

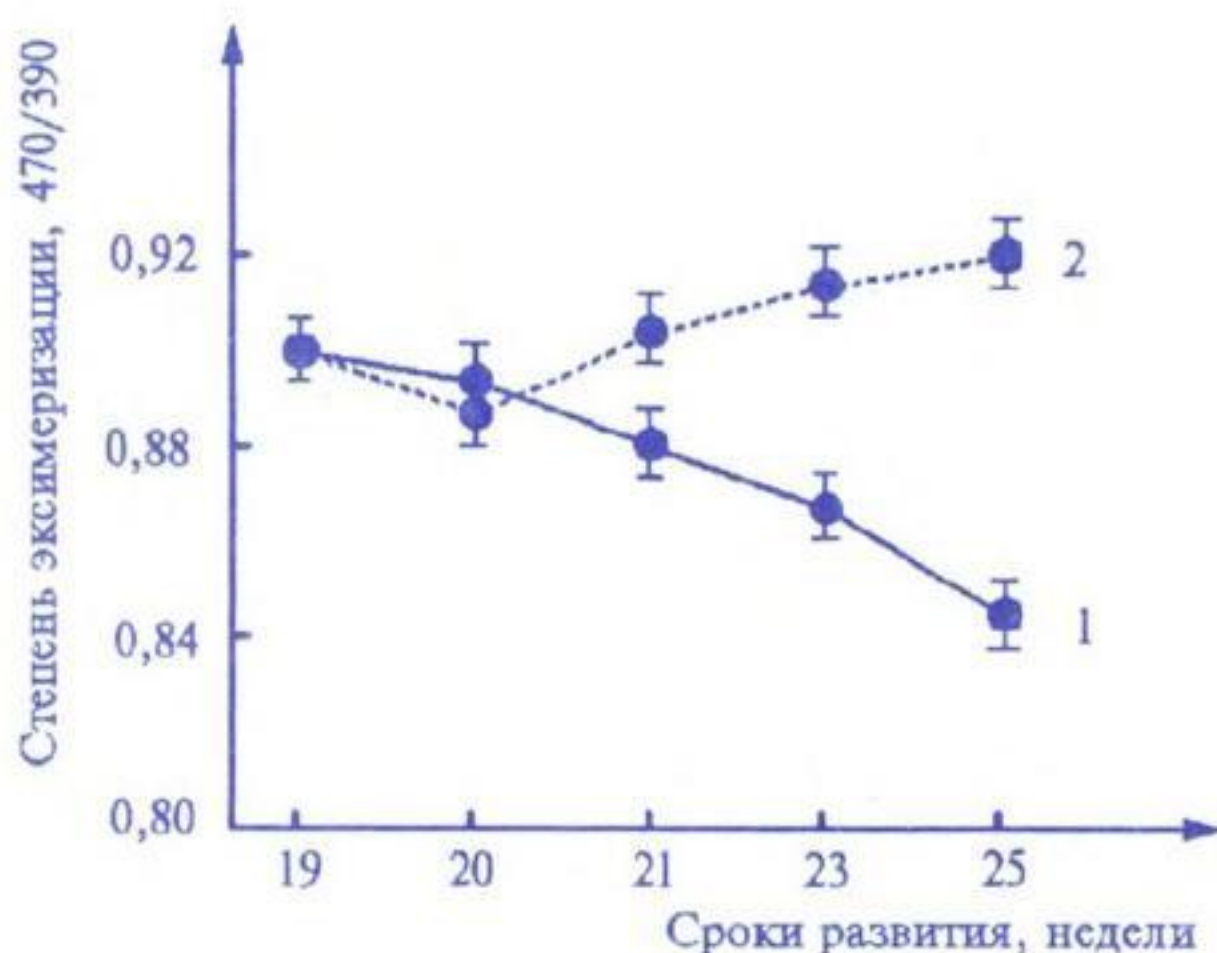
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,
ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ
И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1993

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



КРИОБИОЛОГИЯ ОБНОВЛЕНИЯ: ФАКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Э.И.Обозная-Печенежская, В.И.Грищенко, Е.Я.Панков

**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА** *Н.П.Суббота*

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ
КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК (КОЕ_с) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ
КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА**
А.Н.Гольцев, Л.В.Останкова, Е.Д.Луценко, Т.Г.Дубрава

**ПОДХОДЫ И ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД
ДЛЯ СПЕРМЫ ПТИЦ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ** *Т.П.Линник*

Главный редактор **В.И.Грищенко**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

С.И.Аксенов (Москва), Г.А.Бабийчук (Харьков), А.М.Белоус (зам. главного редактора, Харьков), М.Е.Бекер (Рига), Ю.П.Благой (Харьков), Л.Вонг (Канада), А.Н.Гольцев (Харьков), В.М.Гордиенко (Киев), К.Дж.Грин (Великобритания), В.Н.Гурин (Минск), Г.Ф.Жегунов (Харьков), В.Де Лекер (Бельгия), В.И.Луговой (Харьков), В.Я.Малеев (Харьков), Г.Маттес (Германия), Г.Меримен (США), П.Мнержичка (Словакия), 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.Bлагоj (Kharkov), E.Z.Emirbekov (Makhachkala), A.N.Goltsev (Kharkov), V.M.Gordiyenko (Kiev), C.J.Green (Great Britain), V.N.Gurin (Minsk), W.De Loecker (Belgium), V.I.Lugovoj (Kharkov), V.Ya.Maleyev (Kharkov), G.Matthes (Germany), P.Mericka (Slovakia) H.T.Meryman (USA), E.Ya.Pankov (Kharkov), Yu.F.Paštukhov (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 (Kharkov)

EDITORIAL COUNCIL

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



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

Грищенко В.И. Фундаментальные и прикладные исследования в области криобиологии и криомедицины и перспективы основных направлений отрасли 3

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Обозная-Печенежская Э.И., Грищенко В.И., Панков Е.Я. Криобиология обновления: факты и перспективы 11

Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Шкорбатов А.Г., Благой Ю.П., Козлов А.В., Григорьев Д.Н. Изучение действия криопротекторов на макромолекулярные параметры ДНК 20
Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Влияние концентрации внеклеточного хлористого натрия на проницаемость мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды 25

Суббота Н.П. Функциональное состояние криоконсервированных митохондрий печени плодов человека 29

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Гольцев А.Н., Останкова Л.В., Луценко Е.Д., Дубрава Т.Г. Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕ_с) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата 34

Линник Т.П. Подходы и принципы создания криозащитных сред для спермы птиц и млекопитающих 40

Стегний Б.Т., Бусол В.А. Влияние криоконсервирования и контаминации микоплазмами на сохранение стабильности биологических свойств клеточных культур 48

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Межидов С.Х., Моисеев В.А. О влиянии состава внеклеточного раствора на проницаемость мембран эритроцитов 55

Песина Н.И. Развитие чувствительности эритроцитов к охлаждению в средах, содержащих неэлектролиты 56

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

CONTENTS

<i>Grishchenko V.I.</i> Fundamental and applied studies on the problems of cryobiology and cryomedicine and perspectives of main directions	3
---	---

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

<i>Oboznaya-Pechenezhskaya E.I., Grishchenko V.I., Pankov E.Ya.</i> Cryobiology of renewal: facts and perspectives	11
<i>Kornilova S.V., Leontyev V.S., Shkorbatov A.G., Blagoy Yu.P., Kozlov A.V., Grigoryev D.N.</i> The investigation of the effect of cryoprotectants on DNA macromolecular parameters	20
<i>Gordiyenko E.A., Kovalenko I.F., Rozanov L.F., Smolyaninova E.I.</i> The effect of extracellular sodium chloride concentration on the permeability of mouse oocyte and embryo membranes to water molecules	25
<i>Subbota N.P.</i> The functional state of cryopreserved mitochondria of human fetal liver	29

CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL SYSTEMS

<i>Goltsev A.N., Ostankova L.V., Lutsenko E.D., Dubrava T.G.</i> The functional activity of cryopreserved hemopoietic cells (CFU _e) as a function of the myelograft component composition	34
<i>Linnik T.P.</i> Approaches and creation principles for cryoprotective media for fowl and mammalian sperm	40
<i>Stegniy B.T., Busol V.A.</i> The influence of cryopreservation and Mycoplasma contamination on the stability of biological properties of cell culture	48

BRIEF COMMUNICATIONS

<i>Mezhydov S.Kh., Moiseyev V.A.</i> The effect of extracellular medium composition on the membrane permeability of erythrocytes	55
<i>Pesina N.I.</i> The development of erythrocyte sensitivity to cooling in solutions containing nonelectrolytes	56

DEFENSE OF THESES

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

Научный редактор *В.И.Луговой*
Редактор *Л.А.Рябинина*
Компьютерный набор и верстка: *Л.А.Рябинина, А.М.Шаталов*

Подп. в печ. 21.10.93. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.
Тираж 350 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии
и криомедицины АН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16,
310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

УДК 57.043:001.981.3

**В.И.Грищенко, директор Института проблем
криобиологии и криомедицины АН Украины,
академик АН Украины**

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ОСНОВНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ ОТРАСЛИ

В ноябре 1993 года исполняется 75 лет Академии наук Украины, за годы своей деятельности внесшей существенный вклад в мировую науку, содействовавшей развитию экономики и культуры Украины. Юбилей – выдающееся событие и для ученых, всех ее сотрудников, и для самых широких слоев общественности.

Одним из звеньев Академии наук Украины является Институт проблем криобиологии и криомедицины. Он создан 11 февраля 1972 года на базе двух лабораторий ФТИНТ Академии наук Украины и лаборатории Украинского института усовершенствования врачей. За 21 год коллектив института вырос с 47 до 398 человек, среди них 21 доктор и 108 кандидатов наук, которые трудятся в 14 отделах и 10 лабораториях. Девять лет в институте издается международный научно-теоретический журнал “Проблемы криобиологии” на русском (с 1985 г.) и английском (с 1992 г.) языках. На страницах этого издания выступили ученые базового института, других институтов Академии наук Украины, научно-исследовательских учреждений и учебных заведений Армении, Белоруссии, Молдавии, России, Узбекистана, а также криобиологических центров Бельгии, Болгарии, Великобритании, Вьетнама, Индии, Канады, Китая, Нидерландов, Польши, Словакии, США, ФРГ, Чехии, Японии.

Основными направлениями в деятельности сотрудников института являются фундаментальные и прикладные исследования механизмов криоповреждений, репарации и криозащиты биообъектов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях, изучение механизмов холодовой устойчивости при адаптации их в естественных и искусственных условиях, разработка, синтез и создание новых сред и средств искусственной криозащиты, научное обоснование и применение гипотермии и криотерапии в медицинской практике, разработка технологий криоконсервирования биообъектов.

Существенное место в научной деятельности института занимает комплекс биофизических исследований (ЭПР, ЯМР, оптическая спектроскопия, микрокалориметрия), которые позволили выяснить фазовое состояние внутриклеточного содержимого, барьерные свойства мембран для электролитов и неэлектролитов, степень деградации клеток, характер взаимодействия с криопротекторами (д.б.н. В.А. Моисеев). Установлено, что при температуре $37 \pm 0^\circ\text{C}$ развиваются обратимые кооперативные структурно-фазовые переходы в биополимерах и полимерах, а ниже фазового перехода вода-лед возникают необратимые структурные переходы, которые ведут к стойкому изменению функциональных свойств биомакромолекул. Иницилируемые структурно-фазовыми переходами в биополимерах криоповреждения клеточных мембран



проявляются, в основном, на этапе отогрева при регидратации клеток за счет развития гистерезисных явлений. Обнаруженная способность молекул криопротекторов образовывать связи с биокатионами и стабилизировать конформацию белков явилась основой гипотезы криозащиты биологических систем криопротекторами от повреждающего действия гиперконцентрации солей. В результате исследования структуры водных растворов криопротекторов при положительных и отрицательных температурах показано, что, начиная с температуры -100°C , в системе наблюдается изменение подвижности молекул, которое приводит к стеклопереходу, дополнительной кристаллизации и плавлению. На основе использования ЯМР-спектроскопии высокого разрешения разработана неразрушающая методика исследования динамики макроэргических соединений в клетке на различных стадиях ее криоконсервирования. Дальнейшее углубление исследований физико-химических свойств растворов криопротекторов и клеточных суспензий в зоне низких температур (от -196°C до значения температуры расстеклования) позволило выявить новый механизм криоповреждения клеток — механоэлектрический.

Криобиохимические исследования развивались в направлении изучения структурно-функциональных свойств ферментных белков, мембранных систем генерации энергии, процессов биосинтеза белков, а также биохимической модификации компонентов плазматических и внутриклеточных органелл при действии низких температур (чл.-кор. АН Украины А.М. Белоус). Одним из основных направлений фундаментальных исследований в области криобиохимии явилось изучение структурно-функциональных свойств изолированных и мембранно-связанных ферментов при замораживании в широком диапазоне низких температур (д.б.н. В.И. Луговой). Было установлено, что изменения конформационной структуры и каталитических свойств растворимых ферментов в цикле замораживания-оттаивания происходят в интервале доэвтектических температур и детерминированы влиянием на молекулы каталитических белков комплекса физико-химических факторов, которые возникают при фазовом переходе растворителя.

