | —    | —    |
| Среда СЖТ           | 4.33                                            | 2.55 | —    | —    | —    | —    |
| СЖТ+EV76            | 5.60                                            | 3.42 | —    | —    | —    | —    |
| 5% ДМСО             | 3.75                                            | 3.52 | 2.13 | 1.70 | 1.13 | 0.75 |
| 5% ДМСО + EV76      | 3.28                                            | 3.35 | 1.57 | 1.12 | 1.02 | 0.68 |
| 10% ПЭГ-400         | 7.40                                            | 4.10 | 2.43 | 2.65 | 1.88 | 1.18 |
| ПЭГ-400 + EV76      | 8.39                                            | 4.45 | 3.48 | —    | 2.74 | 1.96 |
| 10% ПВП             | —                                               | 1.43 | 1.20 | 0.85 | 0.76 | 0.54 |
| 10% ПВП+ EV76       | —                                               | 1.21 | 1.10 | 0.82 | 0.73 | 0.41 |
| 10% 1,2-ПД          | 8.21                                            | 4.55 | 3.86 | 2.94 | 1.13 | 0.80 |
| 1,2-ПД + EV76E      | 8.60                                            | 4.81 | 3.92 | 3.11 | 1.22 | 0.93 |

ваемой иммобилизованной воды), локализованной в виде малых замкнутых областей. Кристаллизация льда в малых областях затруднена в силу действия стерических факторов. К появлению такой фракции воды может приводить, например, ее локализация в примембранных областях в результате адсорбции на мембране криозащитного вещества. Существование отдельной водной фракции в виде малых замкнутых областей в составе мембранных структур обнаружил С.И.Аксенов [1]. Гипотезу о другом механизме появления фракции незамерзающей воды в клеточных суспензиях предложил недавно Фаррант [8]. Суть предложенного механизма состоит в том, что в присутствии криопротекторов непроницающего типа кристаллизация происходит только во внеклеточной жидкости, а клетки обезвоживаются, что эквивалентно возрастанию концентрации водорастворимых компонентов цитоплазмы. В результате внутриклеточная среда приобретает способность стекловаться при низких температурах.

Согласно известным экспериментальным результатам [9], полученным на эритроцитах, величина осмотического сжатия клеток в гипертонических растворах составляет не более 50% от начального объема. Основываясь на этих данных и на известных значениях концентраций осмотически активных веществ в нормальных эритроцитах, можно оценить суммарную концентрацию всех компонентов цитоплазмы после осмотического сжатия клеток примерно в 300 ммоль/л. Очевидно, что и в других типах клеток при осмотическом сжатии будут достигаться концентрации, по порядку величины близкие к этому значению. Вместе с тем известно, что при таких концентрациях водных растворов получить стеклообразную форму массивных образцов в услови-

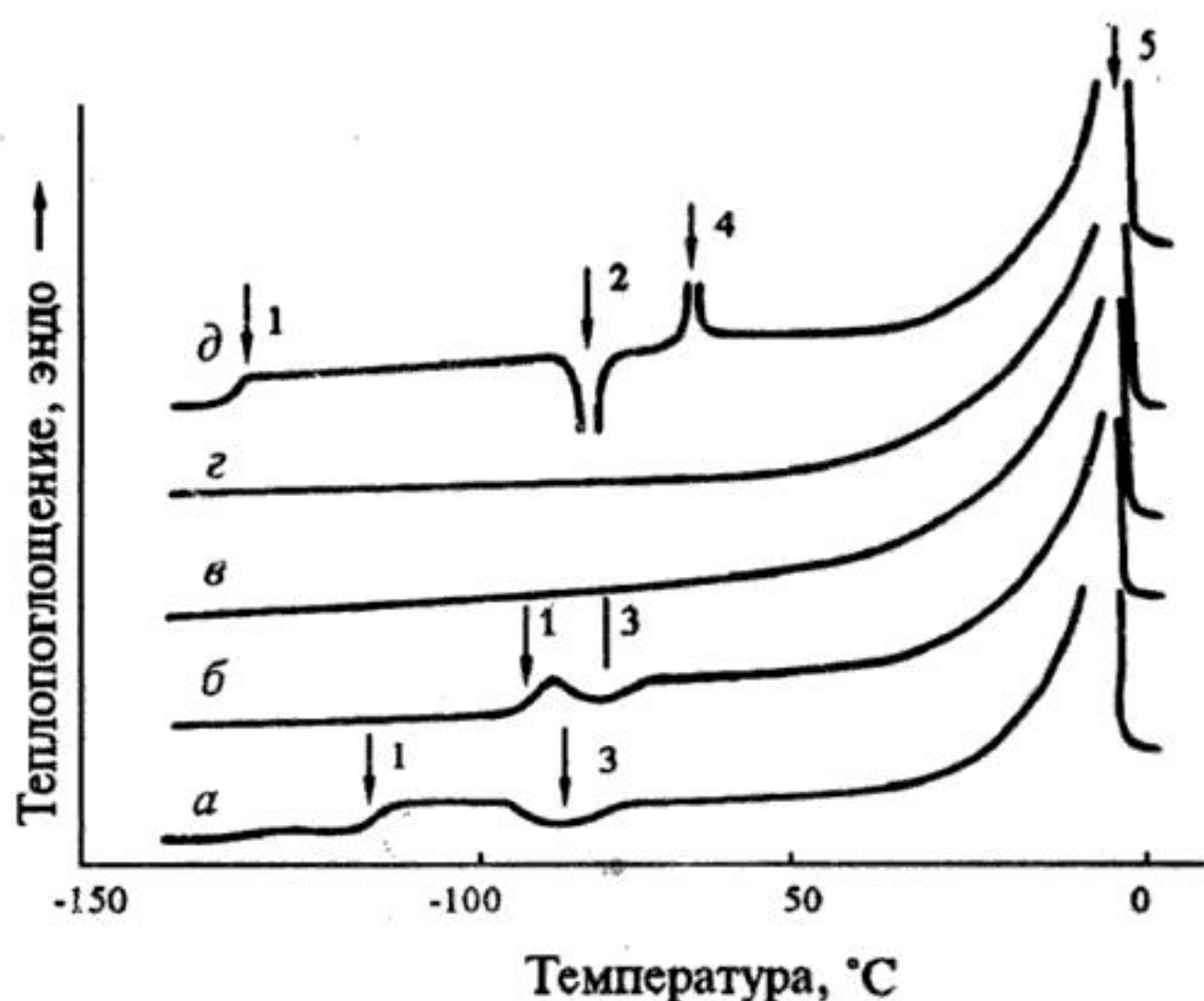


Рис. 2. Термограммы криозащитных растворов: а, 10% 1,2-ПД; б, ПЭГ-400, 10%; в, 10% ПВП; з, СЖТ; д, 5% ДМСО. Пояснения в тексте

ях медленного охлаждения (какие использовались в наших ЯМР-экспериментах), не удастся. Для этого нужны концентрации неводного компонента выше 1 моль/л, причем полное стеклование раствора способны вызвать только немногие неводные добавки [2]. Отсюда можно заключить, что затвердевание воды в клетках без кристаллизации происходит по механизму, несколько отличному от стеклования жидкостей в массивных образцах. Возможно, в данном случае, определенную роль играет достаточно медленный обмен между внутри- и внеклеточной водой, в результате которого рост кристаллического ядра нуклеации льда в клетке возможен только за счет внутриклеточной воды. С возникновением ядра нуклеации происходит дополнительное повышение концентрации водорастворимых компонентов цитоплазмы и ядро нуклеации перестает удовлетворять критерию "критических размеров", при которых оно способно к росту. Таким образом, внутриклеточная вода переохлаждается без кристаллизации.

Т а б л и ц а 2

Температура фазовых переходов и стеклования в криозащитных средах. Условия охлаждения и нагрева указаны в тексте

| Криозащитная среда | Температура, °C ± 0.5 |                                         |                     |                                          |                         |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------------|---------------------|------------------------------------------|-------------------------|
|                    | Стеклование           | Кристаллизация переохлажденной жидкости | Плавление эвтектики | Продолжение роста кристаллов при нагреве | Окончательное плавление |
| 5% ДМСО            | -126                  | -76                                     | -63.5               | —                                        | -4.0                    |
| 10% ПЭГ-400        | -85                   | —                                       | —                   | -77.0                                    | -3.0                    |
| 10% ПВП            | —                     | —                                       | —                   | —                                        | -1.0                    |
| 10% 1,2-ПД         | -108.0                | —                                       | —                   | -80.5                                    | -4.0                    |
| СЖТ                | —                     | —                                       | —                   | —                                        | -4.5                    |

Применение ЯМР высокого разрешения при температурах ниже  $-40^{\circ}\text{C}$  затруднено из-за уширения сигналов  $\text{H}_2\text{O}$  и углеводородных групп криопротекторов и их слипания. Вместе с тем, для криобиологов представляют интерес сведения о процессах полного замораживания материала при более глубоком охлаждении. Такую информацию мы получали, используя метод ДСК.

На рис. 2 показаны зависимости теплопоглощения некоторых из исследуемых образцов от температуры в процессе нагрева от  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Скачки теплопоглощения и пики на полученных зависимостях соответствуют следующим процессам: 1 – стеклование; 2 – кристаллизация переохлажденной жидкости; 3 – завершение роста кристаллов льда, прерванного быстрым охлаждением; 4 – плавление эвтектики; 5 – полное плавление всей системы.

В табл. 2 представлены значения температур этих процессов в исследуемых образцах. Особый интерес с практической точки зрения представляют значения температур стеклования. Выше температуры стеклования в системе появляется жидкая фаза, что должно приводить к увеличению молекулярной подвижности и к ускорению химических реакций в замороженной клеточной суспензии. Следовательно, длительное хранение клеток при температурах выше  $t_g$  нежелательно.

Как видно из рис. 2, стеклование наблюдается в растворах ДМСО, 1,2-ПД, ПЭГ-400. В среде СЖТ и в 10% растворе ПВП стеклование не регистрируется методом ДСК. По-видимому, в двух последних случаях отсутствуют макроскопические стеклообразные включения в виде отдельной фазы, либо их размеры весьма малы, и процесс стеклования распределен на широкий диапазон температур. Это важное свойство данных защитных сред может играть существенную роль при использовании СЖТ и ПВП в качестве сред для сублимационной сушки. Известно, что жидкие включения (какими становятся стеклообразные фазы выше температуры стеклования) весьма нежелательны в технологическом процессе лиофилизации. Они приводят к таким явлениям, как коллапс и разрушение образца [2].

Таким образом, представленные результаты исследований свидетельствуют о сложном влиянии многокомпонентных защитных сред на состояние незамерзающей фракции воды в клеточных суспензиях и на возможность получения материала в стеклообразном состоянии. Это обуславливает необходимость экспериментального определения состояния воды при низких температурах в каждом конкретном случае при разработке криобиологических технологий. Найденные температуры стеклования могут быть использованы для выбора оптимальных температур длительного хранения образцов клеток *Y. Pestis* EV76.

Авторы выражают благодарность И.П.Высеканцеву за помощь в приготовлении образцов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенов С.И., Горячев С.Н., Фатеева М.В., Никитина Т.Н. Исследование различных штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* с разной устойчивостью к лиофилизации методом спинного эха ЯМР // Изв. АН СССР. Сер.биол. – 1977. – N 5. – С.729–736.
2. Вода и водные растворы при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$  /Под ред. Ф.Франкса. Пер. с англ. – Киев: Наук.думка.– 1985. – 387 с.
3. Зинченко В.Д. Использование метода ЯМР для исследования механизмов криповреждения и криозащиты // Моделирование криобиологических процессов: Сб. науч.тр.– Харьков. – 1988. – С. 146–153.

5. *Криобиология и биотехнология* / А.А.Цуцаева, В.Г.Попов, К.М.Сытник и др. – Киев: Наук. думка, 1987. – 214 с.
6. *Мойсеев В.О., Манк В.В., Зінченко В.Д., Зінченко О.В.* Про стан води в розчинах гемоглобіну з добавками поліетиленоксиду // *Доповіді АН УРСР*. – 1977. – сер.Б. – N 11. – С. 1033–1035.
7. *Терентьев А.Н., Кадетов В.В., Богданова М.Н. и др.* Влияние низких температур на жизнеспособность бактерий *Y.Pestis* EV76 // *Криобиология*. – 1990. – N 2. – С. 52–53.
8. *Фаррант Дж.* Консервирование и стеклование // *Криобиология*. – 1988. – N 3. – С. 12–14.
9. *Heubusch C.Y., Jung C.Y., Green F.A.* The osmotic response of human erythrocytes and the membrane cytoskeleton // *J. Cell. Physiol.* – 1988. – 122, N 2. – P. 266–203.
10. *Kuntz I.D., Brassfield T.S., Law W.D., Purcell B.V.* Hydration of macromolecules // *Science*. – 1969. – 163, N 3873. – P. 1329–1331.

Ин-т проблем криобиологии и криомедицины  
АН Украины, г.Харьков;  
Ростовский-на-Дону научно-исследовательский  
противочумный ин-т

Поступила 04.09.91

# О.М.ТЕРЕНТЬЄВ, О.В.ЗІНЧЕНКО, В.Д.ЗІНЧЕНКО, В.І.МУСАТОВ, М.І.ЩЕТИНСЬКИЙ ВПЛИВ ДЕЯКИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА СТАН ВОДИ В КЛІТИНАХ *Y.Pestis* EV76 ПРИ ЗАМОРОЖУВАННІ-ВІДТАЮВАННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків;  
Ростовський-на-Дону науково-дослідний протичумний інститут

Методом ядерного магнітного резонансу визначали кількість невимерзаючої води при температурах від 0 до  $-40^{\circ}\text{C}$  в клітинах *Y.Pestis* EV76, суспендованих у фізіологічному розчині і в криозахисних розчинах: 1) 10% 1,2 пропандіола; 2) 10% поліетиленгліколя молекулярної маси 400; 3) 10% полівінілпірролідона; 4) 10% цукрози + 0,5% тіосечовини; 5) 5% діметилсульфоксиду. Методом диференційованої скануючої калориметрії визначали температуру склування ( $t_g$ ), кристалізації із переохолодженого стану і плавлення ( $t_m$ ) названих розчинів. Показано, що загальна кількість невимерзаючої води в діапазоні  $t_g < t < t_m$  в суспензіях клітин з добавками криопротекторів не є сумою чисел гідратації компонентів системи. Для практичних завдань криоконсервування і ліофілізації його слід визначати експериментально.

# A.N.TERENTYEV, A.V.ZINCHENKO, V.D.ZINCHENKO, V.I.MUSATOV, M.I.SHCHETINSKY THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON THE STATE OF WATER IN *Y.PESTIS* EV76 CELLS UPON FREEZE-THAWING

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian  
Academy of Sciences, Kharkov; Antiplate Research Institute of Rostov-on-Don

The quantity of unfrozen water was determined using the method of nuclear magnetic resonance at 0 to  $-40^{\circ}\text{C}$  in *Y.Pestis* EV76 cells suspended in saline or cryoprotective solutions, that is 1) 10% 1,2-propanediol; 2) 10% polyethylene glycol of molecular weight 400; 3) 10% polyvinyl pyrrolidone; 4) 10% sucrose + 0.5% thiourea; 5) 5% dimethylsulfoxide. The temperatures of glass formation ( $t_g$ ), crystallization from the supercooled state, and melting ( $t_m$ ) of the mentioned solutions were determined by differential scanning calorimetry. The total quantity of unfrozen water in cell suspensions with added cryoprotectants in the range of  $t_g < t < t_m$  has been demonstrated not be equal to the sum of hydration numbers of individual components. This parameter should be determined experimentally for the practice of cryopreservation and lyophilization.

## ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ 600 НА СТРУКТУРУ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Методами УФ-спектрофотометрии и гельфильтрации исследовано влияние различных режимов замораживания на структуру бычьего сывороточного альбумина (БСА) в водных растворах. Наиболее повреждающим режимом является медленное замораживание до точки окончания кристаллизации раствора с последующим быстрым охлаждением до температуры жидкого азота, что связывается с длительным действием гиперконцентрации солей и дегидратацией макромолекулы. Отмечено разрыхление молекул БСА после замораживания-отогрева в буферных растворах и образование необратимых агрегатов. 20%-ая концентрация ПЭГ-600 предотвращает как агрегацию, так и разрыхление молекул БСА.