В результате выяснения механизмов криоповреждений митохондриальной системы генерации энергии и микросомального окисления установлены закономерности повреждения внутриклеточных органелл в зависимости от скорости охлаждения и состава криозащитных сред, а также определена природа физико-химических процессов, ведущих к нарушению барьерной и структурной интеграции клетки (д.б.н. В.В. Лемешко).

Всесторонние исследования по выяснению роли фазово-структурных переходов липидов и белков, ионных переносчиков и внутриклеточных фосфолипидов позволили А.М. Белоусу, В.А. Бондаренко, А.К. Гулевскому и соавт. (1978 г.) впервые обосновать структурную гипотезу криоповреждений, которая придавала значение термодинамическим, физико-химическим и биохимическим уровням изменений в плазматических мембранах клетки как первичной мишени криовоздействия. Существенную роль в инициации криобиохимических исследований имели выпущенные в 1982 г. монографии чл.-кор. АН Украины А.М. Белоуса, д.б.н. В.А. Бондаренко и д.б.н. А.К. Гулевского “Структурные изменения биомембран при охлаждении” и “Барьерные свойства биомембран при низких температурах”, в которых анализировалось состояние проблемы низкотемпературной модификации мембранных структур клеток в естественных и искусственных условиях охлаждения.

Получены принципиально важные данные, касающиеся закономерностей нарушения систем транспорта катионов и метаболитов через плазматиче-

ческие мембраны эритроцитов при замораживании-отогреве, причем изменения происходят в широком диапазоне субнулевых температур и характеризуются формированием микромакродефектов, размеры которых зависят от степени снижения температуры, фазово-структурных переходов липидов и уровня вымерзания воды в мембране.

Основные положения о механизмах развития и предупреждения температурного шока клеток в дальнейшем были изложены д.б.н. В.А. Бондаренко, который утверждает, что факторами, контролирующими чувствительность эритроцитов к холодовому шоку, являются исходный объем и разница осмотического давления между внутриклеточной и наружной средой, а повреждение эритроцитов связано с деформацией упругих элементов мембранного скелета при его осмотической дегидратации и нарушении метастабильности клетки. На основе фундаментальных исследований, посвященных выяснению эффективности ряда мембранных стабилизаторов и ингибиторов метаболизма (А.М.Белоус, В.И. Луговой, Л.А. Бабийчук, А.М. Воротилин), созданы новые методы криоконсервации клеток крови. В частности, использование непроникающих криопротекторов в комбинации с предварительной холодовой адаптацией клеток при 0 °С позволило разработать безотмывочный метод криоконсервации эритроцитов человека. Широкие исследования с применением методов криомикроскопии, оптической и ядерной спектроскопии и математического анализа во многом способствовали созданию новых и усовершенствованию существующих способов криоконсервирования клеточных суспензий, тканей и органов (чл.-кор. АН Украины Н.С. Пушкарь). На основании изучения влияния скоростей замораживания-отогрева, вида и концентрации криопротектора были разработаны методы криоконсервации клеток крови человека, клеток костного мозга, перитонеального экссудата, спермы осетровых рыб и тканевых лимфоцитов экспериментальных животных.

Изучение методами акустической эмиссии, калориметрии и дилатометрии процессов, протекающих в замороженных биообъектах при температуре -60÷-180 °С, выявило ведущую роль механических напряжений и характера их релаксации в повреждении клеток при этих температурах. Для профилактики развития температурного шока клеток построены и экспериментально подтверждены физико-математические модели осмотического лизиса, обезвоживания и внутриклеточной кристаллизации модельных и нативных систем (д.б.н. Е.А. Гордиенко).

В начале 80-х годов в институте начались интенсивные криобиохимические исследования в области естественного гипобиоза (д.б.н. Г.Ф. Жегунов), которые были сосредоточены главным образом на выяснении механизмов перестройки функции сердца и метаболического состояния клеток печени и крови у гибернирующих животных. Получены также новые биохимические данные, касающиеся обмена нуклеиновых кислот и белков в различные периоды процесса гибернации. Уделяется большое внимание криобиохимическим исследованиям систем регуляции структурно-функционального состояния белков цитоскелета (чл.-кор. АН Украины А.М. Белоус), которые играют большую роль в стабилизации клеток в условиях осмотического или температурного воздействия. Установлено, что явление стабильности клеток, развивающееся при охлаждении до 0 °С и частичной дегидратации под действием непроникающих криопротекторов, обусловлено структурными изменениями актина, спектрина и других белков примембранного комплекса, которые связаны с увеличением степени фосфорилирования белков цАМФ-независимой

спектринкиназой, что приводит к более тесной связи их с внутренней мембранной поверхностью.

Расширение исследований в области криобиохимии привело к созданию в 1989 г. двух новых отделов — отдела биохимии холодовых адаптаций (д.б.н. А.К. Гулевский), целью которого является дальнейшее углубление изучения биохимических закономерностей и молекулярных основ адаптации животных к охлаждению и замерзанию, а также отдела криофизиологии клетки (д.б.н. В.А. Бондаренко), который решает проблемы искусственной адаптации клеток к воздействию охлаждения и низких температур с помощью биологически активных модификаторов структуры и функции мембранных систем клеток.

Важным фундаментальным направлением в деятельности института является создание научных основ, экспериментального синтеза и первичного скрининга новых видов криопротекторов и изучение комплексных криоконсервантов (д.б.н. В.И. Луговой). В результате изучения ряда веществ, обладающих криозащитными свойствами — полиолов, алифатических амидов и их изомеров и производных, полученных путем включения в структуру веществ заданных химических радикалов и оксиметилирования многоатомных спиртов: этиленгликоля, глицерина, пропиленгликоля, — получены новые криозащитные соединения 7–8 оксиэтильных звеньев с этиленгликолем, в частности ПЭО–400, который эффективен при замораживании миелокариоцитов и лейкоцитов. Синтезированы новые криозащитные вещества — оксиэтилированные глицерины, которые эффективны при криоконсервировании перевиваемых клеточных культур, лейкоцитов и тромбоцитов (д.б.н. М.И. Шраго). Впервые использованы в качестве криопротекторов оксиэтилированные ацетамид, морфолин при замораживании клеток культуры ткани. На основе новых многокомпонентных криоконсервантов, содержащих солевые и буферные добавки, мембраноактивные вещества, гликоли и амиды, разработаны методы криоконсервирования репродуктивных клеток животных, а также влияния криопротекторов на зимостойкость растений и всхожесть семян. Совместно с отделом криобиофизики (д.б.н. А.М. Воротилин) завершены с положительным результатом клинические испытания криоконсерванта пропандиосахароля, используемого для замораживания эритроцитов.

Фундаментальные исследования в области криоиммунологии были сосредоточены на проблемах искусственного холодового анабиоза иммунокомпетентных клеток (д.м.н. А.А. Цуцаева). Исследования проводились в направлении изучения механизмов возникновения и репарации нелетальных повреждений, которые возникают в биологических объектах разных уровней организации при переводе в состояние глубокого холодового анабиоза. Важным направлением иммунологических исследований является изучение процесса и механизмов восстановления свойств клеток после их трансплантации в организм облученных реципиентов, поиск путей купирования иммунодепрессий лучевого и нелучевого генеза (д.м.н. А.Н. Гольцев).

Опираясь на результаты фундаментальных исследований, удалось разработать новые виды технологии криоконсервирования и лиофилизации биологических объектов (вирусов, фагов, промышленных штаммов микроорганизмов, перевиваемых клеток, гибридом, кроветворных клеток и лимфоцитов) (к.м.н. И.П. Высеканцев), а также обосновать практические пути повышения эффективности лечения иммунодефицитных состояний лучевого и нелучевого генеза (д.б.н. Н.Н. Попов).

Успешное развитие фундаментальной и прикладной криобиологии во многом связано с интенсификацией в институте криоморфологических иссле-

дований, которые нашли широкое применение при изучении характера микроскопических криоповреждений и репарации изолированных клеток и тканей (д.м.н. Т.Н. Юрченко). Комплекс исследований, выполненных на роговой оболочке, явился основой разработки метода ее низкотемпературной консервации, в результате чего офтальмологические учреждения получили возможность использовать эту ткань при оптических и реконструктивных операциях. Т.Н. Юрченко и ее учениками создана концепция, в которой изложена последовательность морфологических процессов, развивающихся при действии охлаждения на клетки. В результате изучения ультраструктуры клеток и внутриклеточных органелл (д.б.н. А.С. Капрельянц) после гипотермического воздействия была установлена зависимость уровня адаптированности биообъекта от действия температурно-осмотических факторов и степени дифференцировки.

Методами криофрактографии было подтверждено, что температурно-зависимые изменения мембран клеток сопровождаются сдвигами в характере белок-липидных взаимодействий, хорошо определяемых по плотности и распределению трансмембранных белков, а также компактизации и конденсации внутриклеточного вещества. Морфологические исследования, проведенные при изучении реакции организма как целостной системы на холодовое воздействие, обнаружили, что быстрое охлаждение до 20 °С оказывает выраженный кардиопатогенный эффект, а введение внутрь организма криопротекторов вызывает гидратационно-осмотический эффект (д.б.н. В.Ф. Козлова).

Исследования по изучению механизмов устойчивости организмов в условиях искусственного охлаждения широко проводилось в отделе криофизиологии, где изучали нейрофизиологические процессы, регулирующие терморегуляцию и адаптацию животных и человека (д.б.н. Г.А. Бабийчук). Проведенные исследования по изучению механизмов действия охлаждения на метаболические и физиологические процессы, протекающие в тканях головного мозга и сердечно-сосудистой системы, позволили выявить новые закономерности в реализации первичных механизмов ответной нейрогуморальной реакции организмов на холодовое воздействие (выброс адреналина и подавление секреции серотонина). Впервые установлено, что охлаждение головного мозга животных влияет на степень сродства к нейромедиатору и количество β -адренорецепторов в мембранах нейросекреторных клеток, что снижает активность системы центральной внутриклеточной регуляции метаболизма и, в частности, аденилатциклазы и циклических неклеотидов. На основе результатов этих работ выдвинута концепция о существенном вкладе нейротрансмиттерных механизмов норадренергической природы в изменение пространственной синхронизации биоэлектрической активности коры и гипоталамуса головного мозга при охлаждении тела, а также о роли проницаемости для норадреналина гематоэнцефалического барьера гипоталамуса в наблюдаемой при гипотермии динамике биоэлектрической активности. Способ охлаждения тела с помощью гипотермии оказался эффективным при лечении отдельных последствий черепно-мозговых травм, экзотоксических ком, алкогольного абстинентного синдрома, психозов, маниакально-депрессивного состояния, бесплодия, токсикозов беременности, вегетососудистых расстройств.

В последнее время в институте все шире проводятся исследования в области изучения механизмов криоповреждений и криозащиты репродуктивных клеток (гамет, эмбрионов, гонад) животных и человека, которые используются в сельскохозяйственной и медицинской практике (академик АН Украины В.И. Грищенко). Традиционным направлением в криобиологии репродуктив-

ных систем является также изучение механизмов криоповреждений половых продуктов рыб и создание технологических процессов их криоконсервирования. На основании изучения механизмов криоповреждения и криозащиты спермы редких, исчезающих и промысловых рыб выявлен более высокий уровень молекулярного отношения холестерин/фосфолипиды в спермиях морских видов рыб по сравнению с пресноводными особями, что позволило сделать вывод о существенной значимости этого механизма в развитии устойчивости спермиев рыб к осмотическим градиентам среды. Создан первый в СНГ коллекционный криобанк спермы рыб, в котором хранится при -196°C 2000 образцов, что позволяет проводить широкие селекционные работы. Так, получен гетерозисный гибрид между немецким карпом и сазаном, который характеризуется скоростью роста в два раза большей, чем у родительских форм (к.б.н. Е.Ф. Копейка).

На основе фундаментальных исследований показаны целесообразность использования сверхбыстрых скоростей для замораживания спермиев человека и эмбрионов мышей, а также криозащитная эффективность метильных, этильных, этоксильных производных глицерина и ацетамида, содержащих различное число функциональных групп в молекуле стартового вещества с различным пространственным расположением. Разработаны среды, позволяющие сохранить эмбрионы на протяжении двух суток в условиях гипотермии без потери ими биологической полноценности, а также метод их криоконсервации с применением сверхвысоких скоростей охлаждения и низких концентраций криозащитных веществ, который позволяет сохранять жизнеспособность до 95% эмбрионов. Также разработан способ хранения спермиев в течение нескольких дней при 8°C без добавления криопротекторов.

Установлено, что наиболее устойчивыми к криовоздействию являются яйцеклетки, полученные у женщин с нормальным гормональным преовуляторным фоном, а при повышении концентрации в крови эстрадиола, пролактина изолированные яйцеклетки после замораживания-оттаивания характеризуются низкой жизнеспособностью. Современные экспериментальные данные, результаты собственных исследований и теоретические основы криоконсервации половых продуктов животных и человека были изложены в монографии А.М. Белоуса, В.И. Грищенко, Ю.С. Парашука "Криоконсервация репродуктивных клеток" (1986 г.) и В.И. Грищенко, Ю.С. Парашука, Ф.В. Дахно, Г.Г. Юрченко "Криобиология и проблема бесплодия" (1990 г.).

Научно-исследовательские работы, проведенные совместно с Харьковским мединститутом по освоению и внедрению в клиническую практику метода экстракорпорального оплодотворения, позволили разработать критерии отбора супружеских пар для этой программы, подобрать оптимальные схемы суперовуляции с использованием импортных препаратов хумегона, профази, неопергонала, простагландина, а также отечественного препарата грифалона, обладающего ФСГ-активностью. В результате проведения программы оплодотворения вне организма родилось 28 детей. В настоящее время имеется 36 прогрессирующих беременностей.

Важное научно-практическое значение имеют исследования, позволившие разработать метод криоконсервирования гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека и изучить влияние факторов криоконсервации на гемопоэтические клетки-предшественники эмбриональной печени человека (к.б.н. Г.С. Лобынцева).

Дальнейшее развитие проблем криомедицины шло в направлении широкого использования не только клеточных суспензий, но и разработки способа

низкотемпературного консервирования и изучения клинической эффективности трансплантации размороженной щитовидной железы (чл.-кор. АН Украины А.М. Утевский, чл.-кор. АН Украины Н.С. Пушкарь, д.б.н. В.А. Чуйко), а также других желез внутренней секреции. На основании изучения процессов роста и размножения клеток щитовидной железы в органной культуре выяснены особенности приживания и восстановления функциональной активности криоконсервированного тиреоидного трансплантата.

В институте разработан и применяется технологический процесс получения препарата криоконсервированных ксеногепатоцитов и их применения в клинической практике (при печеночной коме, отравлениях, желтухе, гепатитах различного генеза). Существенные перспективы намечаются в результате клинического использования криоконсервированной гормон-продуцирующей ткани поджелудочной железы для лечения сахарного диабета и его осложнений. Разработанная технология долгосрочного хранения культур островковой ткани поджелудочной железы новорожденных поросят позволила создать низкотемпературный банк ксеногенной инсулинпродуцирующей ткани, доступной для клинического использования (д.м.н. Б.П. Сандомирский).

Проблемы криомедицины решаются также в направлениях использования низких температур как для разрушения патологически измененных тканей, так и в качестве фактора, стимулирующего процессы заживления (д.м.н. Б.П. Сандомирский). Это направление в криомедицине нашло практическую проверку прежде всего в области комбустиологии. Было обнаружено, что дозированное охлаждение может оказывать стимулирующее влияние на процессы регенерации в очаге острого и хронического воспаления. Это позволило научно обосновать способы холодового лечения ожоговых и гнойных ран, трофических язв, пептических язв двенадцатиперстной кишки, хронического тонзиллита, хронического гепатита и цирроза, поскольку криодеструкция малых объемов паренхимы печени приводит к стимуляции процессов регенерации в этом органе.

Изучение возможностей сочетания низких температур с другими физическими факторами (ультразвук, лазер, плазменный скальпель) позволило создать новые оригинальные методы лечения. Реализация ряда новых методов лечения стала возможной после создания специального эндоскопического криоинструмента – криоэлектрокоагулятора КЭК-1, который нашел применение в клиниках страны и за рубежом, а также других эндоскопических криоинструментов для холодового лечения печени, опухолей мочевого пузыря. Описанные выше исследования сочетались также с разработкой дифференцированных подходов к созданию биологических покрытий из консервированных амниотической и хориальной оболочек, лиофилизированной плаценты, криоконсервированной с высокими скоростями охлаждения кожи человека для ран при лечении ожоговых поражений.

Научные результаты работы института отражены в 73 монографиях, в свыше 2500 статьях. Сотрудниками института получено 13 патентов и 291 авторское свидетельство. За научные достижения и внедрение результатов в практику получили Государственные премии СССР и УССР В.И. Грищенко, Н.С. Пушкарь, М.И. Шраго, Т.Н. Юрченко, Т.М. Шарлай, в 1992 г. А.М. Белоус, А.М. Воротилин, А.Н. Гольцев, Г.С. Лобынцева, В.И. Луговой, В.А. Моисеев удостоены Государственной премии Украины в области науки и техники. Именных премий АН Украины удостоены А.М. Утевский, А.М. Белоус, Н.С. Пушкарь, Ю.А. Иткин, Б.П. Сандомирский, Н.А. Волкова, Ю.И. Исаев, В.А. Чуйко, В.И. Грищенко, Г.А. Бабийчук, А.К. Гулевский, В.А. Бондаренко,

премий для молодых ученых – А.Ю. Петренко, В.А. Коптелов, О.В. Кудокоцева. Звание заслуженного деятеля науки и техники Украины присуждено В.И.Грищенко.

Оценивая пройденный 21-летний путь научной и научно-организационной деятельности, следует отметить значительный вклад института в становление и развитие криобиологии как науки. Создан теоретический, экспериментальный и прикладной базис для дальнейшего всестороннего изучения действия холода на сложные биологические объекты, что открывает большие перспективы для практики в области биологии, медицины и народного хозяйства. Достигнутое открыло широкий путь для развития многих направлений. Мы четко представляем перспективы деятельности коллектива. Это прежде всего исследования ионтранспортирующих систем в регулировании структуры и функций белков цитоскелета при температурно-осмотических влияниях на клетки, что позволит в дальнейшем подойти к решению важной проблемы контроля структурно-функционального состояния актиновых филаментов и микротрубочек, являющихся стабилизирующими структурами клеток и мембран. Необходимо дальнейшее изучение механизмов реакции клеток на снижение температуры среды. Мы намерены на молекулярном уровне исследовать сравнительные структурные изменения клеток теплокровных и хладнокровных биообъектов при снижении температуры до нуля и ниже вплоть до возникновения твердой фазы водной системы. Наряду с этим ставится цель дальнейшего изучения механизмов действия факторов низкотемпературной консервации, лазерного облучения, магнитного поля, СВЧ-энергии изолированных и в соединении с низкими температурами на морфофункциональные и генетические особенности репродуктивных клеток животных и человека. Будут углублены исследования по раскрытию молекулярных, субклеточных, клеточных механизмов глубокого холодового анабиоза и ангидробии, созданию эффективных методов длительного хранения биологических объектов, обеспечивающих сохранение генома и генетически детерминированных признаков, изучению ведущих механизмов индукции и купирования иммунодефицитных состояний вирусного и лучевого генеза. Продолжатся поиск и синтез новых криозащитных соединений в ряду алифатических амидов и полиолов, создание на их основе сложных криоконсервантов с целью криоконсервации различных биологических объектов и повышения резистентности теплокровного организма при глубокой гипотермии. Предполагается продолжить исследования механизмов холодовой адаптации у гибернарующих и морозостойких животных для обоснования подходов к управляемой гипотермии гомойотермных животных и человека, разработки принципиально новых криозащитных сред нового поколения для консервирования органов, тканей и организмов. Есть необходимость теоретического и практического обоснования новых подходов, технических средств и клинических методов использования консервированных органов и тканей (почек, печени, сердца, сосудов, легких) для хирургической коррекции при таких заболеваниях человека, когда требуется разработка эффективных консервантов, технических систем для перфузии и длительного хранения органов в жизнеспособном состоянии. Будут выясняться принципы организации и функционирования систем, обеспечивающих при помощи нервных и гуморальных механизмов температурный гомеостаз у пойкило- и гетеротермных организмов.

Институт ведет организационную работу по созданию Украинского общества криобиологов, что в дальнейшем даст возможность координировать научно-исследовательские работы развивающейся отрасли.

На основании результатов исследований, полученных авторами еще в 60–70-х гг. и подтвержденных литературой последних лет, в развитии криобиологии выделено принципиально новое направление – криобиология обновления. В основу ее легло неизвестное ранее, но реально существующее стимулирующее, трансформирующее (преобразующее) и мутагенное (с гетерозисным эффектом) действие криоконсервирования. Делаются следующие выводы: биообъекты, в частности животные, растительные и дрожжевые клетки, пережившие криоконсервирование, образуют качественно новую, функционально более полноценную клеточную популяцию путем изменения морфологии (тетра-, пента-, окто- и даже анеуплоидные хромосомные наборы), функции (индукция мутаций с гетерозисным эффектом) и регуляции (изменение процессов транскрипции, конденсации-деконденсации хромосом) клеточного генома.

Данные, полученные нами в период формирования криобиологии как науки (60–70-е гг.) не укладывались в общепринятые представления о сохранении либо повреждении криоконсервированных биообъектов. Это прежде всего относится к образованию полиплоидных форм мегакариоцитов криоконсервированного костного мозга [26], активации катионных белков (КБ) после криоорошения (-196°C) раневой поверхности [30], интенсификации процессов регенерации после криоохлаждения (-196°C) шейки матки онкологических больных с последующими благоприятными сдвигами в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системе [10] и др. Факты, свидетельствующие о благоприятном изменении морфофункциональных свойств криоконсервированных биообъектов, легли в основу предложенной нами ранее гипотезы о том, что криоконсервированные клетки и их популяции образуют качественно новую, функционально более полноценную клеточную популяцию даже по сравнению с контролем. Полученные в последние годы данные убеждают, что на смену криобиологии сохранения, успешно решившей многие важные задачи, связанные с проблемами трансфузиологии, трансплантологии и создания банков генетически редких, исчезающих видов животных и растений, спермы рыб, гусей, петухов и человека, клеток овариальной, гемопоэтической и других тканей, приходит и все больше утверждается криобиология нового типа – криобиология обновления. Отличительные признаки ее наиболее полно отражены в работах [12, 28]. Однако криобиология обновления до сих пор не получила широкого признания, поскольку многие феномены, такие как явление раннего “всплеска” в структурных компонентах клетки после повреждающих воздействий [24], формирование структурного “следа” адаптации [25] и др., свидетельствующие в пользу выдвинутой гипотезы, открыты лишь в последние годы. Цель настоящей работы – изложить экспериментальные данные, подтверждающие предложенную ранее гипотезу. Под термином “обновление”, согласно классической терминологии, понимается распространенное исключительно в природе состояние физиологической активации жизненно важных процессов, проявляющееся в результате самоизменения биообъекта. Стать “обновленным” означает: 1) приобрести другой характер, 2) приобрести другой вид, 3) стать новым по составу, пополниться включением, внесением чего-то нового в результате каких-либо перемен, изменений, преобразований. Поэтому данные, полученные после криоконсервирования биообъектов, обсуждаются согласно приведенной выше терминологии.

Для оценки морфофункциональных свойств криоконсервированных биообъектов использовали классические и специально разработанные с учетом факторов криоконсервирования цитохимические методы, подробно изложенные в [27, 28]. Корреляционно-регрессионный анализ внутриклеточных структур и функций проведен на ЭВМ "БЭСМ-6" по методу Р.П. Нарциссова.

Стимулирующее действие криоконсервирования

В наших исследованиях (70-е годы) отмечалась активация КБ, обладающих антибактерицидной функцией и играющих существенную роль в ходе заживления раневой поверхности. Очищение ран от гнойно-некротических масс в группе лиц с холодовым (-196°C) воздействием наступало через 3–8 сут (против 11 сут в контроле). На 2–3 сут ускорялись репаративные процессы и на 3–4 сут — заживление гнойных ран. Аналогично под влиянием замораживания ($-160\div-165^{\circ}\text{C}$) стимулировались процессы регенерации тканей области надмышечков плечевой кости, улучшалась микроциркуляция за счет новообразованных капилляров [14], стимулировались процессы восстановления тканей печени, слизистой двенадцатиперстной кишки, небных миндалин, вовлеченных в воспалительно-дегенеративный процесс [31]. Как показали наши наблюдения, образование рубцово-замещенной поверхности сопровождается усилением регенерации после криоохлаждения шейки матки гинекологических больных, в результате чего стенки сосудов были более утолщенными и уменьшались их просветы [10]. Наблюдалась также более активная пролиферация клеточных элементов роговой оболочки после сочетанного действия криоаппликации и криоконсервирования в условиях ауто- и аллотрансплантации [6]. В криоконсервированном лоскуте митотический индекс был равен 26,0%, что почти в 3 раза превышало индекс контроля. В основе стимулирующего действия криоконсервирования биообъектов лежит открытое в 1981 г. явление раннего "всплеска" в структурных компонентах клетки [24].

Стимулирующее действие криоконсервирования — общебиологическое явление, так как обнаружено у ракообразных, простейших, микроорганизмов, бактерий и растительных объектов. Так, было установлено стимулирующее влияние криоохлаждения (-196°C) на скорость выхода из цист инфузорий и на скорость развития эфинниумов дафний [41], повышение антибиотической активности споровых культур стрептомицетов после криоконсервирования по оптимальной программе и хранения при -196°C в течение 5–6 мес [3]. Получено большее, чем в контроле (без низкотемпературного воздействия), накопление биомассы нитчатых культур цианобактерий *Nostoc sp.* ATCC 29411 и *Anabiena var* ATCC 29313 [23]. Повышение метаболической активности после криоконсервирования и хранения при -196°C наблюдали у микроорганизмов различных систематических групп: ацетилредуктазная активность клубеньковых бактерий *Bradyrhizolium japonicum* 2490 возрастала в 2 раза, а *B. sp. hepinas* в 2,5 раза [32]; активность и синтез алколоида элимоклавина у гриба *Claviceps sp.* ВКМ F-2609 возрастали в 1,5 раза [34]; активность к синтезу антибиотика цефалоспорина С у штаммов-продуцентов (грибов) *Acremonium chrysogenum* ВНИИА 281А и ВНИИА 305А возрастала до 112% в сравнении с контролем до криоконсервирования [33]. Было обнаружено стимулирующее влияние низких температур (-196°C) на культуры салата, укропа, лука, томатов, проявляющееся на этапе прорастания [36]. Анализ влияния замораживания ($-10\div-196^{\circ}\text{C}$) на полевую всхожесть семян показал, что оно видоспецифично [37]. Важным является установление факта повышения полевой всхожести семян (*Pulsatilla patens* (α) mill, *Aconitum septemtrionale*

koella) по сравнению с контролем и ускорение роста растений (*Primula veris*). У ряда видов замораживание семян способствовало ускорению перехода растений в генеративное состояние (*Daanthis jische*).