Сывороточный альбумин считается белком, устойчивым к действию различных денатурантов, а также к действию низких температур. Тем не менее в литературе отмечено образование S-S связей и агрегации между молекулами бычьего сывороточного альбумина при медленном замораживании до  $-5^{\circ}\text{C}$  [6]. Показано [8] изменение биологических свойств препаратов человеческого сывороточного альбумина при хранении как при положительных, так и при отрицательных температурах. Эти немногочисленные данные свидетельствуют о некоторых конформационных перестройках в макромолекуле при действии низких температур.

При исследовании конформационных изменений в белках широко применяются методы ультрафиолетовой спектрофотометрии [2, 3]. Получаемая этими методами информация о количестве хромофорных групп, их микроокружении и взаимодействии с растворителем полезна для сравнительного анализа благодаря спектральным различиям в поглощении хромофоров в разных состояниях. Один из информативных методов УФ-спектрофотометрии – метод производных спектров поглощения [1]. Этот метод позволяет выявить более тонкие изменения, характеризующие конформационное состояние хромофорных групп исследуемого белка, и изучать переходы между этими состояниями. Кроме того, на производных спектров поглощения практически не отражается изменение светорассеяния растворов.

Нами было исследовано влияние различных режимов замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 (ПЭГ-600) на структуру бычьего сывороточного альбумина в растворе. Для изучения структурных изменений белка в результате криовоздействия использовались методы УФ-спектрофотометрии и гельфильтрации.

В исследованиях использовали коммерческий препарат бычьего сывороточного альбумина фирмы "SIGMA" (США). Белок был предварительно очищен от загрязняющих примесей (в основном димеров) методом гелипроникающей хроматографии. Колонка диаметром 25 мм и длиной 40 см заполнялась сефадексом G-100 фирмы "Pharmacia" (Швеция). Затем колонка промывалась в течение 20 ч буфером (1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ трис- $\text{HCl}$ , 100 мМ  $\text{KCl}$ ,  $\text{pH}=7.1$ ). Белок в концентрации 150 мг/см<sup>3</sup> растворялся в том же буфере и наносился на колонку. Элюция проводилась при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Выход фракций контролировался спектрофотометрически по коэффициенту экстинкции при 279 нм. Собранная фракция белка далее диализовалась против дистиллированной воды в течение суток и лиофилизировалась. Для приготовления рас-

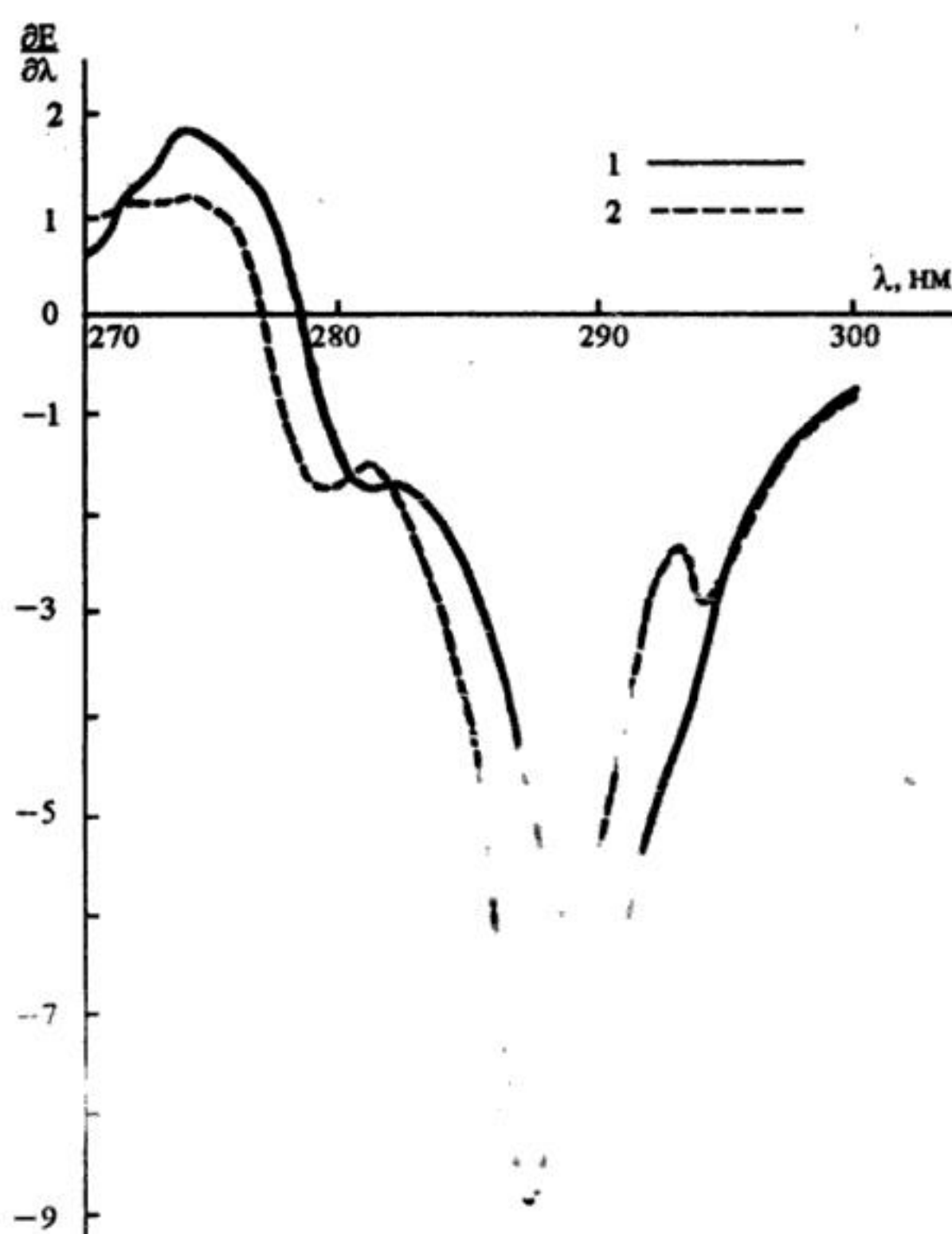


Рис. 1. Первая производная спектра поглощения растворов БСА: 1 – БСА в 0.05 М Na-фосфатном буфере, 0.1 М KCl (pH = 7.1); 2 – БСА в 0.05 М Na-фосфатном буфере, 0.1 М KCl после замораживания-отогрева (режим 4)

творов были использованы хлористый калий и полиэтиленгликоль (ПЭГ-600) марки “ЧДА”.

Замораживание проводилось на программном замораживателе ЗПБ 000.000 по следующим режимам:

*режим 1:* медленное замораживание со скоростью 1 °C/мин до – 120 °C дальнейшее охлаждение со средней скоростью 70 ÷ 80 °C/мин до –196 °C;

*режим 2:* быстрое замораживание со средней скоростью 70 ÷ 80 °C/мин до –196 °C;

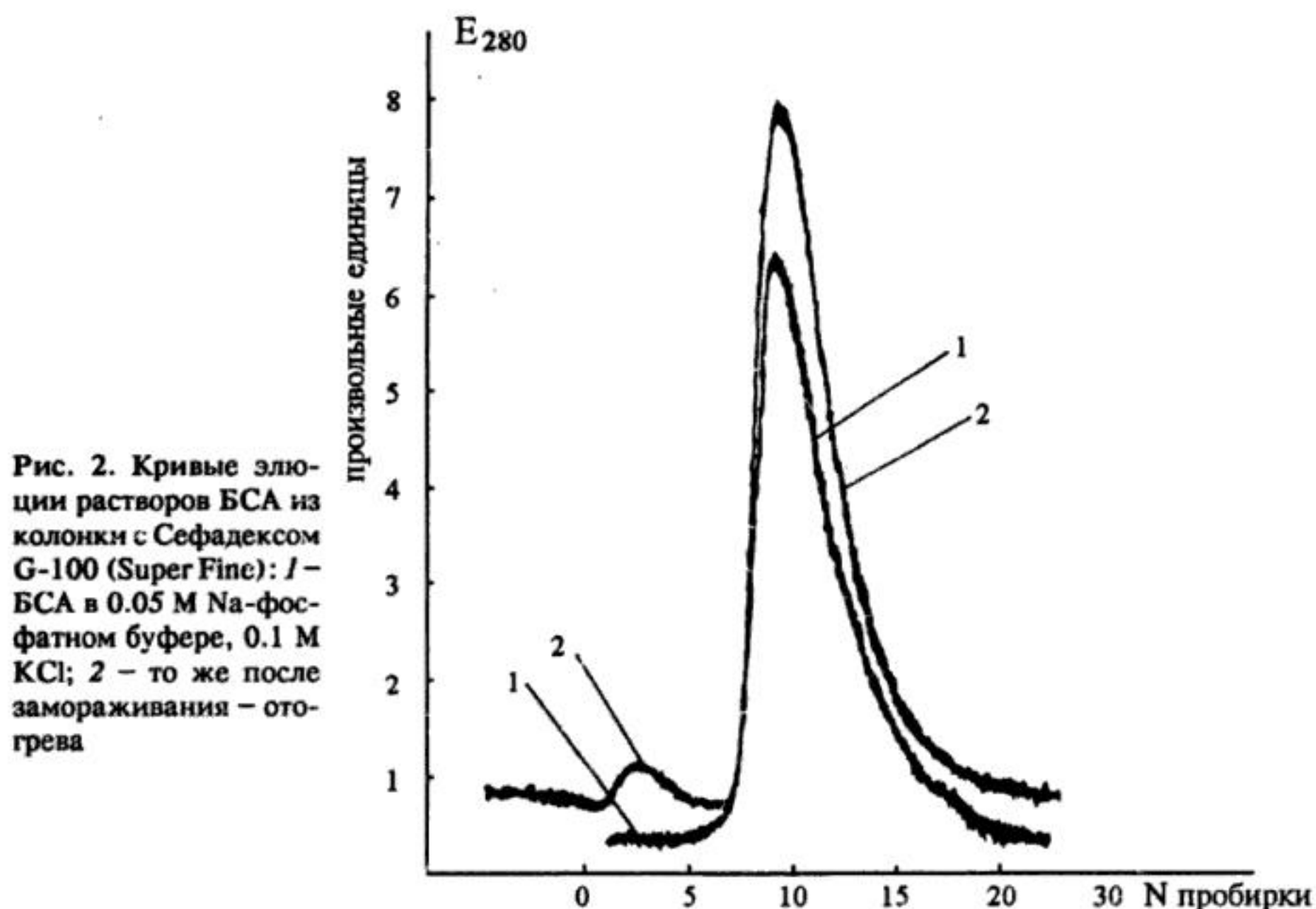
*режим 3:* медленное замораживание со скоростью 1 °C/мин до точки начала кристаллизации и дальнейшее охлаждение со скоростью 70 ÷ 80 °C/мин до – 196 °C;

*режим 4:* медленное замораживание со скоростью 1 °C/мин до точки окончания кристаллизации и дальнейшее охлаждение со скоростью 70 ÷ 80 °C/мин до – 196 °C. Отогрев проводили в водяной бане при температуре 40 °C. Температуры начала и окончания кристаллизации, которые определялись экспериментально для чистых растворителей, приведены в таблице.

| Растворитель                         | Температура начала кристаллизации (0 °C) | Температура окончания кристаллизации (0 °C) |
|--------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 0.05 М Na-фосфатный буфер, 0.1 М KCl | – 2                                      | – 22                                        |
| 20% ПЭГ-600                          | – 4                                      | – 31                                        |
| 40% ПЭГ-600                          | – 9                                      | – 40                                        |

Спектры поглощения записывались на спектрофотометре "Pye Unicam" SP-8000 (Англия). Обработка спектров велась на ЭВМ СМ-1. Спектры вводились в ЭВМ с помощью системы "УСО Контур". Программа получения первой производной спектра поглощения предусматривает предварительное сглаживание спектра по методу оптимального сглаживания [4].

Для каждого образца до и после криовоздействия был снят спектр поглощения и вычислены первые производные спектров по длине волны. После замораживания БСА в 0,05 М Na-фосфатном буфере, 0,1 М KCl во всех образцах увеличивается светорассеяние, что свидетельствует о наличии агрегатов [2]. Анализ УФ-спектров и их производных показал, что наиболее повреждающим режимом для БСА в фосфатном буфере является медленное замораживание со скоростью 1 °С/мин до точки окончания кристаллизации с последующим бы-



стрым охлаждением со средней скоростью  $70 \div 80$  °С/мин до температуры жидкого азота. В этом случае после криовоздействия наблюдается коротковолновый сдвиг спектра поглощения. Кроме того, изменяется также и структура спектра, что особенно четко проявляется на графике первой производной (рис. 1). Отрицательный максимум на 290 нм сдвигается до 287 нм. Кроме того, разрешаются максимумы на 280 и 295 нм.

Общий коротковолновый сдвиг спектра поглощения свидетельствует о переходе ароматических хромофоров – тирозина и триптофана – в более полярное окружение, т.е. в воду [2]. Следовательно, можно предположить, что молекула БСА разрыхляется в результате замораживания – отогрева.

После отогрева образцы были подвергнуты гельфильтрации на колонке с сефадексом G-100 (Super Fine). Все образцы после замораживания – отогрева содержали фракцию агрегатов, что видно из представленной на рис. 2 кривой элюции. Первый максимум соответствует агрегатам. Наибольшая доля агрегированных молекул белка содержится в пробе, подвергнутой наиболее повреждающему режиму замораживания (режим 4).

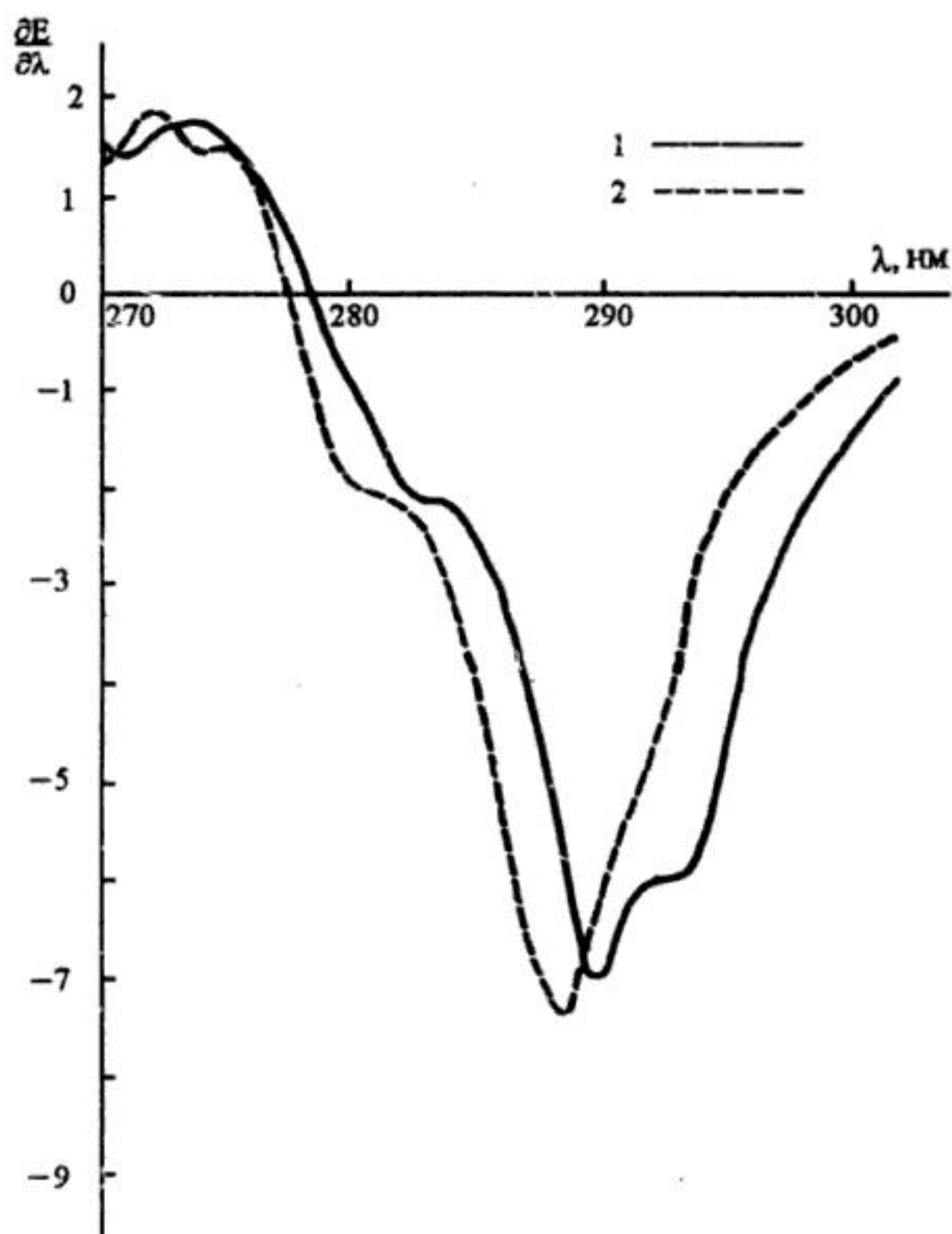


Рис. 3. Первая производная спектра поглощения растворов БСА: 1 – БСА в 40%-ном ПЭГ-600; 2 – БСА в 40%-ном ПЭГ-600 после замораживания-отогрева (режим 4)

Аналогичные исследования были проведены с раствором БСА, содержащим 40% ПЭГ-600. В этом случае отмечено отсутствие агрегатов при фильтрации на колонке. Кроме того, все режимы замораживания оказывают существенно меньшее повреждающее действие, что проявляется в меньшем коротковолновом сдвиге спектров поглощения (0,5–1,0 нм) по сравнению со сдвигами для образца БСА после замораживания в фосфатном буфере. Однако здесь, как и в случае БСА, замороженного в буфере, наиболее повреждающий режим — это медленное замораживание до точки окончания кристаллизации (– 40 °С) и дальнейшее охлаждение со средней скоростью  $70 \div 80$  °С/мин до – 196 °С (рис 3).