Трансформирующее (преобразующее) действие криоконсервирования

В период формирования криобиологии как науки возникло новое направление — изучение взаимозависимости внутриклеточных структур и функций. С помощью корреляционно-регрессионного анализа нами были обнаружены большая зависимость метаболизма размороженных клеток костного мозга от гликолитического и пентозного циклов, *SH*-групп, КБ, меньшая — от цикла Кребса; уменьшение взаимозависимости ферментных и других систем. Следовательно, криоконсервированные клетки костного мозга характеризуются качественно иным уровнем гомеостаза. Отмечены также благоприятные сдвиги в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системе после криоохлаждения шейки матки онкологических больных: переход ановулярных циклов, имевших место до криообработки матки, в овулярные, появление овуляций у больных, не поддававшихся лечению общепринятыми методами терапии, прекращение дисфункциональных маточных кровотечений, установление нормального физиологического цикла [10]. Наблюдается перестройка и в регулируемом гормонопозе: стимулируется включение иодида в белки щитовидной железы, активируется моноаминоксидаза в срезах печени, сердца, щитовидной железы; изменяются параметры связывания ³H-норадреналина с рецепторами и др. [38, 40].

Прослежено благоприятное преобразование иммунологических реакций: при переливании криоконсервированного костного мозга от двух генетически различающихся доноров снимается эффект инактивации стволовых кроветворных клеток несингенными лимфоцитами, присутствующими в смешанном трансплантате [15]. Инактивируется супрессорная активность криоконсервированных клеток селезенки [43], моноцитов-макрофагов и других лимфоидных клеток, отличных от Т-клеток [52]. После переливания криоконсервированной крови снижается риск заболеваемости вирусным гепатитом, так как в размороженных эритроцитах антиген не обнаружен [1]. Эти данные коррелируют с большей выживаемостью летально-облученных животных после трансплантации им криоконсервированных гемопоэтических клеток [8, 15, 35]. Все вышеперечисленное свидетельствует об уменьшении иммунологических реакций в размороженных клетках и повышении устойчивости их к облучению.

Вместе с тем положительный эффект криоконсервирования обнаружен не только в иммунокомпетентных клетках (гемопоэтических), но и ряде других: при действии рентгеновского излучения на фибробласты яичника китайского хомячка и микроорганизмы снижение температуры от 22 °С до -196 °С приводило к уменьшению повреждения хромосом и увеличению выживаемости клеток в 3,5 раза [42]. В целом, при температуре ниже -100 °С клетки млекопитающих становятся более устойчивыми к облучению, чем при комнатной температуре (22 °С). Эти данные подтверждены и на растительных биообъектах: в первые часы после облучения, то есть в фазе G₂ при 34 °С возникает больше поврежденных клеток боковых корешков конских бобов (*Vicia Faba*), чем при 24 °С, при 4 °С клеток с абберациями еще меньше [13].

Трансформирующее действие криоконсервирования хорошо прослеживается на этапе репарации и регенерации: в процессе рубцевания раневой поверхности образовывались тонковолокнистые рубцы, обеспечивающие более

благоприятный косметический эффект, вместо грубых, келлоидных в контроле. При этом повышается устойчивость тканей к гипоксии, развивающейся после термического ожога кожи, снимается токсичность ожогового некроза [16]. Считается, что холодовой стресс ведет к более благоприятному протеканию биохимических реакций в отличие от других видов травм (механических, термических и др.), что способствует замещению зоны криораны собственной тканью без выраженных рубцовых образований [4].

Репаративные процессы, носят, по всей вероятности, достаточно сложный характер подобный тому, который отмечался после криовоздействия (-196°C) на суставной хрящ и межпозвоночный диск животных: перестройка субхондриальной кости на этапах репарации сопровождается компактизацией структуры и более ранним включением функции сустава [29]. Репаративная регенерация не восстанавливает первичную структуру межпозвоночного диска, а сопровождается глубокой перестройкой тканей диска и отличается характерным своеобразием: формируется костно-хрящевое сращение прилегающих позвонков (корпородез) [20]. Необратимая трансформация тканей после криовоздействия — общебиологическое явление, так как проявляется и на растительных биообъектах. Установлено, например, образование каллюса без прямого роста первичной меристемы и нарушение симпластности в пределах суспензии *Acer plendoplasticus* в результате замораживания (-196°C) [22].

Наиболее ярко трансформирующее действие криоконсервирования проявляется уже на молекулярном уровне: получены криогибрид лизоцим-РНКаза [39], гибридные формы ЛДГ и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, которые различаются электрофоретической подвижностью [7]. Отмечено появление белков холодового шока [19]. Приведенные выше данные, затрагивающие все уровни организации биообъекта, соответствуют признакам “обновления”, и теперь становится очевидным, что криоконсервирование вызывает реальные признаки обновления.

Мутагенное действие криоконсервирования

Изменение морфологии и функции клеточного генома. В 60–70 гг. нами были получены полиплоидные формы мегакариоцитов криоконсервированного костного мозга [26]. Позднее эти данные были подтверждены и другими авторами: в процессе криоконсервирования роговой оболочки в слое заднего эпителия появляются гигантские 3- и многоядерные клетки [6]. В последние годы прослежено образование гигантских многоядерных клеток (симпластов) после воздействия сверхнизкими температурами (-196°C) на культуры клеток ВНК-21 [21]. Недавно обнаружена экспрессия специфических генов холодовой адаптации, регулируемая на транскрипционном уровне и установлена закономерность наследования холодоустойчивости [47]. Считают, что гены холодоустойчивости сцеплены с половой хромосомой, и скорость развития особей зависит в основном от низкотемпературных факторов (93%) по сравнению с влиянием родителей (3%) [44]. Найдено, что частота количественных хромосомных аномалий в криоконсервированных сперматозоидах достоверно ниже (3%) по сравнению с контролем (5,2%) [45].

Под морфологией клеточного генома нами понималось исключительно изменение характера хромосомного набора. Показано, например, образование тетра- и даже октоплоидных клеток, а в некоторых случаях и анеуплоидных хромосомных наборов в результате холодовой обработки яиц [48] и культивируемых фибробластов человека [50]. Частота и спектр выявляемых кариологических аномалий зависит от температуры и продолжительности обработ-

ки. Установлено также появление декаплоидного эмбриона в пентаплоидной расе долгоносика в результате действия низкой температуры [51]. Развившиеся эмбрионы после криообработки (-10°C) свежееотложенных яиц *Eurudema rudos* более устойчивы к действию низких температур [48]. Как правило, образование полиплоидных форм после криовоздействия -196°C повышает криоустойчивость биообъектов [49].

После криоконсервирования меняется не только морфология, но и функция клеточного генома: криостресс (-196°C) повышает процент мутантов микроорганизмов штаммов *Siwarum* с недостаточной дыхательной активностью (с отсутствием ЦХО) и уменьшенной активностью брожения [53], индуцирует хлорофильные мутации [22]. Специально подобранные режимы криоохлаждения дрожжевых микроорганизмов индуцируют мутации с гетерозисным эффектом. Выделенный новый биохимически активный штамм дрожжей (М-12х) улучшает качество виноматериалов за счет большего синтеза эндогенных антиоксидантов, меньшего — альдегидов и летучих кислот, увеличения вязкости и поверхностного натяжения, уменьшения количества опалесцирующих веществ [18]. Получен гетерозисный криогибрид между немецким карпом и сазаном, который характеризуется скоростью роста в 2 раза большей, чем у родительских форм [17]. Следовательно, после действия низких температур и криоконсервирования изменяется морфология и функция клеточного генома.

Изменение регуляции клеточного генома. С помощью реакции Бекера с пиридиновой экстракцией нами впервые были получены уникальные данные, касающиеся содержания фосфолипидов (ФЛ): лецитинов, серинфосфатидов, сфингомиелинов в ядрах клеток костного мозга. Расшифровка их стала возможной лишь в последние годы, благодаря недавно опубликованным данным, касающимся связи ФЛ с ядерными структурами и их роли в регуляторной деятельности клеточного генома. Показано, например, что ФЛ являются постоянной составной частью хроматина, могут влиять на его функциональную активность, а связь вновь синтезированной ДНК с ядерным матриксом осуществляется через сфингомиелин [46]. Накопление сфингомиелина во внутренних структурах хроматина связывают с активацией ферментов транскрипции (РНК-полимераз I и II) и переходом свободной формы РНК-полимеразы в связанное с матрицей состояние [2]. Функциональная роль сфингомиелина в процессе репликации, по мнению авторов, заключается в его способности дестабилизировать структуру ДНК, что может облегчить расплетение двойной спирали расплетающимися белками перед репликативной вилкой. Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что ранее установленное нами увеличение содержания ФЛ в ядрах криоконсервированных клеток костного мозга и крови связано, по всей вероятности, с изменениями транскрипционной активности клеточного генома.

Известно, что процессы конденсации-деконденсации хроматина (хромосом) являются важным способом регуляции клеточного генома. Термином “конденсация-деконденсация” обозначают характер изменения плотности расположения нитей ДНК, ведущих к репрессии-депрессии генов. Конденсированный хроматин лишает гены функциональной активности, деконденсированный — ведет к включению в работу конститутивных генов и открывает возможность реализации механизмов оперонной регуляции. С помощью цитохимической реакции на *SH*-группы, располагающиеся по ходу хроматиновой сети ядра, нами впервые были получены уникальные данные, касающиеся характера упаковки хроматина в клетках криоконсервированного костного

мозга [26]. Расшифровка их стала возможной лишь в последние годы, когда стало ясно, что деконденсация хромосом может происходить при самых различных физиологических процессах, а также при возникновении многих видов заболеваний.

По нашим наблюдениям, деконденсация хроматина в размороженных клетках костного мозга, как правило, сопровождалась морфофункциональными изменениями: увеличением околядерной зоны, участвующей в образовании полисахаридного компонента мембраны будущих тромбоцитов, интенсификацией тромбоцитоотделения. Изменение процессов конденсации-деконденсации хроматина после криоконсервирования подтверждено электронно-микроскопически: отмечено просветление электронно-оптического материала в сперматозоидах, в сравнении с высококонденсированным в контроле [11], и с помощью вискозиметрии: после криоконсервирования клеток костного мозга снижается плотность суперспирализации ДНК “нуклеотидов” [5]. В ходе замораживания-оттаивания, как считают авторы, нарушаются химические связи различных структурных компонентов, которыми осуществляется компактная укладка суперспиральной ДНК в “нуклеотиде”, что, как правило, сопровождается изменениями транскрипционной активности генома клетки.

Изменение регуляции клеточного генома путем конденсации-деконденсации хроматина под действием холода — также общебиологическое явление, так как распространяется и на растительные биообъекты: под влиянием холода происходит деспирализация ДНК в гетерохроматиновых участках метафазных хромосом [9]. Примечательно, что деспирализация h сегментов метафазных хромосом при охлаждении (-12°C) связана только с функциональной активностью этих участков, так как редупликация их была полностью завершена еще в периоде S . Из сказанного выше следует, что после криоконсервирования различных биообъектов меняется регуляция клеточного генома путем изменения процессов транскрипции и конденсации-деконденсации хроматина.

Представления о том, что с помощью криоконсервирования биообъектов можно длительное время сохранять их в жизнеспособном состоянии для дальнейшей трансфузиологии и трансплантации позволило заготовить большие запасы биоматериала, а также создать банки генетически редких видов. Несмотря на достигнутые успехи и прогресс, криобиология сохранения — это прошлое и настоящее науки. В последние годы внимание исследователей все больше привлекает криобиология обновления. Первые шаги в этом направлении были предприняты нами у истоков криобиологии при исследовании вопросов сохранения гемопоэтических, репродуктивных и половых клеток с целью их трансплантации, а также вопросов лечения криоохлаждением (-196°C) инфицированных и ожоговых ран, дисфункциональных расстройств у гинекологических больных. Криобиология обновления — это настоящее и будущее этой науки. При направленном изменении морфофункциональных свойств биообъектов станет возможным получение особей с полезными признаками, что особенно важно при работе с репродуктивными (яйцеклетки) и половыми (сперматозоиды) клетками. С их помощью будут получены организмы, сверхустойчивые к различного вида неблагоприятным факторам, в том числе бактериальной микрофлоре. С этой целью путем подбора программ замораживания-оттаивания, воздействия химическими (субстраты цикла Кребса, электронно-транспортной цепи митохондрий) и физическими (магнитные поля, ультразвуковые колебания) стимуляторами обменных процес-

сов можно перевести криоконсервированные биообъекты на функционально более полноценный уровень гомеостаза. Подбором режима замораживания-оттаивания можно увеличить антибиотическую активность, например, стрептомицетов, используемых для лечения заболеваний бактериальной и вирусной этиологии в клинике, животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве.

Развитие нового направления перспективно также для решения продовольственной проблемы. Увеличивая с помощью криоконсервирования массу цианобактерий, можно повысить источник белков, витаминов, ферментов, биокорма в рационе сельскохозяйственных животных и рыб, повысить плодородие почв, стимулировать рост высших растений, получить ряд ценных биологических соединений и др. Индукцией гетерозисного эффекта в определенных режимах криоконсервирования дрожжевых микроорганизмов можно улучшить качество виноматериалов. Перенос генов холодовой адаптации и генов белков-антифризов, а также использование специально подобранных режимов криоконсервирования и активаторов обменных процессов в реабилитационном периоде повысит морозоустойчивость, термоустойчивость, радиационную устойчивость и продуктивность животных, рыб и растений.

Таким образом, можно заключить, что криоконсервирование не ограничивается возможностями сохранения, либо селекции наиболее устойчивых к различным неблагоприятным факторам биообъектов, как считали ранее. Криоконсервирование — это, прежде всего, путь к обновлению биологических структур и функций путем перевода их на качественно иной уровень гомеостаза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроненко В.А., Голосова Г.В., Полякова Л.П. и др. Влияние криоконсервирования на снижение риска посттрансфузионных осложнений, связанных с переносом вирусного гепатита и бактериальным загрязнением крови // Пробл. гематол. — 1977. — № 7. — С. 36–39.
2. Алесенко А.В. Фосфолипиды как структурные элементы ядерного матрикса в образовании комплекса ДНК-матрикс в процессе репликации // Инф. бюл. Научн. совета АН СССР по проблемам радиобиологии. — 1983. — 28. — С. 46–47.
3. Ананьина А.В. Влияние криоконсервирования на стрептомицеты — продуценты антибиотиков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1991. — 15 с.
4. Белоус А.М. Проблемы регенерации тканей при местном криовоздействии // Проблемы криобиологии. — 1992. — № 1. — С. 14–18.
5. Ващенко Т.Н., Ващенко Т.И., Петренко Г.И. и др. Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК “нуклеотидов” клеток костного мозга человека // Криобиология. — 1986. — № 1. — С. 34–38.
6. Веселовская З.Ф. Роль заднего эпителия в процессе приживления нативной и криоконсервированной роговой оболочки при кератопластике: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Одесса, 1989. — 22 с.
7. Воловельская Е.Л. Действие замораживания-оттаивания на структурно-функциональные свойства ферментов с четвертичной структурой (лактатдегидрогеназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Харьков, 1986. — 21 с.
8. Гольцев А.Н., Цуцаева А.А. Особенности течения вторичной болезни у реципиентов с трансплантатом костного мозга // Криобиология и криомедицина. — 1984. — № 18. — С. 60–65.
9. Гриф Ф.Г., Валович Е.М. К вопросу о механизме выявления гетерохроматиновых сегментов хромосом холодом // Цитология. — 1977. — 19, № 2. — С. 141–146.
10. Грищенко В.И. Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии. — М.: Медицина, 1974. — 278 с.
11. Грищенко В.И., Паращук Ю.С., Капрельянц А.С. Ультраструктура сперматозоидов человека после криоконсервации // Криобиология и криомедицина. — 1984. — № 14. — С. 50–54.
12. Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.И. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Усп. совр. биол. — 1989. — 108, № 2. — С. 299–309.
13. Елисеев Н.Н., Максимова М.В. Влияние температуры на возникновение и репарацию индуцированных радиацией повреждений у *V. Saba* и клеток китайского хомячка // Цитология и генетика. — 1975. — 9, № 3. — С. 237–242.

14. Жигун А.И. Лечение апикондилитов плеча методом криовоздействия: Автореф. дис.... канд. мед. наук. – Харьков, 1984. – 17 с.
15. Игнашева Л.П., Федотенков А.Г., Данилова Л.А. Снижение реакции трансплантата против хозяина при трансплантации криоконсервированной аллогенной кроветворной ткани // Пробл. гематол. – 1982. – № 10. – С. 34–38.
16. Исаев Ю.И. Дозированное местное охлаждение термических ожогов: Автореф. дис.... канд. мед. наук. – Харьков, 1980. – 25 с.
17. Копейка Е.Ф., Черепанов В.В., Аюшин Б.Н., Рачек Е.И. Использование криоконсервированной спермы карпов при получении товарных гибридов на теплых водах Приморской ГРЭС // 4 Всес. совещ. “Рыбхозяйственное использование теплых вод”: Тез. докл., Курчатова, 1990. – С. 145–146.
18. Котенко О.Ц., Мануев А.М., Власова О.К., Абрамов Ш.Х. Влияние сверхнизких температур на морфологические и биохимические свойства дрожжей // 2 Всес. конф. “Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических объектов: Тез. докл., Харьков, 9–11 окт. 1984 г. – Харьков, 1984. – С. 155.
19. Котляров А.С. Влияние криоконсервирования на синтез белка в микроорганизмах и перевиваемых клеточных культурах: Автореф. дис.... канд. мед. наук. – Харьков, 1991. – 19 с.
20. Ли Л.Н. Морфологические изменения межпозвоночных дисков после криовоздействия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1980. – 20 с.
21. Манин Б.Л. Кариофагацитарный механизм образования симпластов в культуре клеток ВНК-21 после воздействия глубокого холода // II Междун. конф. “Успехи современной биологии”: Тез. докл., Харьков, 21–25 апр. 1992 г. – Харьков, 1992. – С. 110–111.
22. Мануильский В.Д. Проблемы консервации генетических ресурсов растений // Криобиология. – 1987. – № 2. – С. 11–15.
23. Марценюк В.Ф. Охлаждение некоторых видов цианобактерий с различной скоростью // Влияние охлаждения на биологические объекты. – Харьков: Б. и., 1990. – С. 159–161.
24. Машанский В.Ф., Матиенко-Максимова Е.Б., Жилина З.А. и др. Явление раннего “всплеска” в структурных компонентах клетки // Изв. АН МССР. Сер. биол. и химии. – 1981. – № 4. – С. 5–16.
25. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
26. Обозная Э.И., Маркова О.П. Цитохимический анализ содержания сульфгидрильных групп в клетках криоконсервированного костного мозга // Пробл. гематол. – 1979. – № 3. – С. 21–25.
27. Обозная Э.И., Пушкарь Н.С., Маркова О.П., Панков Е.Я. Цитохимия замороженной клетки. – Киев: Наук. думка, 1981. – 176 с.
28. Обозная Э.И., Панков Е.Я. Цитохимия костного мозга при криоконсервировании. Атлас. – Киев: Наук. думка, 1989. – 256 с.
29. Панков Е.Я., Тарасенко В.И. Экспериментально-клиническое обоснование использования криовоздействия при деструктивных поражениях суставов // Междун. конф. “Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл., Харьков, 10–12 февр. – 1988 г. – Харьков: Б.и., 1988. – С. 117.
30. Сандомирский Б.П., Панков Е.Я., Шенберг М.Г. и др. Особенности заживления гнойных ран после криовоздействия // Вопросы криоконсервирования биологических объектов. – Киев: Наук. думка, 1979. – С. 92–86.
31. Сандомирский Б.П., Волкова Н.А., Журавлев А.С. и др. Механизмы криостимуляции регенерации поврежденных тканей // Криобиология. – 1985. – № 2. – С. 92–96.
32. Сафронова В.И., Новиков Н.И., Сидякина Т.М., Гюнсьва Л.М. Сравнение методов криоконсервирования и лиофилизации как способов длительного хранения клубеньковых бактерий // Микробиол. – 1991. – 60, № 2. – С. 368–375.
33. Сидякина Т.М., Сатуевич Н.И., Елисеев В.А., Калахудский Л.В. Оптимизация условий консервации штамма – продуцента элимоклавина *Clavescijas sp.* ВКМФ-2609 // Прикл. биохим. и микробиол. – 1990. – 26, № 5. – С. 709–713.
34. Сидякина Т.М., Устюжанина С.В., Новиков Н.Д. и др. Исследование оптимальных режимов консервации культуры гриба *Acremonium chrysogenum* – продуцента цефалоспоринов С // Антибиотики и химиотерапия. – 1990. – 35, № 1. – С. 11–14.
35. Симонова Л.И. Биологическая характеристика и эффективность пересадки консервированной (–196 °С) гемопоэтической ткани плодов при острой лучевой болезни в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1969. – 19 с.
36. Стрибуль Т.Ф., Лесив Т.К. Влияние криовоздействий на семена овощных культур // Криобиология. – 1990. – № 2. – С. 39–46.
37. Тихонова В.Л., Яшина С.Г., Шабаетова Э.В. Влияние замораживания семян на рост и развитие дикорастущих травянистых растений // II Междун. конф. “Успехи современной криобиологии”: Тез. докл., Харьков, 21–25 апр. 1992 г. – Харьков: Б. и., 1992. – С. 180–181.
38. Утевский А.М. Биология и криобиология обратимой остановки жизнедеятельности: регуляция и функциональный обмен // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 5–11.

39. Хенокс М.А., Першина В.П. Образование гибридных ферментов под влиянием глубокого охлаждения // Криобиология и криомедицина. – 1980. – № 7. – С. 98–101.
40. Чуйко В.А., Утевский А.М. Биохимия криоконсервированной щитовидной железы. – Киев: Наук. думка, 1985. – 216 с.
41. Шкорбатов Г.Л., Васенко А.Г. Новые данные об анабиозе у ракообразных и простейших // Вест. Харьковск. ун-та. – 1984. – 105. – С. 79–81.
42. Ashwood-Smith M.J., Fridmann W.B. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at 196 °C in dimethyl sulfoxide // Cryobiology. – 1979. – 16, № 2. – P. 132 – 140.
43. Einer G.G. Freezing of rat lymphocytes. 1. Effects of DMSO and freezing on the phytohemagglutinin and pokeweed nitrogen responding lymphocytes subpopulations // Cryobiology. – 1972. – 13, № 2. – P. 34 – 41.
44. Fujio Y., Nakajima M., Nagahuma Y. Detection of a low temperature – resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*) with reference to sex-linked inheritance // J. Genet. – 1990. – 65, № 4. – P. 201–207.
45. Martin R.H., Chernos J.E., Rademaker A.W. Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm // Mol. Reprod and Dev. – 1991. – 30, № 2. – P. 159–163.
46. Mauroli F.A., Capitanis M.G. Role of chromatin phospholipids on template availability and ultrastructure of isolated nuclei // Adv. Enzyme Reg. – 1982. – 20. – P. 247 – 262.
47. Mohapatra S.S., Wiffrain L., Poole R.J., Dhindsa R.S. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation – specific genes of alfalfa // Plant Physiol. – 1989. – 89, № 1. – P. 375 – 380.
48. Muramoto N. Notes on chromosome abnormalities and polyploidies induced by low temperature in *Eurydema rufescens* // Sensyokutai – Kromosomo. – 1983. – № 30/31. – P. 931.
49. Necas O., Kuncova S., Sladeikova A. Some observations on the mechanism of cell injury due to deep freezing // Studia Biophys. – 1986. – 112, № 1. – P. 77 – 82.
50. Rudd N.J., Hoar D.J., Williams S.E., Henning U.G. Genotype and the cryopreservation process affect the levels of aneuploidy and chromosome breakage in cultured human fibroblasts // Gemone. – 1989. – 32, № 2. – P. 196 – 202.
51. Takenouchi Y. The occurrence of a decaploid embryo in the pentaploid parthenogenetic weevil race as a result of low temperature treatment (Curculionidae coleptero) // Sensyokutai – Kromosomo. – 1983. – № 30/31. – P. 935 – 936.
52. Ven Kataraman M., Westerman M.P. Effects of cryopreservation on the mononuclear cells of patients with lung cancer and normal controls // Cryobiology. – 1987. – 24, № 2. – P. 103 – 111.
53. Welman A.M., Steward G.G. Storage of breeding yeasts by liquid nitrogen refrigeration // Appl. Microbiol. – 1973. – 26, № 4. – P. 577 – 583.

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

Поступила 30.12.92

Е.І.ОБОЗНА-ПЕЧЕНІЗЬКА, В.І.ГРИЩЕНКО, Є.Я.ПАНКОВ

КРІОБІОЛОГІЯ ОНОВЛЕННЯ: ФАКТИ І ПЕРСПЕКТИВИ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

На підставі результатів досліджень, одержаних авторами ще у 60–70 рр. і стверджених літературою останніх років, у розвитку кріобіології виділено принципово новий напрямок — кріобіологія оновлення. В основу її покладена невідома до цього часу, але реально існуюча дія, котра сприяє стимулюючому, трансформуючому (перетворюючому) і мутагенному ефектам кріоконсервування. Зроблені такі висновки: біоб'єкти, зокрема, тваринні, рослинні та дріжджові клітини, які пережили кріоконсервування, утворюють якісно нову функціонально більш повноцінну клітинну популяцію шляхом зміни морфології (тетра-, пента-, окто- і навіть анеуплоїдні хромосомні набори), функції (індукція мутацій з гетерозисним ефектом) і регуляції (зміна процесів транскрипції, конденсації–деконденсації хромосом) кліткового генома.