Эксперименты по замораживанию-отогреву БСА в присутствии 20%-ного ПЭГ-600 не выявили изменений в спектре поглощения и его производной по сравнению с контрольным образцом БСА в 20%-ном ПЭГ-600 без замораживания. На рис. 4 представлена I производная спектра поглощения раствора БСА в 20%-ном ПЭГ-600, подвергнутого 10 циклам наиболее повреждающего режима замораживания. В пределах погрешности I производная спектра совпадает с контролем.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно заключить следующее:

1. Наиболее повреждающий режим для растворов БСА — это медленное замораживание со скоростью 1 °С/мин до точки окончания кристаллизации и последующее охлаждение со средней скоростью  $70 \div 80$  °С/мин до температуры жидкого азота, в результате которого наблюдается образование необратимых агрегатов молекул БСА, сопровождающееся разрыхлением молекул.

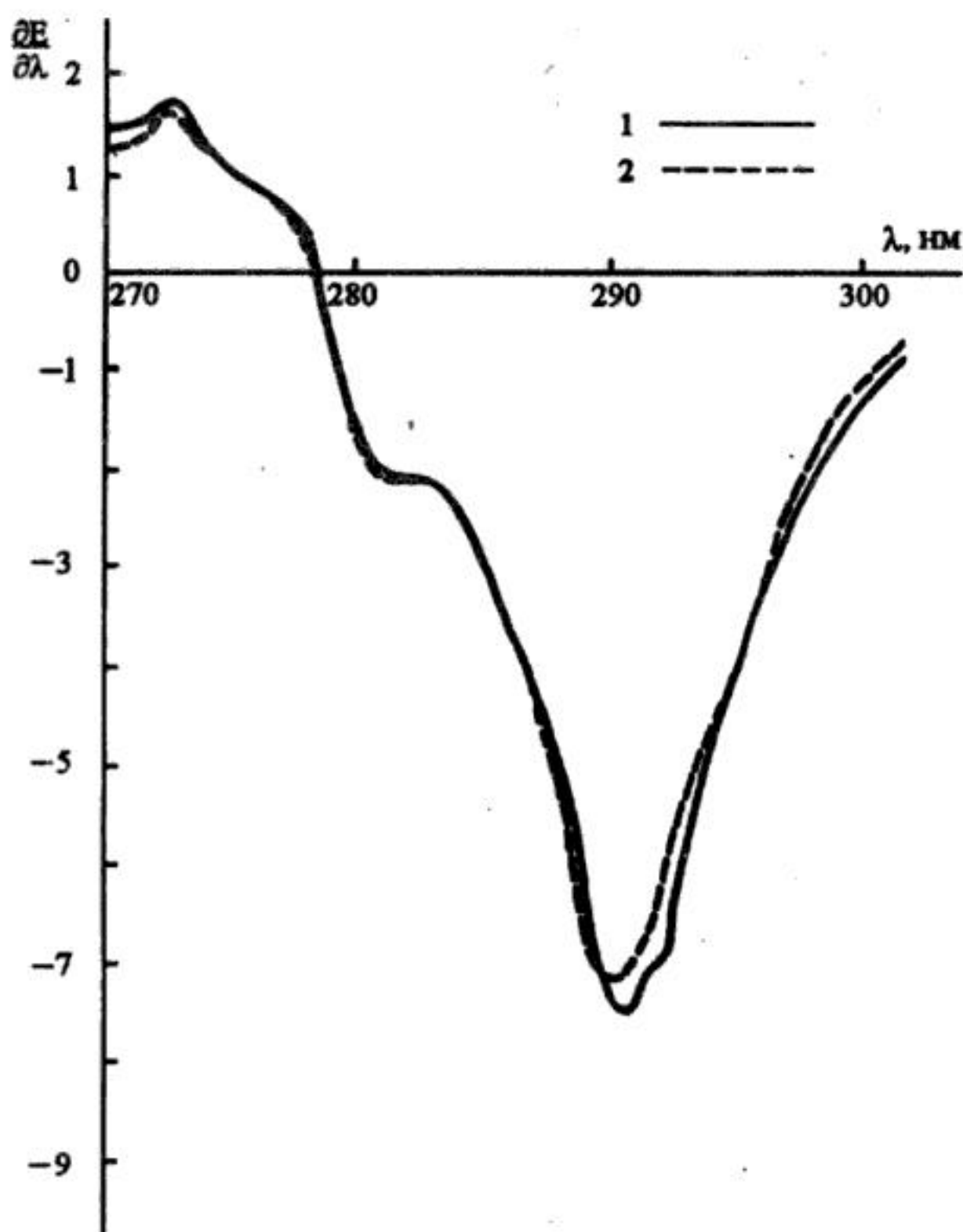


Рис. 4 Первая производная спектра поглощения растворов БСА: 1 – БСА в 20% ПЭГ-600; 2 – БСА в 20% ПЭГ-600 после замораживания – отогрева (режим 4)

2. 20% ПЭГ-600 практически полностью предотвращает необратимую агрегацию и конформационные изменения, вызываемые замораживанием.

3. 40% ПЭГ-600 менее эффективен по сравнению с 20% ПЭГ-600.

Повреждающее действие медленного замораживания до точки окончания кристаллизации с последующим быстрым охлаждением по всей вероятности обусловлено длительным действием гиперконцентрации солей до точки эвтектики и эффектом дегидратации макромолекул при дальнейшем быстром охлаждении [5]. Для проверки этого предположения были сняты спектры поглощения БСА в 2,5 и 5,0 М NaCl при комнатной температуре. Первые производные спектров обнаруживают небольшой коротковолновый сдвиг и увеличение светорассеяния. Однако после гельфильтрации не были обнаружены необратимые агрегаты. Следовательно, повреждающее действие замораживания заключается не только во влиянии гиперконцентрации солей, образующихся при замерзании воды. Низкие температуры сами делают вклад в изменение структуры БСА, который по всей вероятности, может быть обусловлен ослаблением гидрофобных взаимодействий [7].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко А.П., Сандровский А.К., Коробков М.Е. Производная спектрофотометрия ароматических аминокислот и белков // Молекулярная биология. – 1978. – Вып. 20. – С. 3–12.
2. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
3. Троцкий Г.В., Матвеева М.Г., Тэтин С.Ю. и др. Эффект, оказываемый пертурбантом (этиленгликолем, глицерином, сахарозой) на конформации иммуноглобулинов // IV Всесоюз. конф. по спектроскопии биополимеров. (Харьков, 8–10 сент. 1981 г.): Тез. докл. – Харьков. – 1981. – С. 176–178.
4. Рольбин Ю.А., Свергун Д.И., Щедрин Б.М. О сглаживании экспериментальных кривых малоуглового рассеяния // Кристаллография. – 1980, – 25, N 2. – С. 231 – 239.

5. *Darbishire B.* The influence of dehydration of catalase stability: A comparison with freezing effects // *Cryobiology* – 1974. – 10, N 2. P. 148–151.
6. *Goodin R., Levitt Y.* The cryoaggregation of bovine serum albumin // *Cryobiology*. – 1970. – 6, N 4. – P. 333–338.
7. *Kauzmann W.* Some factors in the interpretation of protein denaturation // *Adv. Protein Chem.* – 1979. – 14. – P. 1–63.
8. *Pickart Z., Theler M.* Alteration in biological properties of human serum albumin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1977. – 74, N 3. – P. 961–968.

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

Поступила 07.12.90

**Б.М.ЛЕОНОВ**

# **ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ І ПОЛІЕТИЛЕНГЛИКОЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ 600 НА СТРУКТУРУ БИЧАЧОГО СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ**

**Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків**

Методами УФ-спектрофотометрії і гел'фільтрації досліджено вплив різних режимів заморожування на структуру БСА у водяних розчинах. Найбільш пошкоджуючим режимом є повільне заморожування до точки закінчення кристалізації розчину з наступним швидким охолодженням до температури рідкого азоту, що пов'язане з тривалою дією гіперконцентрацій солей і дегідратацією макромолекули. Відмічено розпушування молекул БСА після заморожування-відігріву в буферних розчинах і утворення необоротних агрегатів. 20% концентрація ПЕГ-600 запобігає як агрегацію, так і розпушування молекул БСА.

**B.N.LEONOV**

# **THE EFFECT OF FREEZING AND POLYETHYLENE GLYCOL OF MOLECULAR WEIGHT 600 ON THE STRUCTURE OF BOVINE SERUM ALBUMIN**

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

The effect of freezing regimes on the structure of aqueous solutions of bovine serum albumin (BSA) was studied by the methods of UV-spectrophotometry and gel filtration. Slow freezing to the completed crystallization point with subsequent rapid cooling to liquid nitrogen temperature appeared to be the most detrimental regime, that may be associated with the prolonged effect of increased salt concentrations and dehydration of the macromolecule. Loosening of BSA molecules and the formation of irreversible aggregates are noted after freeze-thawing in buffer solutions. The 20% concentration of PEG-600 prevents both the aggregation and loosening of BSA molecules.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 615.361.36.014.41

Л.П.Кравченко, А.Н.Андриенко

### УСЛОВИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ 4°C

Изолированные клетки печени способны длительно переживать условия гипотермии в сахарозной среде без оксигенации. В течение двух суток сохраняются жизнеспособность и метаболический статус клеток. В последующие сроки хранения начинается плавное нарастание степени прокрашиваемости клеток трипановым синим и снижение их биохимических показателей. Присутствие гепатопротектора растительного происхождения – силибора (1 мг/мл) в среде хранения гепатоцитов позволяет сохранить их без значительного изменения жизнеспособности и метаболизма.

Изолированные гепатоциты по-прежнему остаются простой и в то же время сложной системой для исследований в области криобиологии. Однако широкое использование изолированных гепатоцитов ограничено отсутствием достаточного запаса клеток, по качеству удовлетворяющего требованиям экспериментаторов. Одним из способов создания определенных запасов изолированных клеток печени может быть хранение их при низких положительных температурах. Целью настоящей работы явилось изучение биохимической сохранности клеток печени крысы при длительном гипотермическом хранении. Объектом исследования служили изолированные гепатоциты, выделенные из печени крыс по разработанному нами методу.

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200–300 г. После выделения гепатоциты суспендировали в различных средах (объем 5 мл). Концентрация клеток была в среднем 3–5 млн. в мл. Клетки анализировались после 24-, 48-, 72-, 96-, 120- и 144-часового хранения в холодильнике при 4°C. Активность лактатдегидрогеназы, 5-нуклеотида, кислой фосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы определяли в суспензии клеток спектрофотометрически [1, 5, 6, 9]. Содержание глюкозы в клетках определяли ферментативным методом [3], образование малонового диальдегида (МДА) было определено по методу Энстера [7].

Мы использовали модификацию неферментативного метода выделения изолированных гепатоцитов, описанного ранее, который предусматривал перфузию печени раствором Локка, содержащим 2 мМ ЭДТА [4]. Мы заменили солевой раствор изотоническим раствором сахарозы и увеличили концентрацию ЭДТА до 4 мМ, что было эффективным для получения значительно большего количества жизнеспособных клеток печени.

Анализ данных, представленных в табл. 1, свидетельствует о том, что модификация неферментативного метода выделения гепатоцитов из печени крыс позволяет получить клетки, которые по состоянию плазматической мембраны, степени выхода ЛДГ, содержанию адениннуклеотидов, степени исключения красителя сравнимы с данными, полученными при использовании коллагеназы [10]. Полученные клетки хорошо переносят нормотермическую инкубацию, причем способны восстанавливать уровень адениннуклеотидов, необходимый для жизнеобеспечения клеток.

## Метаболические показатели изолированных гепатоцитов

| Показатель                                                         | Свежевыделенные клетки | После 2 ч инкубации при 37 °С в среде 199 |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| Исключение трипанового синего, %                                   | 91±2                   | 93±2                                      |
| Внеклеточная активность ЛДГ, %                                     | 15±2                   | 10±3                                      |
| Скорость эндогенного дыхания, нмоль O <sub>2</sub> /мин·млн клеток | 17±0.2                 | 17±0.3                                    |
| Содержание АТФ, нмоль/млн клеток                                   | 18.9±3.7               | 4.4±4.9<br><i>p</i> < 0.01                |
| Содержание АДФ, нмоль/млн клеток                                   | 8.3±2.0                | 10.2±2.6                                  |
| АТФ/АДФ                                                            | 2.3±0.2                | 4.3±0.3<br><i>p</i> < 0.01                |

Примечание. Значение *p* дано в сравнении со свежевыделенными клетками.

Клетки способны переносить гипотермию при 4°С, однако длительность хранения гепатоцитов зависит от качественного состава среды. Исследовалась эффективность нескольких типов сред для хранения гепатоцитов при 4°С: натрий-содержащие среды – раствор Кребса-Рингера, среда 199; калий-содержащие среды – раствор Коллинза (115 мМ К<sup>+</sup>) и среда, содержащая 145 мМ К<sup>+</sup>; сахарозосодержащие среды – изотонический раствор сахарозы и среда, содержащая 0,125 М сахарозы и 0,075 М хлористого натрия. В данной серии опытов основным критерием оценки сохранности гепатоцитов было определение жизнеспособности по степени исключения трипанового синего. В наших экспериментах жизнеспособными считались клетки, полностью исключающие трипановый синий после инкубации их в течение 5 мин при комнатной температуре (рис. 1).

Было установлено, что натрий- и калий-содержащие растворы не эффективны для длительного хранения гепатоцитов при 4°С. Среда, содержащая сахарозу, были более благоприятными для хранения клеток печени в этих условиях. Наиболее эффективной средой из двух используемых оказалась среда, содержащая 0,25 М сахарозы. Различия выявлялись через 2 сут хранения и резко нарастали на 3-и и 4-е сут хранения. К концу 4-х сут хранения в среде, содержащей 0,125 М сахарозы и 0,075 М хлористого натрия, клетки теряли жизнеспособность, в то время как хранение клеток в изотонической сахарозной среде позволило сохранить жизнеспособность гепатоцитов до 50%.