E.I.OBOZNAYA-PECHENEZHSKAYA, V.I.GRISHCHENKO, E.YA.PANKOV

CRYOBIOLOGY OF RENEWAL: FACTS AND PERSPECTIVES

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the Ukrainian Academy of sciences, Kharkov

Basing on the results of studies obtained by the authors in 1960–70s and verified by the recent literature data, a principally new direction has been outlined in the development of cryobiology, namely cryobiology of renewal with a favorable stimulating, transforming and mutagenic (with a heterosis effect)

actions. The following conclusions have been made: biological systems, in particular animal, plant and yeast cells surviving cryopreservation may form a qualitatively new and functionally better cell population by the way of changing the structure (tetra-, penta-, octo- and even aneuploid chromosome sets), function (induction of mutations with a heterosis effect), and regulation (changes in chromosome transcription, condensation-decondensation) of cell genome.

УДК 577.323

**С.В.Корнилова, В.С.Леонтьев, А.Г.Шкорбатов,
Ю.П.Благой, А.В.Козлов, Д.Н.Григорьев**

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДНК

Методом вискозиметрии изучено действие диметилсульфоксида (ДМСО), этиленгликоля (ЭГ) и 1,2-пропандиола (ПД) на гидродинамические и молекулярные параметры ДНК. Установлены зависимости характеристической вязкости и параметра исключенного объема ДНК от содержания криопротектора (КП) в растворе. Показано, что молекулярные параметры биополимера существенно изменяются при содержании ДМСО и ПД ~10%, а ЭГ – ~ 30%. Действие ДМСО является обратимым. Установлено также, что действие КП на ДНК тем сильнее, чем больше концентрация соли Na^+ .

Практические успехи криобиологии и, в частности, создание низкотемпературного генетического банка промысловых и редких видов рыб в значительной степени зависят от состояния изучения молекулярных механизмов действия КП на биоструктуры различного уровня организации. Исследования последних лет показали, что КП способны вызывать существенные изменения биохимических процессов при концентрациях во много раз меньших, чем применяющиеся с криозащитной целью [4–6, 10], а также могут модифицировать ДНК и изменять процессы функционирования ядра. Все это определяет актуальность изучения влияния КП на физико-химические свойства белков и нуклеиновых кислот. Следует отметить, что влияние КП на белки исследовано несколько полнее, чем действие этих соединений на нуклеиновые кислоты [1, 7, 9, 14]. Все эти исследования свидетельствуют о том, что КП способны изменять свойства нуклеиновых кислот и даже вызывать денатурацию биополимера при высокой концентрации [7, 14]. Однако имеющиеся в настоящее время в литературе исследования этих вопросов весьма малочисленны и разрозненны. Решение проблемы сохранности генетического аппарата репродуктивных клеток в криобанках требует дальнейшего всестороннего исследования механизмов действия КП на нуклеиновые кислоты. Такие исследования также необходимы для построения адекватной модели криозащитного действия этих соединений, что позволило бы синтезировать и выбирать КП с заданными свойствами, отвечающими требованиям консервируемого материала.

Настоящая работа посвящена изучению механизмов действия ДМСО, ПД и ЭГ на макромолекулярные параметры ДНК в условиях, близких к физиологическим, методом вискозиметрии.

Макромолекулы ДНК выделяли из спермы карпа по методу [12]. Характеристическую вязкость макромолекул ДНК определяли на вискозиметре Зимма-Крозерса так, как это описано ранее [3]. Исследования проводили в условиях, близких к физиологическим, в буферном растворе (0,1 М NaCl, 10^{-3} М NaAc, $pH = 6$) при комнатной температуре ($23 \pm 0,1$) °С. Молекулярную массу нативной ДНК определяли по величине $[\eta]$ [11]. Ее значения лежали в пределах $6,05 \cdot 10^7 \div 2,21 \cdot 10^7$ Да. Очистка криопротекторов проводилась в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины.

Результаты исследований влияния ДМСО и ПД, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что уже малые концентрации КП ($\sim 10\%$) существенно уменьшают величину характеристической вязкости макромолекул ДНК. Увеличение содержания как ДМСО, так и ПД до 20% приводит к уменьшению величины $[\eta]$ в 1,7 раза. Дальнейшее увеличение концентрации ДМСО и ПД (30% и выше) вызывает возрастание характеристической вязкости макромолекул ДНК, при этом в случае ПД эффект оказывается более значительным.

Зависимость характеристической вязкости ДНК от содержания ЭГ в растворе представлена на рис. 2. Как можно видеть, действие ЭГ на величину $[\eta]$ ДНК значительно отличается от влияния ДМСО и ПД (рис. 1). До концентраций порядка 30% ЭГ величина характеристической вязкости ДНК уменьшается незначительно, и только при больших концентрациях ($\sim 40\%$) наблюдается уменьшение величины $[\eta]$ в $\sim 1,6$ раза.

Полученные данные позволяют сделать вывод о более сильном влиянии ДМСО и ПД по сравнению с ЭГ на величину характеристической вязкости ДНК, а также об отсутствии эффекта возрастания величины $[\eta]$ в случае ЭГ в исследованном интервале концентраций криопротекторов.

Для изучения вопроса об обратимости действия, оказываемого КП на величину характеристической вязкости ДНК, были проведены эксперименты по отмывке ПД и ДМСО с помощью диализа. Исходная концентрация КП, добавленных к раствору ДНК, до диализа составляла 50% . Диализ проводили в течение 6 ч против буферного раствора ($0,1\text{ M NaCl}$, 10^{-3} M NaAc). В заданное время отбирали раствор ДНК+КП из диализного мешка и определяли величину характеристической вязкости. При этом измеряли концентрацию ПД и ДМСО. Полученные результаты позволили построить приблизительные графики зависимостей характеристической вязкости ДНК от содержания КП, остающегося в растворе ДНК в разное время в течение диализа. Эти данные приведены на рис. 3. Как можно видеть, действие ДМСО на характеристическую вязкость ДНК имеет обратимый характер. Пропандиол отмывается хуже, чем ДМСО, и значение $[\eta]$, соответствующее нулевой концентрации ПД (6 ч диализа), несколько завышено по сравнению с соответствующим значением $[\eta]$ для ДМСО.

Представлялось интересным изучить влияние 1,2-ПД на $[\eta]$ ДНК также в условиях меньшей ионной силы раствора ($0,01\text{ M Na}^+$). Как показали прове-

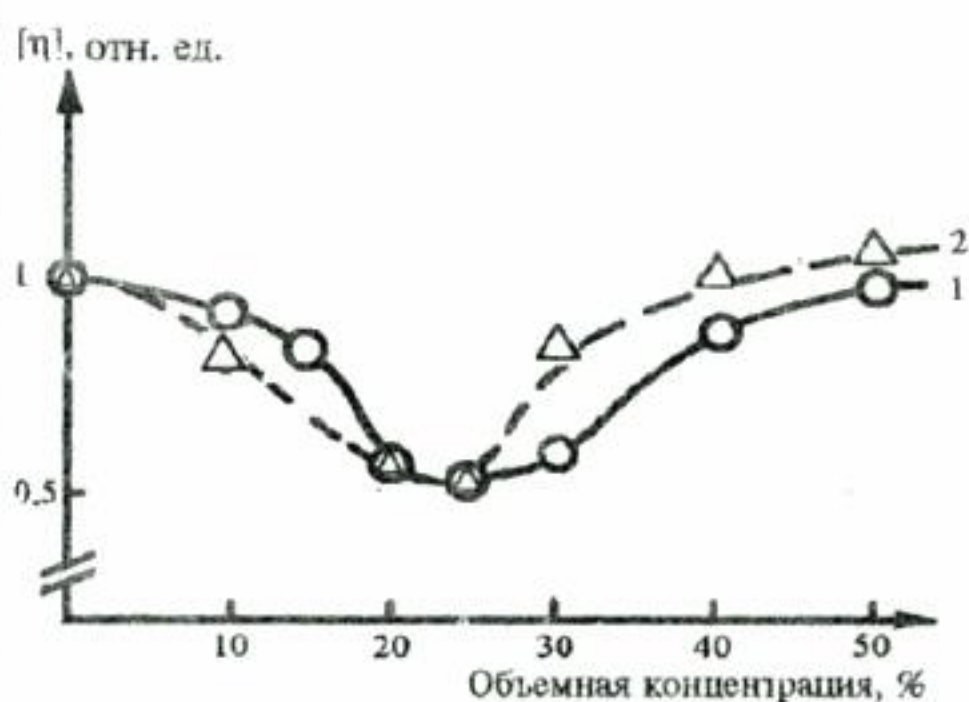


Рис. 1. Зависимости характеристической вязкости макромолекул ДНК от концентрации ДМСО (1) и ПД (2)

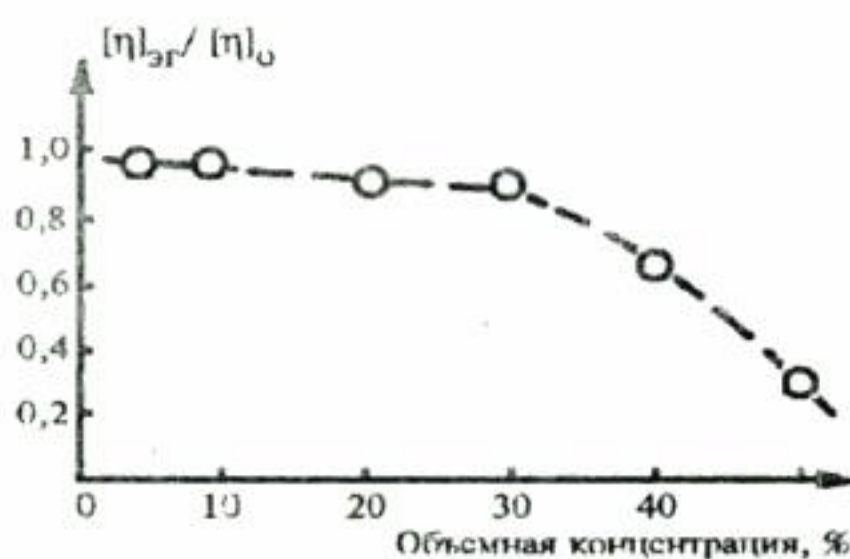


Рис. 2. Зависимость характеристической вязкости ДНК от содержания ЭГ в растворе

денные эксперименты, зависимость характеристической вязкости ДНК от концентрации ПД в этих условиях имеет такой же сложный характер, однако отличается тем, что величина $[\eta]$ в растворе $0,01 \text{ M Na}^+$ уменьшается менее интенсивно при добавлении ПД и ее минимум достигается при 30% ПД. Увеличение характеристической вязкости ДНК при увеличении концентрации

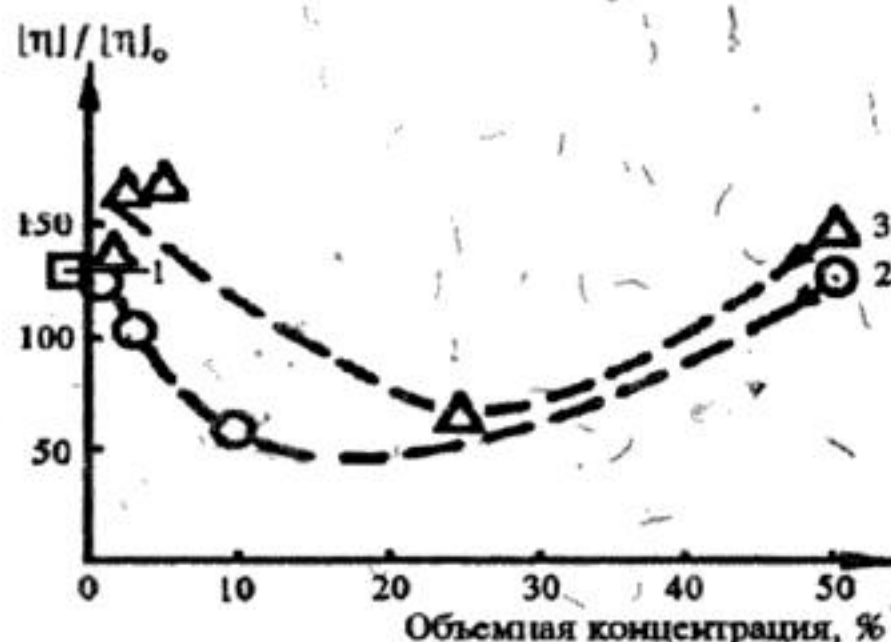


Рис. 3. Зависимости значений $[\eta]$ от концентрации КП, полученные при диализе раствора ДНК-50% КП: 1 – значение $[\eta]$ ДНК в отсутствие КП, 2 – ДМСО, 3 – ПД

пропандиола выше 30% для раствора, содержащего $0,01 \text{ M Na}^+$, идет быстрее (рис. 4). Представленные результаты свидетельствуют о зависимости влияния криопротекторов от содержания ионов, что объясняется специфичностью действия Na^+ при уменьшении ϵ' среды [2].