Анализ качества клеток, переживших гипотермическое хранение в течение 3-х сут, также оценивался при помощи нормотермической инкубации. В этом случае, жизнеспособные клетки отделяли из общей суспензии гепатоцитов путем центрифугирования (2 мин, 1000 об/мин), переводили в питательную среду 199 и инкубировали в течение 1 ч при 37°С при перемешивании. Данные табл. 2 показывают, что клетки, исключающие трипановый синий, характеризуются достаточно высокими показателями, однако они несколько ниже в сравнении с данными, полученными при нормотермии свежевыделен-

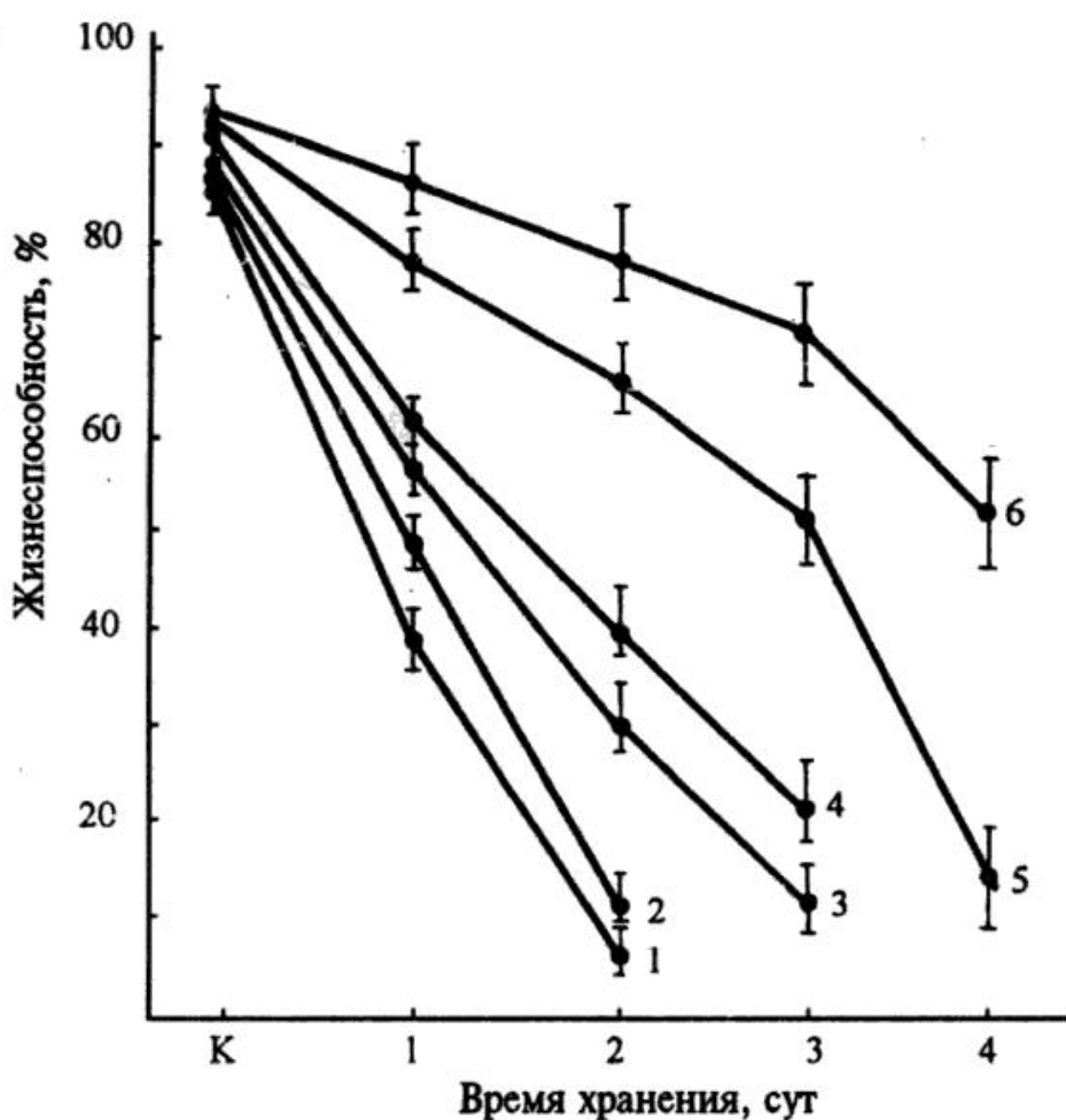


Рис. 1. Жизнеспособность изолированных гепатоцитов после гипотермического хранения в средах различного состава: 1 – раствор Коллинза; 2 – калийсодержащий раствор (145мМК+); 3 – раствор Кребса-Рингера; 4 – среда 199; 5 – 0,125М сахароза + 0,075М хлористого натрия + 1% БСА; 6 – 0,25М сахароза + 1% БСА

Т а б л и ц а 2

Метаболические показатели изолированных гепатоцитов, хранившихся в течение 3 сут при 4 °С, до и после нормотермической инкубации

| Показатель                                                           | После гипотермического хранения в течение 3 сут | После инкубации при 37 °С в течение 60 мин |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Исключение трипанового синего, %                                     | 89±3                                            | 90±4                                       |
| Скорость эндогенного дыхания, нмоль O <sub>2</sub> /мин · млн клеток | 12.2±2.8                                        | 15.5±3.5                                   |
| Содержание АТФ, нмоль/млн клеток                                     | 16±3                                            | 33±3<br><i>p</i> < 0.01                    |
| Активность ЛДГ, мкг/мин · млн клеток                                 | 4.3±0.4                                         | 4.9±0.5                                    |
| Активность кислой фосфатазы, мкг/мин · млн клеток                    | 1.8±0.3                                         | 1.7±0.7                                    |
| Активность 5-нуклеотидазы, мкг/мин · млн клеток                      | 4.3±0.6                                         | 4.9±0.4                                    |
| Активность глюкозо-6-фосфатазы, мкг/мин · млн клеток                 | 1.5±0.2                                         | 1.5±0.3                                    |

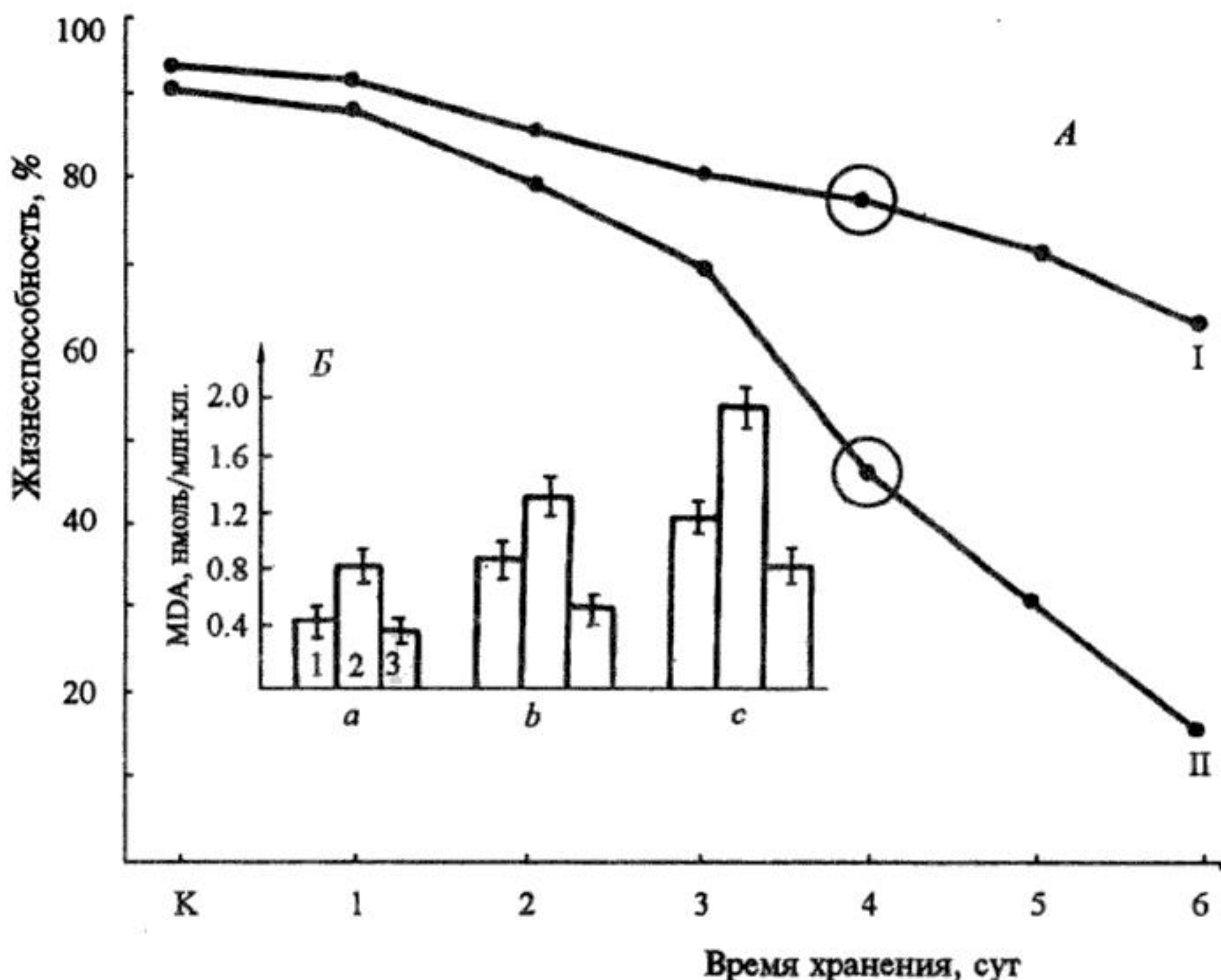


Рис. 2. Влияние силибора на жизнеспособность (А) и МДА образование (Б) после гипотермического хранения изолированных гепатоцитов: 1 – свежесделанные клетки; 2 – через 4 дня хранения при 4°C; 3 – через 4 дня хранения при 4°C с силибором; а – спонтанное ПОЛ; б – аскорбат-иницирование ПОЛ; с – НАДФ-инициированное ПОЛ; I – хранение клеток печени в 0,25 М сахарозе + 1% БСА + силибор; II – хранение клеток печени в 0,25 М сахарозе 1% БСА

ных клеток. Нормотермическая инкубация хранившихся в течение 3-х сут клеток не выявила каких-либо изменений их метаболического состояния: сохраняется уровень жизнеспособности, эндогенное дыхание, уровень активности маркерных ферментов. Отмечается нарастание уровня АТФ, что указывает на сохранность митохондриальной системы.

Итак, среда, содержащая изотоническую сахарозу, сбалансированную по основным солевым компонентам + 1% БСА, является эффективной для длительного сохранения изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии. Необходимо отметить, что в течение 2 сут в этой среде клетки печени сохраняются практически без особых изменений. После 2 сут хранения клеток начинается плавное нарастание повреждения клеток до полной гибели на 6-е сут хранения (рис. 2, А).

Знание механизмов повреждения клеток при хранении в условиях гипотермии позволяет применять средства для предотвращения их развития. Учитывая, что одной из причин повреждения клеток при их хранении в гипотермических условиях является развитие процессов перекисного окисления липидов [2], представляло интерес исследовать действие известного лекарственного препарата (силибора), который обладает гепатопротекторными свойствами. Добавление в среду хранения гепатоцитов силибора (1 мг/мл)

Т а б л и ц а 3

Метаболические показатели изолированных гепатоцитов, хранившихся 4 сут с антиоксидантом, до и после изотермической инкубации

| Показатель                         | После гипотермического хранения до инкубации | После инкубации при 37 °С в течение 30 мин |
|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Исключение трипанового синего, %   | 92±2                                         | 90±3                                       |
| Содержание АТФ, нмоль/млн клеток   | 12±2                                         | 21±2<br>$p < 0.01$                         |
| Содержание глюкозы, мкг/млн клеток | 0.11±0.01                                    | 0.18±0.01<br>$p < 0.01$                    |
| Содержание МДА, нмоль/млн клеток   | 0.387±0.023                                  | 0.327±0.03                                 |

способствовало сохранению значительного процента жизнеспособных клеток на этапе 4-суточного хранения, причем добавление гепатопротектора в среду хранения клеток способствует значительному снижению спонтанного, аскорбат- и НАДФ-Н-индуцированного перекисного окисления липидов (рис.2, Б). Метаболические характеристики изолированных гепатоцитов, которые хранились в условиях гипотермии в среде, содержащей силибор, также сохранены на хорошем уровне (табл. 3). Более того, отмечена способность и этих клеток генерировать АТФ в питательной среде при нормотермической инкубации.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Изолированные гепатоциты способны длительно сохранять свои метаболические характеристики в среде, содержащей непроникающие компоненты (сахароза, альбумин), при гипотермическом хранении.

2. Применение препарата антиоксидантного типа, каковым является силибор, способствует значительному подавлению процессов ПОЛ в гепатоцитах при длительном хранении в условиях гипотермии. Тот факт, что введение в среду хранения гепатоцитов силибора способствует снижению не только спонтанных процессов ПОЛ, но и индуцированных, свидетельствует об истощении противоокислительной системы клетки за счет природных антиоксидантов.

3. Переживание клетками печени нормотермической инкубации свидетельствует о благополучном состоянии функции митохондрий как на этапе выделения, так и после гипотермического хранения.

Данные экспериментов показывают, что оптимально подобранные условия для длительного хранения гепатоцитов при 4°С способствуют сохранению большого количества клеток с нормальным метаболизмом. Продуцирование АТФ, глюкозы, сохранение содержания МДА после нормотермии длительно хранившихся клеток – подтверждение этому.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. – М.: Медицина, 1969. – 179 с.
2. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // Патологическая и экспериментальная терапия. – 1989. – N 4. – С. 7–19.
3. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Медицина, 1971. – С. 249–250.

4. Кравченко Л.П., Андриенко А.Н., Петренко А.Ю., Сукач А.Н. Неферментативный метод получения изолированных гепатоцитов: оценка их морфофункциональной активности // Укр. биохим. журн. – 1989. – 61, N4. – С.112–116.
5. Beutler E. Red cell metabolism // A Manual of Biochemical Methods. – N.Y. – 1975. – 160 pp.
6. Bodansky Y.O. Acid phosphatase // Adv. Clin. Chem. – 1975. – 15. – P. 43–147.
7. Enster L. Nordenbrand K. Methods in Enzymology. – N.Y. – 1967. – 10. – P. 575–587.
8. Farrel R., Lund P. Biosynthetic capacity of hepatocytes after storage at 4°C // Bioscience Reports. – 1987. – 3, N 6 – P. 539–543.
9. Letko L. Donlon M., Marinetti G. V., Hare G.D. A rapid method for the isolation of rat liver plasma membranes using aqueous two-phase polymer system // Biochem. et. biophys. acta. – 1973. – 11, N 2. – P. 173–179.
10. Seglen P.P. Preparation of isolated rat liver cells // Methods in Cell Biology. – 1976. – 13. – P. 29–83.

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

Поступила 24.02.92

Л.П.КРАВЧЕНКО, А.Н.АНДРІЄНКО

## УМОВИ ТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ІЗОЛЮВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ПРИ 4°C

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків

Ізольовані клітини печінки здатні довгий час виживати в умовах гіпотермії в цукрозному середовищі без оксигенації. Протягом двох діб зберігається життєздатність і метаболічний статус клітин. У наступні строки зберігання розпочинається повільне наростання здатності клітин офарбовуватися трипановим синім і зниження їх біохімічних показників. Присутність гепатопротектора рослинного походження – силібора (1 мг/мл) в середовищі зберігання гепатоцитів дозволяє зберегти їх без значних змін життєздатності і метаболізму.

L.P.KRAVCHENKO, A.N.ANDRIYENKO

## CONDITIONS FOR LONG-TERM STORAGE OF ISOLATED HEPATOCYTES AT 4 °C

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

Isolated hepatocytes are capable of surviving conditions of hypothermia in a sucrose medium without oxygenation. The viability and metabolic state of cells are maintained for 2 days. A progressive increase in staining of the cells with trypane blue and a decrease in biochemical parameters are observed in longer storage periods. The presence of cryoprotectant of plant origin such as silibor (1 mg/ml) in the preservation medium allowed to preserve hepatocytes with negligible changes in viability and metabolism.

УДК 615.361.018.46.014.41

Ма Ен-пу, Лю Ан, Вей Хан-донг, Ву Чу-це, Конг Фан-хуа, Джин Ли

## ИССЛЕДОВАНИЕ HLA-ТИПИРОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ И СОЗДАНИЕ БАНКА СТВОЛОВЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

При HLA-типировании клеток тканей 4–5-месячного эмбриона с помощью микролимфоцитотоксического теста установлено, что для получения удовлетворительных результатов следует продлить время реакции антисыворотки, комплемента и лимфоцитов, а также повысить температуру. Лучшие результаты при HLA-типировании клеток были получены на лимфоцитах эмбриональной селезенки, по сравнению с кровью из пуповины и тимусом. С учетом полученных данных было проведено HLA-типирование клеток 45 образцов эмбриональной печени и создан банк стволовых гемопоэтических клеток, консервированных в жидком азоте.