близкодействия, которое ответственно за величину персистентной длины a [13]. Проведенные нами эксперименты выполнены в растворе высокой ионной силы ($0,1 \text{ M Na}^+$), где взаимодействия заряженных групп в пределах статсегмента ДНК затруднены, и изменение размеров макромолекул в основном определяется эффектом исключенного объема. Это позволяет предположить, что уменьшение размеров макромолекулярного клубка ДНК, наблюдаемое при добавлении КП (рис. 1, 2), происходит в результате уменьшения параметра

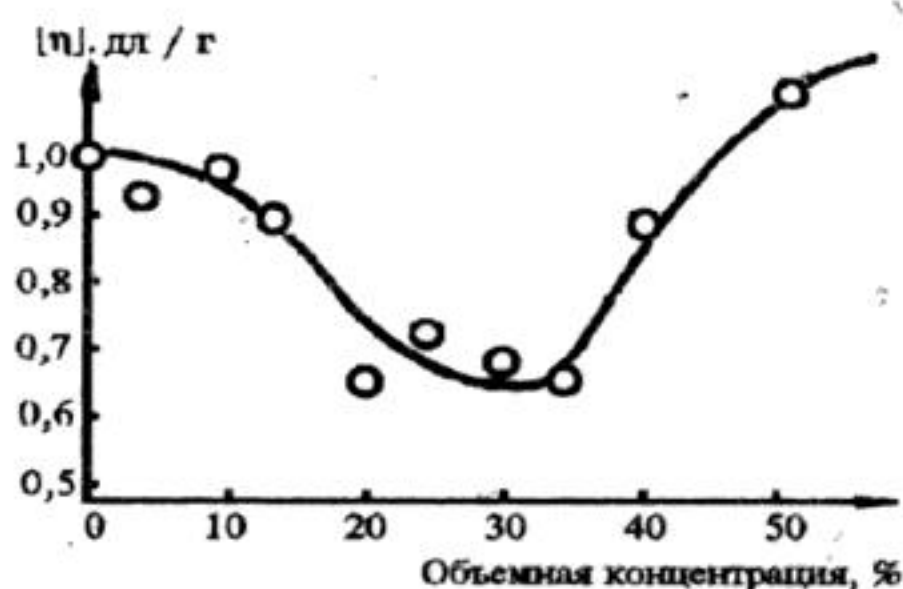


Рис. 4. Зависимость величины $[\eta]$ ДНК от концентрации 1,2-ПД при концентрации $0,01 \text{ M NaCl}$

метра исключенного объема ДНК. Такой эффект может быть обусловлен как связыванием КП с ДНК, возможно, через молекулы воды, так и изменением свойств растворителя при добавлении КП.

Полученные экспериментальные зависимости $[\eta]$ ДНК от концентрации изученных криопротекторов позволяют определить изменение параметра исключенного объема ДНК ϵ при добавлении ДМСО, ПД и ЭГ аналогично тому, как это выполнено в работе [13]. Полученные зависимости параметра исключенного объема ДНК от концентрации криопротекторов приведены на рис. 5. Видно, что значения параметра ϵ лежат в интервале 0–0,2, что согласуется с теоретическими расчетами возможных значений этого параметра для макромолекул ДНК [13].

Сложный характер зависимости величины $[\eta]$ и ϵ от концентрации ДМСО и ПД обусловлен тем, что добавление криопротектора сопровождается двумя эффектами: возрастанием констант связывания ионов металлов с ДНК

при понижении активности воды и увеличением диэлектрической проницаемости раствора (ϵ') [2,9]. Поэтому поведение $[\eta]$ ДНК определяется в случае высокой ионной силы раствора конкуренцией двух процессов: подавления дальних электростатических взаимодействий в цепи ДНК за счет активизации связывания ионов металла (Na^+) с макромолекулой и увеличения эффективности электростатического внутримолекулярного взаимодействия при уменьшении ϵ' раствора.

Анализ рассматриваемых зависимостей осложняется еще и тем, что данные дифференциальной УФ-спектроскопии свидетельствуют в пользу структурной перестройки ДНК в присутствии КП [8]. Так, установлено, что при концентрациях ДМСО, ПД и ЭГ меньших 35% величина гиперхромизма спектра поглощения ДНК (h) при волновом числе, соответствующем максимуму изменения поглощения ($\nu=38$ кК), является линейной функцией объемной концентрации криопротекторов. При этом изменение поглощения обусловлено дегидратацией ДНК, а также структурными превращениями, приводящими к уменьшению термостабильности биополимера при сохранении двойной спирали. При концентрациях КП больше 35% величина h в присутствии ЭГ не изменяется, а в случае ДМСО и ПД наблюдается ее возрастание, что, возможно, свидетельствует о плавлении макромолекул ДНК [8]. Вывод о плавлении структуры РНК при добавлении ДМСО сделан также в работе [14], выполненной методами УФ-спектроскопии, термической денатурации и дисперсии оптического вращения.

Результаты работы [8] свидетельствуют о том, что ~15% пар оснований ДНК претерпевают конформационный переход при концентрациях КП = 40%. В сочетании с наблюдаемым увеличением характеристической вязкости растворов ДНК при концентрациях КП > 30% данные УФ-спектроскопии можно интерпретировать как свидетельство структурной перестройки ДНК, которая не сводится к частичной денатурации (денатурация сопровождалась бы падением характеристической вязкости в десятки раз). Можно предположить, что при изученных концентрациях КП происходит их интенсивное связывание с гидратной оболочкой ДНК, при котором двухспиральная структура ДНК сохраняется.

Суммируя результаты настоящей работы, можно заключить, что присутствие таких криопротекторов, как ДМСО и 1,2-ПД даже в небольших концентрациях (~10%) заметно меняет молекулярные параметры макромолекул ДНК. Для этиленгликоля такие изменения наблюдаются при больших концентрациях (>20%). Действие ДМСО является обратимым, в то время как влияние 1,2-ПД характеризуется заметной, но слабой необратимостью. Установлено, что криопротекторы усиливают действие ионов Na^+ на молекулярные параметры ДНК. Наблюдаемые относительно небольшие изменения характеристической вязкости ДНК позволяют сделать вывод о том, что струк-



Рис. 5. Зависимости параметра исключенного объема ДНК ϵ от концентрации ДМСО (1) и 1,2-ПД (2, 3) при 0,1 М Na^+ и 0,01 М Na^+ соответственно. Значения ϵ вычислены по отношению к точкам с наименьшей характеристической вязкостью

турные перестройки макромолекул в присутствии криопротекторов не сопровождаются существенной денатурацией ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток. – Киев: Наук. думка, 1986. – 180 с.
2. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О. и др. Комплексы нуклеиновых кислот в растворах. – Киев: Наук. думка, 1991. – 272 с.
3. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Сохан В.И. Изучение изменения характеристической вязкости ДНК при взаимодействии с Cu^{2+} и Mn^{2+} // Мол. биол. – 1982. – 6, № 1. – С. 210–216.
4. Ващенко Т.Н., Ващенко В.И., Петренко Г.И. и др. Влияние криоконсервирования на топологические переходы суперспиральной ДНК “нуклеоидов” клеток костного мозга человека // Криобиология. – 1986. – № 1. – С. 34–38.
5. Глазер В.М., Лучник А.Н. Изменение топологического числа сцепления замкнутых петель ДНК при дифференцировке клеток мышины эритролейкемии // Докл. АН СССР. – 1980. – 250, № 5. – С. 1247–1250.
6. Грищенко В.И. Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины // Междунар. конф. “Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины”: Тез. докл. – Харьков, ИПКиК АН УССР, 1988. – С. 4.
7. Зенгер В. Принципы организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987. – С. 193–207.
8. Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Шкорбатов А.Г. и др. Структурные изменения ДНК при криоконсервации // II Междунар. конф. “Успехи современной криобиологии”: Тез. докл., Харьков, 21–25 апр. 1992 г. – Харьков: ИПКиК АН Украины, 1992. – С. 87.
9. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 20 с.
10. Чуйко В.А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология. – 1989. – № 1. – С. 3–10.
11. Crothers D., Zimm B. Viscosity and sedimentation of DNA from bacteriophages T2 and T7 and the relation to molecular weight // J. Mol. Biol. – 1965. – 12. – P. 525–536.
12. Key E.R., Simmons N.S., Dounce H.Z. An improved preparation of sodium desoxyribonucleate // Amer. Chem. Soc. – 1952. – 74. – P. 1724.
13. Kornilova S.V., Blagoy Yu. P., Shkorbatov A.G. On interaction between DNA and biometal ions. Variations of structural and macromolecular parameters // Macromol. Chem. – 1990. – 191. – P. 869–880.
14. Strauss G.H., Kelly R.B., Sinsheimer R.L. Denaturation of RNA with dimethyl sulfoxide // Biopolymers. – 1968. – 6. – P. 793–807.

Физико-технический ин-т низких температур
АН Украины, г. Харьков

Поступила 09.02.93

С.В.КОРНИЛОВА, В.С.ЛЕОНТЬЕВ, О.Г.ШКОРБАТОВ, Ю.П.БЛАГОЙ, О.В.КОЗЛОВ,
Д.М.ГРИГОР'ЄВ

ВИВЧЕННЯ ДІЇ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНІ ПАРАМЕТРИ ДНК

Фізико-технічний інститут низьких температур АН України, м.Харків

Методом віскозиметрії вивчено дію диметилсульфоксиду (ДМСО), етиленгліколя (ЕГ) і 1,2-пропандіола на гідродинамічні і молекулярні параметри ДНК. Встановлені залежності характеристичної в'язкості і параметра виключеного об'єму ДНК від вмісту криопротектора (КП) у розчині. Показано, що молекулярні параметри біополімера істотно змінюються при вмісті ДМСО і пропандіола 10, а ЕГ – 30%; дія ДМСО є зворотною. Встановлено також, що дія КП на ДНК тим сильніша, чим більша концентрація солі Na^+ .

S.V.KORNILOVA, V.S.LEONTYEV, A.G.SHKORBATOV, YU.P.BLAGOY, A.V.KOZLOV
D.N.GRIGORYEV

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON DNA MACROMOLECULAR PARAMETERS

B.I.VERKIN Physico-technical Institute of low temperatures of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

The effect of dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) and 1,2-propanediol (PD) on the DNA hydrodynamic and molecular parameters were studied by the method of viscosimetry. The

dependences of the intrinsic viscosity and the DNA excluded volume parameter on the cryoprotectant concentration have been determined. It has been shown that molecular parameters of biopolymer changed markedly at a concentration of DMSO or PD nearly 10%, and EG nearly 30%. The effect of DMSO appeared to be reversible. It has been found also that the effect of cryoprotectant on DNA increased with increasing the Na^+ salt concentration.

УДК 577.37

**Е.А.Гордиенко, И.Ф.Коваленко, Л.Ф.Розанов,
Е.И.Смолянинова**

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ХЛОРИСТОГО НАТРИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЫШИ ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ

Изучено влияние концентрации хлористого натрия в среде эквilibрации на транспортные характеристики плазматических мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши. Показано, что коэффициент проницаемости для молекул воды L_p не имеет постоянного значения и зависит от концентрации электролита в окружающей клетку среде. Отклонение концентрации электролита от физиологического значения приводит к десятикратному увеличению коэффициента фильтрации, что ограничивает возможность моделирования процесса обезвоживания, исходя из уравнения линейной неравновесной термодинамики.

Изменение относительного объема клетки $y = V/V_0$ в растворе непрони-
кающего вещества описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[(1 - \alpha) / (y - \alpha) - \pi_\infty \right], \quad (1)$$

где t – время, α – объемная доля осмотически неактивных внутриклеточ-
ных веществ, $\pi_\infty = \pi'_\infty / \pi_0^{in}$, π'_∞ – осмотическое давление внеклеточного рас-
твора (предполагается, что объем клетки пренебрежимо мал по сравнению с
объемом внеклеточного раствора), π_0^{in} – осмотическое давление физиологиче-
ского раствора, $\tau_0 = (X_0 L_p \pi_0^{in})^{-1}$, X_0 – поверхностно-объемное отношение
клетки в исходном состоянии, L_p – коэффициент фильтрации клеточной мем-
браны. Решение (1) есть

$$1 - y - \frac{1 - \alpha}{\pi_\infty} \ln \frac{1 - \alpha - \pi_\infty (y - \alpha)}{1 - \alpha - \pi_\infty (1 - \alpha)} = \frac{t}{\tau_0} \pi_\infty. \quad (2)$$

Экстремальное (или асимптотическое) значение относительного объема
клетки, очевидно, равно:

$$y_m = \alpha + \frac{1 - \alpha}{\pi_\infty}, \quad (3)$$

так что параметр α можно вычислить, определяя в эксперименте y_m при
заданном значении π_∞ . Комбинируя (2) с (3), получаем неявную зависимость

$$1 - y - \frac{1 - y_m}{\pi_\infty - 1} \ln \frac{y - y_m}{1 - y_m} = \frac{t}{\tau_0} \pi_\infty. \quad (4)$$

Для произвольного момента времени T из (4) следует:

$$\tau_0 = \frac{T \pi_\infty}{1 - y(T) - \frac{1 - y_m}{\pi_\infty - 1} \ln \frac{y(T) - y_m}{1 - y_m}}$$

или

$$L_p = \frac{\left[1 - y(T) - \frac{1 - y_m}{\pi_\infty - 1} \ln \frac{y(T) - y_m}{1 - y_m} \right] D}{6 \pi_0^{in} \pi_\infty T}, \quad (5)$$

Таким образом, по известным из эксперимента зависимостям $y(t)$ в гипотоническом или гипертоническом растворе хлористого натрия при заданном значении π_∞ и известном из эксперимента начальном диаметре клетки D можно вычислить коэффициент проницаемости мембран яйцеклеток мыши (и эмбрионов на ранних стадиях дробления) для молекул воды и объемную долю осмотически неактивных внутриклеточных веществ по формулам (5) и (3).