Гемопоэтические клетки эмбриональной печени более или менее широко используются в лечении лейкемии, апластической анемии и других заболеваний, однако практически нет постоянного запаса для их пересадки реципиенту. Пруммер и др. получили удовлетворительные результаты в эксперименте по трансплантации гемопоэтических клеток печени у родственных собак (с

менее выраженной иммунологической реакцией отторжения) [1]. Основным фактором, влияющим на результаты трансплантации, могут быть различия по антигенам гистосовместимости, поэтому отбор больных с одинаковым или близким HLA-типом для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток печени заслуживает серьезного внимания. В связи с этим в нашей лаборатории проведено исследование с использованием метода HLA-типирования эмбриональных клеток. В клинике подходящий донор может быть подобран только после исследования многих образцов эмбриональной печени с довольно различными HLA-антигенами. Больному для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток необходимо несколько эмбриональных органов. Следовательно, для создания банка гемопоэтических клеток печени большое значение имеет изучение особенностей их трансплантации.

В экспериментах использовали микродиспергатор и набор для микротестирования; стандартные антисыворотки и комплемент кролика, предоставленные Отделом иммунологии Тай-Пинг Роад госпиталя; контрольные сыворотки: в качестве положительного контроля – кроличью антисыворотку против лимфоцитов человека, в качестве отрицательного контроля – инактивированную пулированную нормальную сыворотку человека групп А и В; 4–5-месячные эмбрионы, полученные при искусственных родах.

Исследование проводили с помощью стандартного метода определения комплемент-зависимой цитотоксичности лимфоцитов.

Лимфоциты тимуса, селезенки и крови пуповины выделяли с помощью металлической сетки из 200 ячеек. Суспензии изолированных клеток тимуса, селезенки и пуповинной крови центрифугировали в градиенте плотности раствора.

Количество мертвых клеток в процентах подсчитывали под инвертированным микроскопом. Полученные данные разделили на 5 групп по количеству мертвых клеток в соответствии с результатами микролимфоцитотоксического теста: 1–15% – группа 1; 16–25% – группа 2; 26–50% – группа 4; 51–75% – группа 6; 76–100% – группа 8. Группы 1 и 2 – отрицательная реакция; группа 4 – сомнительная или слабо положительная реакция; группы 6 и 8 – положительная реакция.

*Приготовление и консервирование эмбриональных стволовых гемопоэтических клеток печени.*

Эмбрионы половины срока беременности, полученные при искусственных родах, доставлялись из больницы; забор печени осуществляли в стерильных условиях и готовили суспензию изолированных клеток. Концентрацию клеток доводили до  $2 \cdot 10^5$ /мл путем добавления соответствующего количества питательного раствора RPMI 1640 и 10% ДМСО, после чего образцы помещали в контейнер для консервирования.

Т а б л и ц а 1

Результаты HLA-типирования лимфоцитов пуповинной крови, тимуса и селезенки

| №   | Пуповинная кровь   | Тимус              | Селезенка          |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|
| 005 | A11 B35 B40        | A11 B35 B40        | A11 B35 B40        |
| 006 | A3 A9 B15 B40      | A3 A9 B15 B40      | A3 A9 B15 B40      |
| 007 | A2 A11             | A2 A11             | A2 A11             |
| 008 | A9 A11 B51 B40 CW2 | A9 A11 B51 B40 CW2 | A9 A11 B51 B40 CW2 |
| 009 | A10 B5 B8 CW1 CW3  | A10 B5 B8 CW1 CW3  | A10 B5 B8 CW1 CW3  |

**Т а б л и ц а 2**  
Ложноположительные антигены при HLA-типировании лимфоцитов из пуповинной крови, тимуса и селезенки

| №          | Пуповинная кровь | Тимус                | Селезенка |
|------------|------------------|----------------------|-----------|
| 005        |                  | A30/31               |           |
|            | B5               | B12. B15             |           |
| 006        | A2               | A2                   |           |
|            |                  | B8. B13.<br>B14. B17 |           |
| 007        |                  | A10                  | A3        |
|            |                  | B5. B22              |           |
| 008        |                  | A1. A10. A9          |           |
|            | B13              | B8. B13. B17         | B8. B17   |
|            | CW1              |                      |           |
| 009        | A3               | A1. A11              |           |
|            | B12              | B12. B15.<br>B17     | B15       |
|            |                  | CW5                  |           |
| Частота, % | 19               | 70                   | 12        |

Криоконсервирование осуществляли путем снижения температуры в определенном порядке с использованием замораживающего устройства с программируемой компьютером скоростью охлаждения: от комнатной температуры до 0 °C; от 0 до -25 °C со скоростью 2 °C/мин; от -25 до -45 °C со скоростью 15-20 °C/мин; от -45 до -70 °C со скоростью 20 °C/мин; от -70 до -80 °C со скоростью 5 °C/мин. При 0, -70, -45 и -80 °C делали десятиминутные остановки. Контейнер с клетками быстро перенесли из -80 °C в жидкий азот (-196 °C) и хранили при этой температуре.

*Результаты экспериментов.*

Обнаружено, что HLA-тип эмбриона невозможно установить с помощью рутинного микролимфоцитотоксического метода, используемого для HLA-типирования клеток взрослых людей в Национальном институте здоровья. Количество мертвых клеток при микроскопическом исследовании составляло примерно 25%, хотя некоторые данные трактовались как сомнительные.

После изменения условий реакции антисыворотки, комплемента и лимфоцитов были получены удовлетворительные результаты HLA-типирования. Эти условия включали следующие этапы: повышение температуры реакции антисыворотки и лимфоцитов от комнатной до 37 °C и удлинение времени реакции от 30 до 45 мин; удлинение времени реакции после добавления комплемента от 60 до 90 мин;

Результаты HLA-типирования лимфоцитов пуповинной крови, тимуса и селезенки (табл. 1) оказались идентичными, то есть эти клетки можно было использовать для HLA-типирования эмбриона. Реакции стандартных антисывороток с лимфоцитами из разных источников не были идентичными. При HLA-типировании лимфоцитов пяти эмбрионов было обнаружено 6 ложноположительных антигенов лимфоцитов пуповинной крови, 23 – тимуса и 4 – селезенки. Это составляет соответственно 19, 70 и 12% от общего числа антигенов (табл. 2). Трудности возникали при оценке результатов HLA-типирования. Самый высокий уровень ложноположительных антигенов обнаружен при HLA-типировании лимфоцитов тимуса и лимфоцитов пуповинной крови, а самый низкий – лимфоцитов селезенки, при этом точно определялся HLA-тип эмбриона.

Т а б л и ц а 3

Результаты типирования эмбриональных антигенов HLA-A и В локусов

| №   | Пол | HLA-A |     | HLA-B |     | №   | Пол | HLA-A |     | HLA-B |     |
|-----|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|-------|-----|-------|-----|
| 002 | М   | A2    | A31 | B15   | B13 | 026 | М   | A2    |     | B12   |     |
| 003 | М   | A2    | A9  | B8    | B27 | 033 | М   | A2    | A9  | B17   | B27 |
| 004 | М   | A2    | A10 | B27   | B40 | 034 | М   | A3    |     |       |     |
| 005 | М   | A11   |     | B35   | B40 | 035 | М   | A3    | A9  | B16   |     |
| 006 | Ж   | A3    | A9  | B15   | B40 | 036 | М   | A3    | A11 | B16   |     |
| 007 | М   | A2    | A11 |       |     | 037 | Ж   | A1    | A3  | B-5   | B17 |
| 008 | М   | A9    | A11 | B51   | B40 | 038 | Ж   | A2    | A3  | B27   |     |
| 009 | Ж   | A10   |     | B5    | B8  | 039 | Ж   | A9    | A11 | B17   | B27 |
| 010 | Ж   | A2    |     | B13   | B17 | 040 | Ж   | A3    | A11 | B17   | B22 |
| 011 | М   | A9    | A11 | B8    | B12 | 041 | М   | A2    |     |       |     |
| 013 | Ж   | A1    | A9  | B8    |     | 042 | М   | A2    | A3  | B15   | B35 |
| 014 | М   | A31   |     | B5    | B15 | 043 | М   | A9    |     | B17   | B35 |
| 015 | М   | A2    | A9  | B12   | B16 | 044 | Ж   | A11   |     | B7    | B13 |
| 017 | М   | A2    | A9  | B15   |     | 045 | М   | A2    | A31 | B12   | B13 |
| 018 | М   | A1    | A2  | B12   | B5  | 046 | Ж   | A9    | A31 | B13   | B40 |
| 019 | М   | A1    | A11 | B12   | B35 | 047 | Ж   | A2    |     | B13   | B35 |
| 020 | Ж   | A9    |     | B8    |     | 048 | Ж   | A2    | A3  |       |     |
| 021 | М   | A10   | A11 | B14   | B27 | 050 | М   | A2    | A9  | B8    | B15 |
| 022 | М   | A2    |     | B5    |     | 051 | Ж   | A9    | A11 | B13   | B40 |
| 023 | Ж   | A3    | A11 | B35   | B40 | 053 | Ж   | A2    | A9  | B40   |     |
| 024 | М   | A1    |     | B13B5 |     | 054 | М   | A2    |     | B13   | B35 |
| 025 | М   | A9    | A10 | B35   |     | 055 | М   | A2    | A9  | B13   | B5  |
|     |     |       |     |       |     | 056 |     | A3    | A9  |       |     |

В нашей лаборатории проведено HLA-типирование 45 эмбрионов (в регионе Пекина), полученных при искусственных родах в середине срока беременности. Результаты типирования HLA A- и В-локусов представлены в табл. 3. Самая высокая вероятность определяется для HLA-A2, A9 и B13, частота их антигенов составляет соответственно 0.4667, 0.4222 и 0.2444. С целью создания банка стволовых клеток HLA-типированные эмбриональные гемопоэтические стволовые клетки хранили в жидком азоте. Проведены сравнительные исследования имеющихся типов HLA клеток в банке и клеток людей, не подо-

Т а б л и ц а 4

Специфичность и частота эмбриональных HLA-A, и -B антигенов

| №  | Специфичность | Всего эмбрионов | Число положительных | Частота |
|----|---------------|-----------------|---------------------|---------|
| 1  | A1            | 45              | 5                   | 0.1111  |
| 2  | A2            | 45              | 21                  | 0.4667  |
| 3  | A3            | 45              | 11                  | 0.2444  |
| 4  | A9            | 45              | 19                  | 0.4222  |
| 5  | A10           | 45              | 4                   | 0.0889  |
| 6  | A11           | 45              | 12                  | 0.2667  |
| 7  | A31           | 45              | 5                   | 0.1111  |
| 8  | B5            | 45              | 7                   | 0.1556  |
| 9  | B7            | 45              | 1                   | 0.0222  |
| 10 | B8            | 45              | 6                   | 0.1333  |
| 11 | B12           | 45              | 6                   | 0.1333  |
| 12 | B13           | 45              | 11                  | 0.2444  |
| 13 | B14           | 45              | 1                   | 0.0222  |
| 14 | B15           | 45              | 6                   | 0.1333  |
| 15 | B16           | 45              | 1                   | 0.0222  |
| 16 | B17           | 45              | 6                   | 0.1333  |
| 17 | B22           | 45              | 1                   | 0.0222  |
| 18 | B27           | 45              | 5                   | 0.1111  |
| 19 | B35           | 45              | 8                   | 0.1778  |
| 20 | B40           | 45              | 8                   | 0.1778  |
| 21 | B51           | 45              | 1                   | 0.0222  |

бранных по антигенам групп крови. HLA-тип каждого эмбриона, имеющегося в банке клеток, сравнивали с типом эмбриональной печени. Результаты в первом приближении свидетельствуют о том, что для конкретного пациента из банка клеток могут быть подобраны 15 образцов фетальной печени только с одним идентичным антигеном, 40 из 45 больных могут получить 2,8 эмбриональных органа с двумя идентичными антигенами, 14 из 45 больных могут получить 2 эмбриональные печени с тремя идентичными антигенами.

В 1956 г. Горер впервые использовал тест на комплемент-зависимую цитотоксичность лимфоцитов при исследовании гомологичного антигена мыши. В 1964 г. Тераки с соавт. [2] использовали этот метод для серологической

микроколичественной оценки HLA-антигенов. Модифицированный метод получил широкое распространение как универсальный стандартный метод HLA-типирования. Следует отметить два важных фактора, влияющих на результаты цитотоксического теста: время взаимодействия лимфоцитов с антисыворотками и комплементом и температура реакции. В литературе сообщаются следующие показатели: время реакции – от 0,5 до 1,2 или 4 ч, температура реакции – от комнатной до 37 °С. Лимфоциты взаимодействовали с антисывороткой при комнатной температуре в течение 30 мин и дополнительно 60 мин с комплементом. На практике наиболее подходящей температурой инкубации лимфоцитов и антисыворотки оказалась 37 °С с соответствующим увеличением времени реакции [2].

В проведенных экспериментах по HLA-типированию эмбриональных тканей удовлетворительные результаты были получены только после модификации условий реакции клеток и сыворотки, а большинство ложноположительных антигенов обнаружено при типировании лимфоцитов тимуса. Это связано с незрелостью эмбриона и низким уровнем поверхностного антигена клетки. Предыдущие исследования показали, что эмбриональные тимус и селезенка содержат HLA-A-, B- и C-антигены, однако поверхностные антигены клетки образуются в разные периоды времени. Поверхностные антигены клеток селезенки начинают формироваться на 15-й неделе беременности, а тимуса – на 18-й неделе. Отмечается не только задержка образования антигена тимоцитов, но и вероятность естественной гибели тимоцитов. Чувствительность тимоцитов к комплементу отрицательно коррелирует со сроком беременности. Следовательно, тимоциты на ранних стадиях беременности погибают быстрее в присутствии комплемента. С другой стороны, спленоциты обладают хорошей жизнеспособностью и реактивностью [3].

Наиболее подходящим источником лимфоцитов для эмбрионального HLA-типирования оказалась селезенка с наименьшей вероятностью присутствия ложноположительных антигенов и лучшей доступностью по сравнению с пуповинной кровью и тимусом. Таким образом, в Китае впервые получены результаты HLA-типирования эмбрионов, полученных при искусственных родах в середине срока беременности. Кс.Ву с соавт. провели HLA-типирование эмбриона по антигенам крови сердца [4, 5], однако они не упоминали о какой-либо модификации условий реакции клеток и сыворотки и о частоте присутствия ложноположительного антигена. Это может быть обусловлено тем, что они использовали 8-месячные эмбрионы либо новорожденных младенцев, так что условия отличались от тех, в которых исследовали 4–5-месячные эмбрионы. В наших экспериментах обнаружено 7 антигенов HLA-A локуса и 14 антигенов HLA-B локуса у 45 эмбрионов. При этом частота присутствия 3 антигенов была около 0,2444, что согласуется с результатами исследования распределения HLA у лиц национальности хан в северном Китае [6].

Т а б л и ц а 5  
Количество образцов печени в банке, подобранных по HLA-A и -B антигенам

|                                            | Количество идентичных антигенов |       |       |
|--------------------------------------------|---------------------------------|-------|-------|
|                                            | Один                            | Два   | Три   |
| Уровень*                                   | 45/45                           | 40/45 | 14/45 |
| Количество образцов эмбриональной печени** | 8.8                             | 2.83  | 2     |
|                                            | (2–21)                          | (2–7) | (2)   |

\*Уровень идентичных антигенов фетальной печени в банке. \*\*Среднее число образцов эмбриональной печени, подобранных по одному, двум и трем совместимым антигенам.

Поскольку антигены лейкоцитов человека полиморфны и частота некоторых HLA антигенов может быть значительно выше у людей определенной национальности или региона, в нашем банке хранятся 10 эмбриональных органов печени с 3 идентичными антигенами двух локусов HLA – А и В. Таким образом, созданы благоприятные условия для подбора больных с почти идентичным типом HLA. Метод определения HLA-типа эмбриона использован для создания банка эмбриональных HLA-типированных гемопоэтических клеток с целью их трансплантации больным в клинике. К настоящему времени насчитывается 45 HLA-типированных образцов эмбриональных гемопоэтических клеток печени, которые пронумерованы, зарегистрированы и хранятся в жидком азоте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Prummer, O.* The fetal liver as an alternative source of haemopoietic stem cells: the idea, experimental and clinical results // The Haemopoietic Stem Cell. Int. Conf. on the Occasion of the 60th Birthday of Fliedner, Schlob Reisenburg, September 28 – October, 1989.
2. *Terasaki, P.I., Domenico Bernoco, Min Sik Park, D.V.M. et al.* Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and antigens // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1978. – 69, N 1. – P. 103–120.
3. *Danilovs, J.A., Brown, J., Terasaki, P.I. et al.* HLA-A, -B, -C typing of human fetal cells // *Tissue Antigens.* – 1983. – 21, N 4. – P. 296–308.
4. *Wu, X.Y., Guo, J.Y.* Determination of HLA antigens of fetus // *Chinese J. Hematol.* – 1985. – 6, N 9. – P. 554–561.
5. *Zhou, M.S., Hu, K.Y., Lin, M.X., et al.* The screening of HLA antibodies by using umbilical cord blood lymphocytes // *Chinese J. of Organ Transplantation.* – 1983. – 4, N 3. – P. 98.
6. *Ye, G.Y., Kong, F.H., An, J.B., et al.* Investigation of HLA about 430 people of Han nation in northern area of China // *Chinese J. Haematol.* – 1988. – 9, N 7. – P. 420–421.

Институт радиационной медицины;  
Тай-Пинг Род госпиталь,  
Пекин, Китай

Поступила 17.08.92

МА ЕН-ПУ, ЛЮ-АН, ВЕЙ ХАН-ДОНГ, ВУ ЧУ-ЦЕ, КОНГ ФАН-ХУА, ДЖІН ЛІ  
ДОСЛІДЖЕННЯ HLA-ТИПУВАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ТКАНИН І  
СТВОРЕННЯ БАНКУ СТОВБУРОВИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН  
Інститут радіаційної медицини, Тай Пінг Род госпіталь, Пекін, Китай

При типуванні HLA клітин 4–5 місячного ембріона за допомогою теста на цитотоксичність встановлено, що для одержання достатніх результатів слід продовжити час реакції антисыворотки комплемента і лімфоцитів, а також підвищити температуру. Кращі результати при типуванні HLA клітин були одержані на лімфоцитах ембріональної селезінки, ніж на крові з пуповини і тимусу. З врахуванням одержаних даних було проведено типування HLA клітин 45 зразків ембріональної печінки і створено банк гемопоетичних клітин ембріональної печінки, консервованих у рідкому азоті.

MA EN-PU, LIU AN, WEI HAN-DONG AND WU CHU-TSE, KONG FAN-HUA, JIN LI  
STUDIES ON THE HLA-TYPING OF FETAL TISSUES  
AND THE ESTABLISHMENT OF A HEMOPOIETIC STEM CELL BANK  
Institute of Radiation Medicine;  
North Tai Ping Road Hospital, Beijing, China

On HLA-typing of fetal tissues of 45 months gestational age with the internationally commonly used NIH microlymphocyte cytotoxicity test, it was found the reaction time of antisera, complement and lymphocytes should be prolonged and the temperature increased to obtain a satisfactory result. It was proved by comparison that better HLA-typing results were obtained with lymphocytes of fetal spleen than with those of umbilical cord blood or thymus. On these basis HLA-typing of 45 cases of fetal liver was carried out and a hemopoietic stem cell bank of fetal liver preserved in liquid nitrogen was established.

## **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Разработан режим криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени с 0,7 моль/л ДМСО, обеспечивающий высокую морфологическую и функциональную полноценность клеток-предшественников гемопоэза, дана характеристика клеточного состава популяции до и после замораживания и на основании математического моделирования показаны особенности повреждения и защиты клеток в процессе замораживания-отогрева.

Изучение морфологии и особенностей пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток эмбриональной печени до и после криоконсервирования представляет большой интерес в связи с актуальностью проблемы трансплантации эмбриональной кроветворной ткани, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием донорского костного мозга.

Уникальность данного объекта заключается в том, что в популяции клеток-предшественников, выделенных из эмбриональной печени, содержатся стволовые клетки, коммитированные клетки всех ростков кроветворения, а также зрелые клетки, выполняющие специфические функции в организме эмбриона. Слабая иммунологическая реактивность и способность к пролиферации в организме взрослого реципиента обусловили широкое применение гемопоэтических клеток эмбриональной печени в клинической практике. В настоящее время в мире существует несколько клинических направлений по их использованию при лечении анемических состояний [7, 9], лейкозов [6, 10], врожденных и приобретенных иммунодефицитов [11, 13], при облучениях [5]. Однако внедрение в клиническую практику ограничено из-за отсутствия необходимого запаса биологически полноценного материала, полученного из эмбрионов различных сроков гестации.

В последние 7 лет экспериментальные исследования как у нас в стране, так и за рубежом направлены на разработку методов криоконсервирования клеток эмбриональной печени, для чего были предложены самые разнообразные криопротекторы (глицерин, ДМСО, ГЕМЖЕЛ и другие), которые в концентрациях 10–20% обеспечивали сохранность от 40 до 70% клеток при замораживании с медленной скоростью охлаждения [2, 3, 8]. Предлагаемые способы замораживания чаще всего теоретически не обоснованы и не учитывают современных представлений о механизмах повреждения клеток на отдельных этапах процесса. Нет сведений о влиянии криозащитных растворов, консервирующих сред, условий выделения и подготовки клеток к замораживанию, не учитывается биологическая неоднородность материала. Вместе с тем реакция клеток как многокомпонентной системы, отличается в каждом конкретном случае, что требует индивидуального подхода и накопления информации о характере процессов, происходящих при замораживании, их интенсивности и природе. Сложность решения данной задачи заключается в том, что на клетки воздействует одновременно комплекс факторов, результирующие которых не могут быть выявлены традиционными средствами и методами. В связи с этим особую важность приобретают подходы, позволяющие методом многофакторных экспериментов [1] достичь желаемого эффекта в расшифровке сложных и взаимосвязанных явлений.

Уровни варьирования факторов в эксперименте 2<sup>3</sup>

| Уровень               | Относительная величина | Абсолютные значения факторов |                |                |
|-----------------------|------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
|                       |                        | X <sub>1</sub>               | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> |
| Основной              | 0                      | 0.9                          | 3              | -20            |
| Верхний               | +                      | 1.4                          | 5              | -30            |
| Нижний                | -                      | 0.4                          | 1              | -10            |
| Интервал варьирования |                        | 0.5                          | 2              | 10             |

Примечание: X<sub>1</sub> – концентрация ДМСО, М; X<sub>2</sub> – скорость замораживания от комнатной температуры до температуры адаптации, °С/мин; X<sub>3</sub> – температура адаптации, °С; температура хранения – 196 °С.

При выборе плана проведения эксперимента по оптимизации программы замораживания клеток с ДМСО использовали полный факторный эксперимент 2<sup>3</sup> (табл. 1, 2) [2].

Число повторностей экспериментов было выбрано равным 3 (в двух вариантах: с отмыванием и без отмывания клеток от криопротектора). Из анализа уравнений регрессии для первого и второго вариантов установлено, что значение отклика (количество колоний и кластеров, выросших в агаровой культуре на 10<sup>5</sup> эксплантированных клеток (КОЕ-ГМ) в первой серии существенно вы-

Таблица 2

Моделирование процесса криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени с ДМСО

| N опыта | Значение фактора |                |                | Функция отклика (КОЕ-ГМ)               |                                        |
|---------|------------------|----------------|----------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|         | X <sub>1</sub>   | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Вариант I без отмывания криопротектора | Вариант II с отмыванием криопротектора |
| 1       | -                | -              | -              | 98.7                                   | 58.3                                   |
| 2       | +                | -              | -              | 46.0                                   | 65.0                                   |
| 3       | -                | +              | -              | 7.0                                    | 11.3                                   |
| 4       | +                | +              | -              | 89.0                                   | 46.0                                   |
| 5       | -                | -              | +              | 107.3                                  | 92.3                                   |
| 6       | +                | -              | +              | 106.3                                  | 75.3                                   |
| 7       | -                | +              | +              | 88.3                                   | 65.0                                   |
| 8       | +                | +              | +              | 91.8                                   | 78.7                                   |

Уравнения, описывающие процесс криоконсервирования:

I вариант –  $Y_1 = 79.25 - 10.33X_2 + 19.08X_3 + 17.33X_1X_2 - 16.33X_1X_2X_3$

II вариант –  $Y_2 = 61.50 - 11.25X_2 + 16.33X_3$

Т а б л и ц а   3

Результаты клонирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени из различных контейнеров, замороженных без инициирования процесса фазового перехода вода – лед

| № образца       | Количество колоний (КОЕ <sub>к</sub> ) на 10 <sup>5</sup> клеток | Количество кластеров (КлОЕ) на 10 <sup>5</sup> клеток | Количество КОЕ-ГМ на 10 <sup>5</sup> клеток | Сохранность по отношению к нативным клеткам, % |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1               | 52                                                               | 13                                                    | 65                                          | 89.2                                           |
| 2               | 23                                                               | 35                                                    | 58                                          | 79.6                                           |
| 3               | 26                                                               | 25                                                    | 51                                          | 70.0                                           |
| 4               | 4                                                                | 44                                                    | 48                                          | 63.0                                           |
| 5               | 10                                                               | 20                                                    | 30                                          | 42.0                                           |
| 6               | 13                                                               | 33                                                    | 46                                          | 62.5                                           |
| 7               | 27                                                               | 32                                                    | 59                                          | 81.0                                           |
| 8               | 9                                                                | 18                                                    | 27                                          | 37.1                                           |
| 9               | 65                                                               | 21                                                    | 86                                          | 118.0                                          |
| 10              | 20                                                               | 13                                                    | 33                                          | 45.3                                           |
| 11              | 16                                                               | 13                                                    | 29                                          | 39.8                                           |
| 12              | 58                                                               | 39                                                    | 97                                          | 133.2                                          |
| Нативные клетки |                                                                  |                                                       | 72.8                                        | 100                                            |

ше, чем во второй, разница свободных членов равна 17,75 (табл. 1, примечание). Это, по-видимому, связано с тем, что отмывание клеток от криопротектора отрицательно сказывается на жизнеспособности, даже несмотря на то, что его производили в несколько этапов, постепенно снижая концентрацию ДМСО в отмывающем растворе.

Варьирование скоростей (от 0,5 до 10°C/мин) и концентрации ДМСО (0,3–1,4 моль/л) позволило получить сохранность КОЕ-ГМ от 44 до 100 % при устранении влияния неконтролируемых факторов. Максимальное количество колоний и кластеров образуют гемопоэтические клетки эмбриональной печени при замораживании с криопротектором ДМСО в концентрации 0,4–0,7 моль/л со скоростью охлаждения 0,5–1,5 °C/мин и при 10-минутной выдержке при температуре адаптации –9°C, затем при охлаждении со скоростью 10°C/мин до – 40°C и погружении в азот (–196°C).

Результаты клонирования гемопоэтических клеток показали, что существует значительный разброс данных как в нативном, так и в размороженном материале, что можно объяснить действием неконтролируемых факторов, одним из которых является исходное состояние клеток, подвергающихся консервированию, а другим фактором, оказывающем большое влияние на исход криоконсервирования стволовых кроветворных клеток, – переохлаждение, определяющее скорость кристаллизации при замораживании на начальном этапе

Т а б л и ц а 4

Сохранность гемопоэтических клеток эмбриональной печени (КОЕ-ГМ) при замораживании в контейнерах без (1) и с инициатором кристаллизации (2), ( $n = 10$ )

| Параметр                           | Варианты контейнеров |                 |
|------------------------------------|----------------------|-----------------|
|                                    | 1                    | 2               |
| Величина переохлаждения:           | $6.0 \pm 1.21$       | $0.7 \pm 0.04$  |
| Количество КОЕ-ГМ на $10^5$ клеток | $6.6 \pm 1.16$       | $78.2 \pm 8.66$ |

охлаждения. Этот процесс происходит в каждом контейнере по-разному и может вызвать значительное повреждение клеток (табл. 3).

Режим, предложенный для замораживания, довольно сложен и рассчитан на синхронное начало фазового перехода вода-лед во внеклеточной среде в каждом контейнере. Только при соблюдении этого условия характеристики кристаллизации воды будут идентичны в каждом из контейнеров, включенных в цикл замораживания-отогрева.

Нами разработан специальный контейнер с теплоотводящим стержнем [4]. Проведенные сравнительные эксперименты показали целесообразность использования данного вида контейнера для замораживания гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Исследование параметров кристаллизации в контейнерах с иницированием и без иницирования кристаллизации подтвердило гипотезу о высокой стабильности результатов в первом случае и неуправляемости процесса – во втором (табл. 4).

Т а б л и ц а 5

Уровни варьирования факторов в эксперименте  $2^2$

| Уровень               | Относительная величина | Абсолютные значения факторов, °С/мин |       |
|-----------------------|------------------------|--------------------------------------|-------|
|                       |                        | $X_1$                                | $X_2$ |
| Основной              | 0                      | 1.7                                  | 5.75  |
| Верхний               | +                      | 2.5                                  | 7.0   |
| Нижний                | –                      | 1.0                                  | 4.5   |
| Интервал варьирования |                        | 0.8                                  | 1.25  |

Примечание. Температура хранения – 196 °С; температура размораживания 40 °С (водяная баня)

В пределах ранее определенного оптимума скоростей охлаждения была проведена дополнительная оптимизация режима замораживания с применением разработанного контейнера (табл. 5, 6).

Управляя началом процесса фазового перехода вода – лед, скоростью охлаждения I ( $X_1$ ) и II ( $X_2$ ) этапов, мы варьировали скорость кристаллизации внеклеточной среды и пытались найти оптимальные условия охлаждения клеточной суспензии. Получена адекватная модель со следующими коэффициентами уравнения регрессии:  $Y = 78,7 - 18,1X_1 - 3,5X_2 - 1,8X_1X_2$  при  $P = 0,05$ . Анализ уравнения регрессии показал, что уменьшение значений факторов  $X_1$

Т а б л и ц а 6

Оптимизация процесса криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени с ДМСО при управлении началом процесса фазового перехода вода – лед

| N | Значение фактора |       |           | Функция отклика, КОЕ-ГМ |       |       |       |       |
|---|------------------|-------|-----------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
|   | $X_1$            | $X_2$ | $X_{1,2}$ | $Y_1$                   | $Y_2$ | $Y_3$ | $Y_4$ | $Y_5$ |
| 1 | –                | –     | +         | 117                     | 135   | 107   | 118   | 78    |
| 2 | +                | –     | –         | 74                      | 67    | 79    | 61    | 74    |
| 3 | –                | +     | –         | 102                     | 113   | 119   | 107   | 99    |
| 4 | +                | +     | +         | 40                      | 47    | 69    | 49    | 43    |

Уравнение регрессии, описывающее процесс криоконсервирования:

$$Y = 78.7 - 18.1X_1 - 3.5X_2 - 1.8X_1X_2 \text{ при } P = 0.05$$

и  $X_2$  способствует повышению сохранности деконсервированных клеток, а их парное взаимодействие менее значимо, чем одиночное влияние каждого фактора. Большее значение имеет скорость охлаждения I этапа, что свидетельствует о том, что для повышения сохранности гемопоэтических клеток эмбриональной печени процесс кристаллизации внеклеточной воды должен проходить медленно. Это может быть достигнуто посредством инициирования льдообразования во внеклеточной среде и малой скоростью охлаждения.

Применение разработанного контейнера с теплоотводящим стержнем дало возможность уменьшить величину начального переохлаждения и стабилизировать параметры криоконсервирования гемопоэтических клеток под защитой ДМСО. С соблюдением указанных условий был отработан состав консервирующей среды на основе раствора Хэнкса, который обеспечивал высокую сохранность КОЕ-ГМ при минимальном содержании компонентов с 0,7 моль/л ДМСО. Изучение динамики образования КОЕ-ГМ размороженными клетками показало задержку пролиферации на 2–3 сут. После криоконсервирования удлиняется латентный период реализации генетической информации гемопоэтическими клетками, в этом, по-видимому, заключается эволюционно заложенная метаболическая пластичность системы, которая помогает клеткам приспосабливаться к изменению внешних условий и обуславливает выживаемость в критических ситуациях.

*Морфологическая и функциональная характеристика клеточной популяции эмбриональной печени до и после криоконсервирования*

Морфологический и цитохимический анализ нативной и размороженной клеточной популяции, полученной из эмбриональной печени в разные сроки внутриутробного развития эмбриона, показал большое разнообразие клеток: от недифференцируемых бластов, лимфоцитоподобных клеток до зрелых макрофагов и нейтрофилов. Количественный состав популяции представлен в табл. 7. Для удобства анализа были условно выделены 4 возрастные группы.

В отпечатках и мазках 5–6-недельной печени обнаружен довольно высокий процент недифференцируемых бластных клеток ( $17,0 \pm 1,47$ ), представлены они крупными клетками округлой формы с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Лимфоцитоподобные клетки составляют ( $4,0 \pm 0,6$ ) %, на 7–8-й неделе количество клеток этой группы достоверно не изменяется, а с 9-й по 12-ю неделю число недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток снижается соответственно до ( $6,0 \pm 0,6$ ) и ( $2,0 \pm 0,2$ ) %

Изменение клеточного состава эмбриональной печени человека в зависимости от возраста под действием ДМСО и криоконсервирования

| Возраст эмбриона, недели | Условия эксперимента    | n | Клеточный состав            |                   |                          |                           |            |             |               |            |             |             |
|--------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|------------|-------------|---------------|------------|-------------|-------------|
|                          |                         |   | Недифференцируемые бластные | Лимфоцитоподобные | Примитивные эритробласты | Дефинитивные эритробласты | Моноциты   | Макрофаги   | Мегакариоциты | Лимфоциты  | Миелобласты | Гранулоциты |
| 5 — 6                    | Нативные клетки         | 5 | 17.0 ± 1.47                 | 4.0 ± 0.63        | 45.0 ± 3.30              | 14.0 ± 1.26               | 7.0 ± 0.63 | 13.0 ± 1.68 | 0.2 ± 0.04    | 0          | 0           | 0.2 ± 0.04  |
|                          | После экспозиции с ДМСО |   | 17.0 ± 0.84                 | 4.0 ± 0.84        | 44.0 ± 4.40              | 14.0 ± 0.84               | 8.0 ± 0.84 | 13.0 ± 1.89 | 0.2 ± 0.04    | 0          | 0           | 0.2 ± 0.04  |
|                          | После отогрева          |   | 22.0 ± 2.10                 | 7.0 ± 0.42        | 58.0 ± 2.10              | 11.0 ± 2.10               | 4.0 ± 1.26 | 4.0 ± 0.42  | 0             | 0          | 0           | 0           |
| 7 — 8                    | Нативные клетки         | 8 | 14.0 ± 0.91                 | 6.0 ± 0.65        | 32.0 ± 1.56              | 21.0 ± 1.82               | 7.0 ± 1.43 | 16.0 ± 0.72 | 0.8 ± 0.24    | 0          | 3.0 ± 0.65  | 1.0 ± 0.1   |
|                          | После экспозиции с ДМСО |   | 13.0 ± 0.91                 | 6.0 ± 0.91        | 30.0 ± 1.69              | 21.0 ± 1.82               | 6.0 ± 0.91 | 16.0 ± 1.04 | 0.9 ± 0.33    |            | 3.0 ± 1.04  | 1.0 ± 0.26  |
|                          | После отогрева          |   | 22.0 ± 1.69                 | 10.0 ± 0.39       | 40.0 ± 2.21              | 22.0 ± 2.60               | 4.0 ± 0.78 | 3.0 ± 0.96  | 0             | 0          | 0.1 ± 0.77  | 0           |
| 9 — 10                   | Нативные клетки         | 6 | 6.0 ± 1.05                  | 3.0 ± 0.36        | 29.0 ± 3.96              | 57.0 ± 1.77               | 2.0 ± 0.54 | 3.0 ± 0.72  | 0.5 ± 0.18    | 0          | 0.2 ± 0.01  | 0.7 ± 0.2   |
|                          | После экспозиции с ДМСО |   | 6.0 ± 1.26                  | 3.0 ± 0.42        | 25.0 ± 8.82              | 57.0 ± 4.20               | 2.0 ± 0.84 | 4.0 ± 2.52  | 1.0 ± 0.10    | 0          | 0.6 ± 0.08  | 0.7 ± 0.23  |
|                          | После отогрева          |   | 9.0 ± 0.84                  | 5.0 ± 0.42        | 46.0 ± 2.10              | 40.0 ± 2.10               | 1.0 ± 0.84 | 0.7 ± 0.42  | 0.3 ± 0.03    | 0          | 0.3 ± 0.04  | 0.3 ± 0.04  |
| 11 — 12                  | Нативные клетки         | 5 | 6.0 ± 0.63                  | 2.0 ± 0.21        | 30.0 ± 1.68              | 52.0 ± 5.04               | 2.0 ± 0.42 | 6.0 ± 1.68  | 0.8 ± 0.42    | 1.2 ± 0.42 | 0.6 ± 0.2   | 1.2 ± 0.4   |
|                          | После экспозиции с ДМСО |   | 6.0 ± 0.84                  | 2.0 ± 0.28        | 32.0 ± 0.52              | 50.0 ± 3.36               | 2.0 ± 0.28 | 5.0 ± 1.96  | 0.5 ± 0.28    | 1.2 ± 0.42 | 0.5 ± 0.38  | 0.2 ± 0.3   |
|                          | После отогрева          |   | 7.0 ± 0.42                  | 4.0 ± 0.84        | 42.0 ± 7.14              | 43.0 ± 9.24               | 0.7 ± 0.42 | 2.0 ± 1.68  | 0             | 1.3 ± 0.84 | 0           | 0           |

( $P < 0,05$ ). Это снижение, по-видимому, связано с увеличением массы органа и количества гемопоэтических клеток, происходит «разведение» популяции более дифференцированными клетками. Лимфоциты встречаются единично только на 11–12-й неделе ( $1,2 \pm 0,4$ ) %.

Морфологические признаки и цитохимические реакции позволили выделить среди эритроидных клеток примитивные эритробластические элементы, которые составляли почти половину клеточной популяции на 5–6-ой неделе развития, затем с 7-й до 12-й недели количество их достоверно снижается до 30%, и эта генерация эритроидных клеток заменяется клетками дефинитивного эритропоэза (на 5–6-ой неделе ( $14,0 \pm 1,3$ )%, а к концу 12-й – ( $52,0 \pm 5,0$ )% ( $P < 0,05$ ). Около 20% клеток на 5–8 неделе представлены моноцитарно-макрофагальным ростком, затем число их достоверно снижается до ( $2,6 \pm 0,4$ )% моноцитов и ( $6,0 \pm 1,7$ )% макрофагов на 11–12-ой неделе. В отличие от данных, представленных ранее [6], мы не обнаружили на 5–6-неделе того количества макрофагов (60%), которое приводят авторы в своей работе, несмотря на то, что анализировали от 5 до 10 эмбрионов в каждой возрастной группе. В мазках почти не встречались мегакариоциты; единичные миелобластные элементы и зрелые гранулоциты обнаружены в суспензии, полученной из 7–12-ти недельных эмбрионов путем окраски суданом черным В.

Таким образом, из приведенных данных видно, что популяция гемопоэтических клеток эмбриональной печени 5–12-недельного возраста представлена клетками эритроидного ряда, находящимися на разных стадиях развития, моноцитарно-макрофагальными и, в меньшей степени, миелоидно-гранулоцитарными клетками, которые несмотря на их небольшое количество, обладают интенсивностью миелопоэза, в 2–3 раза превышающей таковую костного мозга взрослого человека. Добавление криопротектора и криоконсервирование не оказывали существенного влияния на процент элементов эритро- и миелопоэза, изменялось только количество недифференцируемых бластных и лимфоцитоподобных клеток в сторону увеличения недифференцируемых ( $22,0 \pm 2,1$ )% и лимфоцитоподобных ( $10,0 \pm 0,4$ )% клеток после криоконсервирования 7–8-недельных образцов. Этим, вероятно, объясняется увеличение количества КОЕ-ГМ после криоконсервирования при эксплантации в агар: на  $10^5$  клеток приходится больше клеток-предшественников, чем в нативном материале.

Из приведенных данных видно, что наиболее уязвимой является моноцитарно-макрофагальная популяция, однако ранние предшественники этого ряда сохраняются и при клонировании в агаре образуют как моноцитарно-макрофагальные, так и смешанные моноцитарно-нейтрофильные колонии.

Элементы эритроидного ростка интенсивно делятся. Подсчет митотического индекса клеток в зависимости от возраста эмбриональной печени показал, что очень высокой митотической активностью обладают клетки 5-недельной печени (МИ = 70,8%). На 6–7-й неделе величина его снижается до 55,5%, затем достоверно увеличивается на 9–11-ой неделе, что, по-видимому, связано с переключением с примитивного на дефинитивный эритропоэз, и к 12-ой неделе митотическая активность падает до 50,0% (табл. 8).

Следует отметить, что после 30 мин инкубации с ДМСО во всех случаях наблюдали увеличение митотического индекса за счет клеток, находящихся в стадии профазы, основной особенностью которой является конденсация хроматина и формирование митотического аппарата. Учитывая небольшой срок действия ДМСО на клетки и отсутствие достоверных различий в величинах остальных фаз митотического цикла, можно предположить, что увеличение

Т а б л и ц а 8

Процентное соотношение гемопозитических клеток эмбриональной печени, находящихся на разных стадиях митотического цикла на этапах криоконсервирования ( $n = 10$ )

| Возраст эмбриона, недели | Условия эксперимента | Стадии митотического цикла |          |         |          |           |       |
|--------------------------|----------------------|----------------------------|----------|---------|----------|-----------|-------|
|                          |                      | Профаза                    | Метафаза | Анафаза | Телофаза | Интерфаза | МИ, % |
| 5                        | Нативные клетки      | 63.1                       | 3.2      | 1.8     | 3.5      | 30.2      | 70.8  |
|                          | После действия ДМСО  | 67.2                       | 2.0      | 1.8     | 2.8      | 28.0      | 72.0  |
|                          | После отогрева       | 44.0                       | 2.9      | 1.3     | 2.3      | 49.4      | 50.5* |
| 6                        | Нативные клетки      | 47.1                       | 0.9      | 1.9     | 2.7      | 46.4      | 53.6  |
|                          | После действия ДМСО  | 50.8                       | 1.2      | 3.2     | 2.4      | 42.2      | 57.8  |
|                          | После отогрева       | 54.2                       | 1.2      | 1.9     | 1.6      | 41.1      | 57.9  |
| 7                        | Нативные клетки      | 49.9                       | 2.0      | 1.6     | 1.9      | 45.4      | 54.6  |
|                          | После действия ДМСО  | 60.8                       | 2.0      | 1.1     | 1.3      | 34.8      | 65.2* |
|                          | После отогрева       | 26.8                       | 1.2      | 0.4     | 0.7      | 70.8      | 29.2* |
| 8                        | Нативные клетки      | 56.1                       | 1.7      | 2.1     | 3.4      | 36.7      | 63.3  |
|                          | После действия ДМСО  | 72.6                       | 2.5      | 1.2     | 2.3      | 22.5      | 77.5* |
|                          | После отогрева       | 51.7                       | 1.7      | 0.7     | 1.3      | 44.8      | 55.2* |
| 10                       | Нативные клетки      | 53.7                       | 1.4      | 1.3     | 1.9      | 41.7      | 58.3  |
|                          | После действия ДМСО  | 74.1                       | 1.7      | 0.7     | 2.4      | 20.3      | 79.7* |
|                          | После отогрева       | 59.8                       | 2.6      | 1.7     | 4.0      | 31.9      | 67.9* |
| 11                       | Нативные клетки      | 54.3                       | 0.7      | 3.0     | 3.1      | 35.3      | 64.7  |
|                          | После действия ДМСО  | 60.3                       | 1.2      | 1.6     | 2.8      | 33.7      | 66.3  |
| 12                       | Нативные клетки      | 42.6                       | 1.2      | 1.2     | 4.9      | 50.0      | 50.0  |

Примечание. \*Различия достоверны  $P < 0,05$  по отношению к нативным клеткам

количества профазных ядер вызвано структурирующим действием ДМСО на ДНП-комплексы [12] и клетки, находящиеся в препрофазной стадии митотического цикла, ядерный хроматин которых еще не отличается по структуре от хроматина в интерфазе, становятся заметными за счет изменения конформационного состояния белков и поверхностного слоя воды, входящих в микроокружение молекул ДНП. После замораживания процентное соотношение клеток на разных стадиях митотического цикла в выделенных возрастных груп-

пах достоверно не изменяется. Замораживание под защитой 0,7 моль/л ДМСО практически не снижает количество клеток, находящихся в митозе, однако было бы интересным проследить судьбу каждой стадии в отдельности, чтобы сказать о наличии или отсутствии аномалий в дальнейшем течении процесса деления клеток.

Таким образом, в результате проведенных исследований определен клеточный состав популяции гемопоэтических клеток эмбриональной печени 5–12 недель гестации до и после криоконсервирования по оптимальному режиму с 0,7 моль/л ДМСО, показана высокая пролиферативная активность клеток-предшественников грануломоноцитопоеза в агаровой культуре, а также установлено, что наиболее чувствительными к действию замораживания являются моноциты и макрофаги.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. – М.: Наука, 1976. – 276 с.
2. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени. – Киев: Наук. думка, 1988. – 190 с.
3. Шерешков С.И., Буачидзе Л.Н., Баранов А.Е. и др. Трансплантация клеток фетальной печени от многих эмбрионов больным гемобластозами, кондиционированными общим облучением и химиопрепаратами // Гематология и трансфузиология. – 1984. – 29, N 4. – С. 9–15.
4. А. с. 1402781 СССР, МКИ<sup>4</sup> F 25 D 3/00. Контейнер для замораживания биологических объектов / А.Н.Новиков, С.Т.Олейник, М.И.Шраго, Г.С.Лобынцева и др. – Оpubл. 15.06.88, Бюл. N 22.
5. Gale N.P. Fetal liver transplantation in hematologic disorders // Fetal Liver Transplantation. – New York: Alan R. Liss Inc., 1985. – P. 293–298.
6. Keleman E., Calvo V., Neidner T.M. Atlas of human hemopoietic development. – New York: Springer-Verlag, 1979. – 266 p.
7. Lucarelli G., Izzi T., Delfini G. Fetal liver transplantation in severe aplastic anemia // Hematologica. – 1975. – 63, N 1. – P. 93–94.
8. Moretti L., Stramigioli S., Talevi N. Cryopreservation of human fetal liver: factors influencing granulocyte-macrophage colony (CFU-GM) survival after cryopreservation // Fetal liver transplantation. – New York: Alan R. Liss Inc., 1985. – P. 121–135.
9. O'Reilly R.J., Kirkpatrick D., Kapoor N.A. Comparative review of the results of transplants of fully allogenic fetal liver and HLA-haplotype mismatched T-cell liver transplantation. // Fetal liver transplantation. – New York: Alan R. Liss Inc., 1985. – P. 327–342.
10. Meisner Y., Kapoor N., Kirkpatrick D. Transplantation for acute leukemia with HLA-A and B-non-identical parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells // Lancet. – 1981. – 2. – P. 327–331.
11. Reisner J. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and red blood cell // Blood. – 1983. – 61. – P. 341–349.
12. Szmant H.H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1975. – 243, N. 1. – P. 20–23.
13. Touraine S.L., Roncarolo M.S., Marseglia G.L. Fetal liver transplantation in immunodeficiencies and inborn errors of metabolism // Fetal liver transplantation. – New York: Alan R. Liss Inc., 1985. – P. 299–313.

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

Поступила 10.11.91

#### Г.С.ЛОБИНЦЕВА, І.А.ВОТЯКОВА, Е.І.ОБОЗНА-ПЕЧЕНІЗЬКА, С.Т.ОЛІЙНИК МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, Харків

Розроблено режим криоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки з 0,7 моль/л ДМСО, який забезпечує високу морфологічну і функціональну повноцінність клітин-попередників гемопоеза, дана характеристика клітинного складу популяцій до і після заморожування і на основі математичного моделювання показані особливості пошкодження і захисту клітин у процесі заморожування-відігріву

G.S.LOBYNTSEVA, I.A.VOTYAKOVA, E.I.OBOZNAYA-PECHENEZHSKAYA, S.T.OLEYNIK  
MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CRYOPRESERVED  
FETAL HEMOPOIETIC CELLS

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

A regime of cryopreservation of fetal liver hemopoietic cells with 0,7 моль/л DMSO is suggested that provides for the high morphological and functional full value of cell precursors of hemopoiesis. The composition of cell population is described before and after freezing. Peculiarities of injury and protection of cells during freeze-thawing are demonstrated using mathematical modeling.

**ХРОНИКА**

**29-е заседание Общества криобиологов  
(г. Итака, США, 14–19 июня 1992 г.)**

С 14 по 19 июня 1992 в г. Итаке (США) на базе Корнельского университета состоялось 29-е собрание международного общества криобиологов, на котором было доложено свыше 200 научных работ по различным аспектам теоретической и прикладной криобиологии, суммированных в следующих направлениях: криоконсервация тканей и органов; принципы криобиологии: формирование льда и проблема витрификации, антифризные белки, вопросы осмотического стресса; холодовые адаптации – механизмы криоповреждений растений и беспозвоночных животных; криоконсервация тканей и органов растений; криоконсервация эмбрионов и гамет животных; криоконсервация крови и компонентов крови (стратегия подбора сред и различных добавок); вопросы криохирургии. По проблеме консервации тканей и органов затрагивались вопросы криоконсервации сосудов, опорных тканей, роговицы, кожи, тканей поджелудочной железы, слюнных желез, гепатоцитов в составе кусочков тканей, кусочков тканей сердца и почки. Наибольший интерес представляют результаты работы, сопряженные с криоконсервацией крупных органов (сердце, почки). Эта проблема в общих чертах освещена в фундаментальном докладе Гр. Фея, который поделился своими соображениями о будущем развитии криоконсервации крупных органов. Эти работы ведутся в основном под руководством проф. Г.Меримена и Гр. Фея в лаборатории Красного Креста (штат Мэриленд, США). В частности, сообщено, что после перфузии почки кролика 7,5 М раствором криопротектора VS4 (криоскопическая точка которого  $-33^{\circ}\text{C}$ ) удалось удачно охладить предварительно подготовленную почку до  $-30^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Проводятся также эксперименты по использованию высоких гидростатических давлений (500–1000 атм). Выявлено, что эффект дает только очень медленный подъем давления с предварительной перфузией органа криопротектором. Для консервации тканевых трансплантатов сосудов, хрящей и других тканей используют гликозаминогликаны и, в частности, хондроитинсульфат, а также ДМСО и другие смеси криопротекторов. Доложены работы по криоконсервации тканей и органов растений (культуральных клеток, эмбриональных тканей, меристем). Французские исследователи обращают внимание на большую роль цитоскелетных белков в криосохранении и выживаемости растительных биоматериалов после цикла замораживания–отогрева. Другая группа докладов, посвященных новым результатам по длительному хранению органов при  $0^{\circ}\text{C}$  с использованием UW-растворов (Висконсинский университет, отдел хирургии, зав. – проф. Ф.Бельзер и Дж. Сотард), освещает проблемы усовершенствования новых перфузионных растворов, которые включают ингибитор каскадного цикла арахидоновых кислот, протеаз и лизосомальных ферментов, антиоксиданты, что позволяет хранить 66% почек собак 5 дней. При добавлении ингибитора синтеза тромбина в концентрации 10 мг/л в состав перфузионного раствора удается хранить почку до 7 дней. На симпозиумах по основам криобиологии рассматривались вопросы, связанные с кинетическими и морфологическими параметрами льдообразования и витрификации, водно-солевых и водно-криопротекторных смесей, содержащих проникающие и непроникающие соединения, арабиноксоланы и крахмалы. Обращалось внимание на возможность использования в качестве защитных веществ антифризных белков, выделенных из животных и растений. По проблеме холодовой адаптации беспозвоночных доложены работы, посвященные механизмам нуклеации кристаллов льда, их роста и развития, а также вопросам биохимических перестроек в тканях зимующих насекомых (метаболизм полиолов, ферментов гликолиза и гормонов), пойкилотермных и микроорганизмов. Большое количество докладов было посвящено проблемам криоконсервации гамет и эмбрионов. Основная направленность исследований – использование витрифицирующих растворов и, в частности, этиленгликоля в смеси с ПВП, пропандиола и других защитных коктейлей. Симпозиум по криоконсервации крови и ее компонентов рассмотрел вопросы длительного хранения и клинического

применения эритроцитов, лимфоцитов и клеток костного мозга. Экспериментальные работы освещали также проблему подбора сред, контроля pH, различных коллоидных, энергетических и антиоксидантных добавок в качестве реставрирующих растворов. Криохирургические проблемы касались, главным образом, вопросов техники вымораживания патологических образований печени, простаты, ткани мозга, костей. Обращается внимание на целесообразность использования комбинированных методов замораживания в сочетании с лазерной и радиационно-химической обработкой очагов поражения. Оценивая в целом результаты представленных работ можно отметить особую значимость развития исследований по криоконсервации крупных органов, разработке путей дальнейшего решения этой проблемы.

На общем собрании было представлено также свыше 60 стендовых сообщений по различным аспектам криобиологии.

*А.М.Белоус*

### **Конференция "Теоретические основы криоконсервирования"**

Конференция "Теоретические основы криоконсервирования" была проведена с 7 по 9 октября в г. Градец Кралове (ЧСФР) при поддержке Международного института холода в ознаменование 40-летней годовщины со дня создания низкотемпературного тканевого банка в г. Градец Кралове. В работе конференции приняли участие ученые из 8 стран.

Конференция началась докладом основателя банка Р.Клена "Образование и начальный этап развития тканевого банка в г. Градец Кралов", в котором дан обзор публикаций и событий местного значения с момента образования банка до 1992 г. В сообщении В.Склада (Прага) "Криоконсервирование растений – составная часть деятельности чехословацкого криобиологического общества" обоснована необходимость сохранения и криоконсервирования редких и исчезающих видов растений. П.Мазур (Оак Ридж, США) в лекции "Эмбрионы мышей и дрозофил как иллюстрация двух ветвей криобиологических проблем и принципов" представил обзор наиболее важных с теоретической точки зрения представлений о механизмах криоповреждения и криозащиты клеточных суспензий в процессе глубокого охлаждения. Конспективно изложены основные положения так называемой двухфакторной теории криоповреждения, автором которой является сам докладчик. Доклад Л.Макгена (Эдмонтон, Канада) "Прогнозирование осмотических реакций при низких температурах" посвящен описанию количественной модели, которая описывает кинетику изменения объема клеток, состава и переохлаждения внутриклеточной среды в процессе охлаждения и кристаллизации клеточной суспензии. Сделан вывод, что повреждение клеток в процессе замораживания пропорционально максимальному значению потока воды через клеточные мембраны, которое достигается в процессе замораживания. Механизмы витрификации проницаемых мембран при осмотическом и температурном стрессе обсуждались в докладе М.В.Воиновой и А.М.Косевича (Харьков), построена полуфеноменологическая модель фазового перехода мембранных липидов из жидкого в твердое гелеобразное состояние. А.С.Капрельянец (Харьков) представил метод, результаты и аппаратуру для компьютерного анализа морфологии внутриклеточных кристаллов льда, образующихся в клетках ткани печени при замораживании до различных субнулевых температур. Е.А.Гордиенко (Харьков) обосновал с теоретической и практической точек зрения преимущества быстрого двухступенчатого замораживания по сравнению с линейными программами охлаждения как экономически выгодного и простого метода криоконсервирования.

В докладах П.Боутрона (Гренобль, Франция) "Определение критических скоростей охлаждения и отогрева по калориметрическим измерениям применительно к 2,3-бутаниолу и другим растворам многоатомных спиртов" и "Тенденция к стеклованию растворов 2,3-бутаниола в буферных двойных средах" определена критическая скорость охлаждения, которая соответствует стеклопереходу при охлаждении, и критическая скорость отогрева, при которой раствор переходит из твердого аморфного состояния в жидкое без образования кристаллов льда.

П.Мнержичка с соавт. (ЧСФР) в докладе "Перепады температур при замораживании больших объемов с контролируемой скоростью" сделал вывод о необходимости минимизации перепада температур по объему замораживаемого образца с помощью специальных конструкторских приспособлений. Криозащитный эффект димексида, глицерина и 1,2-пропандиола в отношении гепатоцитов, выделенных из печени животных и человека обсуждался в докладе Н.П.Субботы, В.И.Грищенко (Харьков). Изучено состояние систем биоэнергетики, синтеза белка и способность гепатоцитов метаболизировать ксенобиотики после криоконсервирования различными способами. А.Спутэк (Прага) и соавт. представили экспериментальные данные по сравнительной эффективности глицерина и гидроксипропилового крахмала в отношении эритроцитов человека с 1967 г. Основы криоконсервирования органов, в частности печени и почки, были доложены в докладе К.Грина. Рассмотрены вопросы, касающиеся обеспечения трансплантационным материалом, трудности, связанные с организацией этой работы. Вопросы клинического использования криоконсервированной печени, аспекты, связанные с экспериментальными разработками этой проблемы, обсуждены в двух докладах Б.Фуллера (Лондон). На основании экспериментальных дан-

ных с использованием биофизических методов, в частности спектроскопии магнитного резонанса, показано на печени собак уменьшение концентрации АТФ, уменьшение рН в перфузионных растворах в зависимости от их состава. В докладе Л.П.Кравченко (Харьков) представлены результаты экспериментальных исследований по влиянию гипотермического хранения на сохранность гепатоцитов, оцененную по активности лизосомальных ферментов и уровню АТФ. Изучена возможность пролонгирования сроков гипотермического хранения гепатоцитов крыс при использовании композиционных вариаций к основной сахарозной среде. На конференции обсуждались проблемы организации донорства для целей трансплантации. Предложена резолюция о необходимости создания группы, которая выработала бы единые требования к трансплантационному материалу и определила критерии его забора и тестирования. На заседании, посвященном вопросам криоконсервации органов, были сделаны доклады Б.П.Сандомирским "Организация низкотемпературного банка инсулинпродуцирующих тканей панкреас. Применение ксенокультур в клинике", заслушан доклад В.И.Грищенко "Криоконсервирование клеток эмбриональной печени человека и их использование", а также В.Ю.Тошачова, Н.П.Субботы, А.Н.Сукача, Ю.Н.Лебедева "Банк изолированных гепатоцитов и первый опыт их клинического применения". На заседании, посвященном клиническому применению криоконсервированных тканей, был представлен доклад Б.Двожанковой об опыте применения кожных трансплантатов в Пражском ожоговом центре. Сходная проблема рассмотрена в сообщении специалистов из Градец Кралове по применению различных криоконсервированных биологических покрытий для лечения ожоговых больных. Председательствующий на заседании Р.фон Версен (Берлин), президент Европейского тканевого банка, подчеркнул важность координации деятельности тканевых банков различных стран, а также идентификации методов оценки.

Представленные доклады позволяют утверждать о том, что методы долгосрочного хранения тканей дают возможность получить хорошие клинические результаты их применения.

А.С.Скурников

## ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины Академии наук Украины в октябре 1992 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности "криобиология" Н.Г.Кадниковой "Влияние криоконсервирования на бифидобактерии", в которой разработан эффективный способ криоконсервирования бифидобактерий, применяющихся в медицине и ветеринарии. Разработанный метод обеспечивает долгосрочное хранение бактерий с сохранением их биологических свойств. Впервые проведено комплексное изучение сохранности анаэробных форм бактериальных клеток семейства *Bifidobacterium*, переведенных в состояние глубокого холодового анабиоза. Автором показано, что криочувствительность бифидобактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам, различна. Установлена зависимость сохранности бифидобактерий при криоконсервировании от скорости замораживания-отогрева, состава суспензионной среды, стадии роста культуры и ее исходной концентрации.

В диссертационной работе В.Ф.Марценюк на соискание ученой степени кандидата биологических наук "Криоконсервирование цианобактерий", защищенной в том же специализированном совете в ноябре, изучена криоустойчивость различных штаммов цианобактерий в зависимости от исходных морфофункциональных свойств и режимов криоконсервирования и обоснована эффективность технологий криоконсервирования цианобактерий. На основании проведенных экспериментов автором сделаны следующие выводы: криоустойчивость цианобактерий зависит от морфофункциональных особенностей, обусловленных их принадлежностью к определенному виду и штамму, а также стадией роста периодической культуры. Наиболее устойчивы к замораживанию-отогреву цианобактерии в конце логарифмической и стационарной фаз роста; эффективными режимами охлаждения, обеспечивающими морфологическую сохранность и способность к пролиферации для спорогенных культур являются быстрые скорости охлаждения (300–400 °C/мин; накопление биомассы 135% по сравнению с контролем), а для неспорогенных – быстрые и медленные (4 °C/мин ÷ 300–400 °C/мин; накопление биомассы 80% по сравнению с контролем) при температуре отогрева 30 °C. Режим отогрева оказывает значимое влияние на жизнеспособность цианобактерий лишь при быстром охлаждении; эффективным криопротектором при криоконсервировании цианобактерий является ДМСО в концентрации 5–10% для спорогенных культур и 5% для аспорогенных культур при эквilibрации 0,5–1 час. Криопротекторы глицерин и ПЭО-400 оказывают цитотоксическое действие на цианобактерии; хранение цианобактерий при температуре –196 °C в течение 3,5 лет (срок наблюдения) не снижает число жизнеспособных клеток. Хранение культур цианобактерий при 4 °C в течение 2-х недель не оказывает влияния на количество жизнеспособных цианобактерий при последующем замораживании до –196 °C; криоконсервирование вызывает морфологические и функциональные изменения цианобактерий; ведущими физико-химическими факторами, оказывающими отрицательное влияние на этапах криоконсервирования, являются холодовой шок и концентрационные градиенты электролитов.

## К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ ЖУРНАЛА "ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ"

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением. Объем оригинальной статьи – не более 10, обзорной – 12 стр. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи под рисунками. Объем краткого сообщения – 3 стр. Оба экземпляра подписываются авторами с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов, даты.

Журнал издается методом компьютерного набора. Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. Текст статьи необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку (например ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word) и не использовать программы типа ChiWriter. Должны быть отключены все режимы автоматического форматирования текста, в том числе перенос слов, выравнивание по правому краю, разбивка на страницы, абзацные и другие втяжки текста. Каждая строка должна начинаться с непробельного символа, а между словами должен быть только один пробел. Для разбивки на абзацы следует использовать пустую строку. Абзацами считаются шифр УДК, инициалы и фамилии авторов, название статьи (набирается строчными буквами), каждый пункт из списка литературы. Вместо формулы следует оставить пустую строку (отметив "формула 1, формула 2" и т.д.), а формулу представить на бумаге с соответствующей разметкой. Прописные и строчные буквы в формулах, одинаковые по начертанию и отличающиеся только размером, подчеркиваются: прописные буквы – двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху. Следует особенно четко вписывать сходные по написанию буквы: *e* и *l*, *I* и *J*, *h* и *n*.

Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, *sin*, *cos*, *exp* и т.д. размечаются на прямое начертание знаком " \_ ". Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках). Разметка формул производится синей или фиолетовой пастой, греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические – синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения).

Текст таблицы набивать последовательно клетка за клеткой, текст каждой клетки должен занимать отдельный абзац. Не следует пытаться изображать таблицы с помощью своих редакторов.

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге (или в виде фотографий) размером не более 100 × 200 мм. На них наносятся только необходимые условные обозначения. Расшифровка их дается в тексте или в подписи к рисунку. На обороте рисунка указывается его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Иллюстрации должны быть четкими, чтобы их можно было внести в память системы с помощью сканера.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий – год издания, том, номер, номера страниц; для монографий – место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц.

Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНТИ.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

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

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

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

50 крб.

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

1 1993

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 научные работы по всем аспектам действия охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, по проблемам гипотермии, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, криохирургии, по сублимационному высушиванию, о криопротекторных веществах и их фармакологическом действии. Освещаются вопросы гибернации, зимостойкости растений, конструирования приборов и оборудования для низкотемпературного консервирования биологических объектов и криомедицины.

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

Подписная цена: на 3 мес. — 50 крб., на 6 мес. — 100 крб., на 9 мес. — 150 крб., на 12 мес. — 200 крб.

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 Ukrainian Academy of Sciences  
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine  
Tel. (0572) 72-41-43  
Fax (0572) 72-00-84

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1993. №1. 1-56