После помещения яйцеклетки (эмбриона) в гипотонический или гипертонический раствор хлористого натрия заданной концентрации под микроскопом кинематографически с частотой 1 кадр/3 с регистрировалось ее изображение (рис. 1). Затем методом взвешивания "фотографических изображений" определялась кинетика изменения площади проекции клетки. Типичные графики изменения размера клетки со временем в гипо- и гипертоническом растворе соответственно представлены на рис. 2 и 3.

Результаты экспериментов при 22°C ($pH = 7,6$) (по пять в каждой точке)



Рис. 1. Изменение площади изображения бластомеров двухклеточного эмбриона мыши в процессе экспозиции с 0,45%-м раствором хлористого натрия: 1 — 0 мин, 2 — 1,5 мин, 3 — 10 мин, 4 — 40 мин

представлены в таблице, из которой следует, что коэффициент проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды не имеет постоянного значения, а зависит от концентрации электролита в окружающей клетку среде — отклонение концентрации электролита от значения, которое имеется в норме, приводит к десятикратному увеличению коэффициента фильтрации. Это обстоятельство ограничивает возможность моделирования процесса обезвоживания или оводнения клеток, исходя из уравнений линейной неравновесной термодинамики. По-видимому, повышение

или понижение концентрации соли само по себе (вне связи с осмотическим эффектом) приводит к модификации транспортных характеристик мембран. Об этом свидетельствует и тот факт, что в некоторых случаях при концентрациях внеклеточного хлористого натрия 1 М и выше стационарное значение объема клетки сохранялось лишь в течение 10–30 мин, после чего объем клетки начинал увеличиваться (рис. 2). Наиболее простое объяснение этого явления заключается в том, что после длительной экспозиции яйцеклеток и эмбрионов мыши в растворах с повышенным содержанием хлористого натрия их мембраны утрачивают свойство избирательной проницаемости — мембрана становится проницаемой для соли. Стадия дробления (одно- или двухклеточный эмбрион) статистически достоверно не влияет на величину водной проницаемости мембран бластомеров.

Объемная доля осмотически неактивных веществ в клетках, по нашим данным, составляет около 50%. По мере роста концентрации внеклеточной соли объем осмотически неактивных веществ внутри клетки проявляет тенденцию к уменьшению. Большое содержание в исследуемых клетках осмотически неактивных веществ, вероятно, связано с накоплением в них изолированных компартаментов.

Характерной особенностью, которую иллюстрирует рис. 3, является уменьшение клеточного объема после достижения им максимального (при-

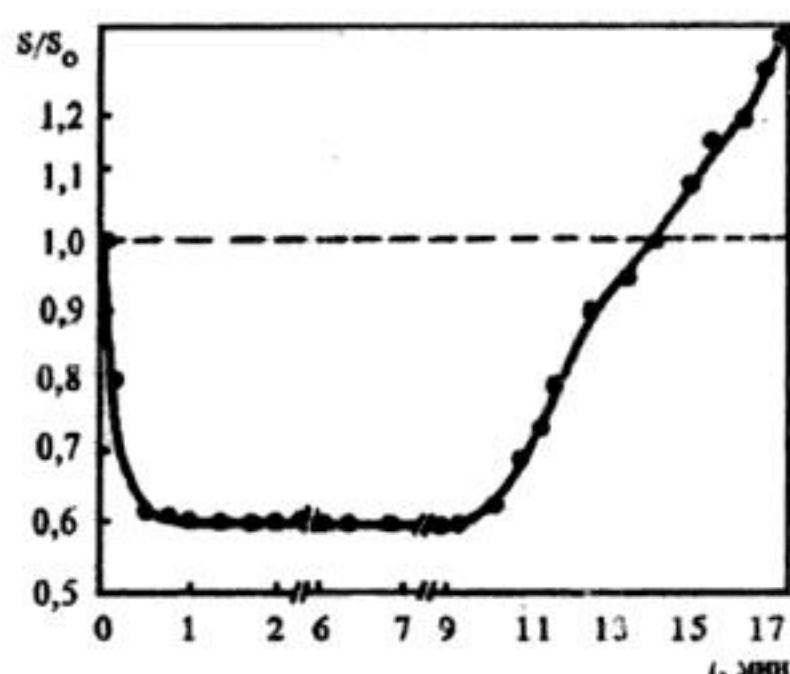


Рис. 2. Кинетика изменения площади изображения одноклеточного эмбриона мыши после контакта с водным раствором хлористого натрия (концентрация 1 М)

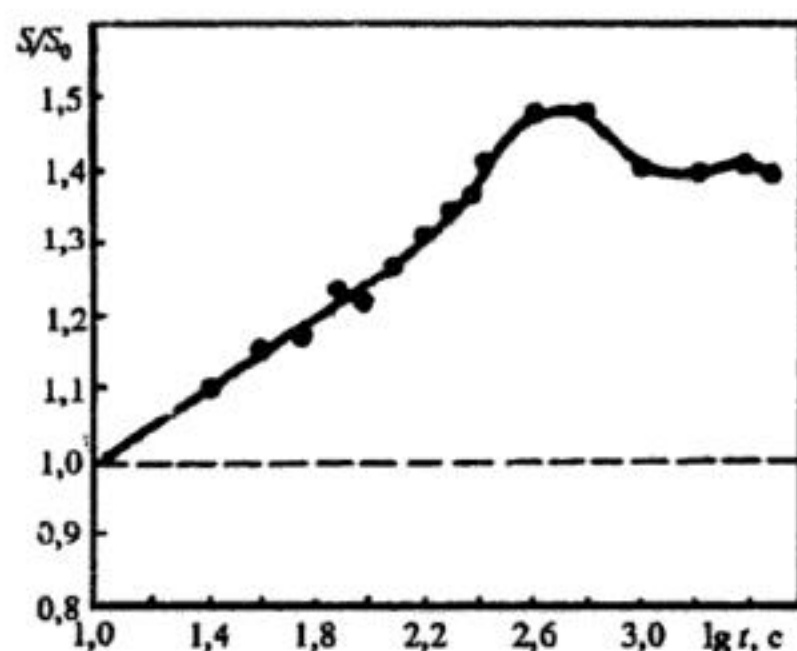


Рис. 3. Кинетика изменения площади изображения бластомера двухклеточного эмбриона в 0,45 %-м растворе хлористого натрия

мерно $1,45 V_0$) значения. Авторы считают, что указанная особенность является следствием утечки части внутриклеточного содержимого через макроскопическую мембранную пору, к образованию которой приводит изотропное растяжение мембраны по механизму, описанному в работе [1].

Численные значения клеточных параметров (L_p , α) в зависимости от концентрации внеклеточного раствора NaCl

Относительное осмотическое давление внеклеточного раствора хлористого натрия, π_∞	Объемная доля осмотически неактивных веществ в клетке, α	Коэффициент фильтрации клеточной мембраны, $L_p \cdot 10^{11} \text{ м}^3/\text{Нс}$
0,50	0,55	$72,50 \pm 10,1$
4,00	$0,56 \pm 0,05$	$4,12 \pm 0,43$
5,33	$0,56 \pm 0,03$	$17,70 \pm 2,00$
6,60	$0,55 \pm 0,05$	$24,10 \pm 3,10$
8,00	$0,52 \pm 0,04$	$29,80 \pm 5,40$
10,00	$0,51 \pm 0,03$	$40,00 \pm 7,60$
13,30	$0,48 \pm 0,02$	$51,40 \pm 30$

Анализ полученных зависимостей объема клеток от времени показывает, что площадь мембраны яйцеклетки или эмбриона может увеличиться в полтора раза без возникновения изотропного растяжения. Это явление можно объяснить тем, что около трети площади клеточной мембраны запасено в виде микроскладок, а это в свою очередь, вероятно, функционально обусловлено потенциальной готовностью клеток к последующему делению.

С учетом того, что в процессе обезвоживания или оводнения форма исследуемых клеток остается приблизительно сферической (это, вероятно, обусловлено возможностью образования, изменения числа и размера мембранных микроскладок), уточненная модель исследуемого процесса принимает вид:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{3\tau_0} y^{2/3} [(1 - \alpha) / (y - \alpha) - \pi_\infty], \quad (6)$$

Решение уравнения (6) есть

$$1 - y^{1/3} + \frac{1 - \alpha}{\pi_\infty} \left\{ \frac{1}{6 W^{2/3}} \ln \frac{(W^{1/3} - 1)^2 (W^{2/3} + W^{1/3} y^{1/3} + y^{2/3})}{(W^{2/3} + W^{1/3} + 1)(W^{1/3} - y^{1/3})^2} + \right. \\ \left. + \frac{1}{\sqrt{3} W^{2/3}} \left[\operatorname{arctg} \frac{2y^{1/3} + W^{1/3}}{W^{1/3}} - \operatorname{arctg} \frac{2 + W^{1/3}}{\sqrt{3} W^{1/3}} \right] \right\} = \frac{t}{3\tau_0} \pi_\infty, \quad W = y_m. \quad (7)$$

Проведенные расчеты показывают, что уточненные решения (7) незначительно отличаются от решений приближенного уравнения (4), таким образом, приближенная модель (1) вполне приемлема для практического измерения водной проницаемости мембран яйцеклеток и эмбрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов // Криобиология. - 1986. - № 2. - С. 23-25.

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

Поступила 11.12.91

Є.О. ГОРДІЄНКО, І.Ф. КОВАЛЕНКО, Л.Ф. РОЗАНОВ, Є.І. СМОЛ'ЯНИНОВА

ВПЛИВ КОНЦЕНТРАЦІЇ ПОЗАКЛІТИННОГО ХЛОРИСТОГО НАТРІЯ НА ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН ЯЙЦЕКЛІТИН І ЕМБРІОНІВ МИШІ ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків

Вивчено вплив концентрації хлористого натрія в середовищі еквілібрації на транспортні характеристики плазматичних мембран яйцеклітин і ембріонів миші. Показано, що коефіцієнт проникності для молекул води L_p не має постійного значення і залежить від концентрації електроліта в оточуючому клітину середовищі. Відхилення концентрації електроліта від фізіологічного значення призводить до десятикратного збільшення коефіцієнта фільтрації, що обмежує можливість моделювання процесу обезвожування, виходячи з урівнення лінійної нерівновісної термодинаміки.

E.A.GORDIYENKO, I.F.KOVALENKO, L.F.ROZANOV, E.I.SMOLYANINOVA

THE EFFECT OF EXTRACELLULAR SODIUM CHLORIDE CONCENTRATION ON THE PERMEABILITY OF MOUSE OOCYTE AND EMBRYO MEMBRANES TO WATER MOLECULES

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

The effect of sodium chloride concentration in the equilibration medium on the transport characteristics of mouse oocytes and embryo plasma membranes were studied. It has been shown that the permeability coefficient L_p is unstable and depends on the electrolyte concentration in the cell environment. The electrolyte concentration other than the physiological one leads to a 10-fold increase in filtration coefficient that restricts the possibility of modeling the dehydration process using the equation of linear nonequilibrium thermodynamics.

Н. П. Суббота**ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ
ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА**

Изучено состояние биоэнергетических процессов в митохондриях, изолированных из печени плодов человека 18–26 недель внутриутробного развития. Установлено, что характер криоповреждений митохондрий в изученные сроки развития плодов однотипен и заключается в увеличении скорости окисления субстратов, угнетении активности электронтранспортной цепи, снижении сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, снижении мембранного потенциала, уровня восстановленности пиридиннуклеотидов. Глубина криоповреждений определяется интенсивностью функционирования исследованной системы в изученные сроки развития плодов, а также скоростью замораживания, видом и концентрацией присутствующего в среде криопротектора.

Разработка методов низкотемпературного консервирования клеточных суспензий, имеющих перспективы клинического использования, требует глубокого и всестороннего изучения механизма криоповреждений мембранных структур клеток и физико-химических систем регуляции [4].

Клиническое использование изолированных из печени животных и человека гепатоцитов, несмотря на доказанную их эффективность, еще довольно ограничено, что связано с отсутствием данных о морфофункциональном состоянии основных систем клеток разных сроков развития. Это в известной мере лимитирует разработку эффективных методов криоконсервирования и длительного хранения клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки и характеризующихся различной степенью функционирования важных для клинического использования систем.

Наиболее широко используемым экспериментальным подходом к выяснению особенностей и характера криоповреждений клеток является изучение криоповреждений мембран и мембранных структур клеток–митохондрий, поскольку именно с ними связаны основные специфические функции печени – биосинтез желчных кислот и процессы детоксикации, реакции аминокислотного, липидного и нуклеотидного обменов. Вместе с тем известно, что нарушения функционирования митохондрий достаточно для гибели клетки, так как в этих органеллах локализована система генерации энергии. Учитывая роль мембранных энергообразующих систем в выяснении особенностей криоповреждений гепатоцитов, в настоящей работе исследовали механизмы криодеструкции митохондрий, полученных из печени плодов человека разных сроков развития, сосредоточив основное внимание на зависимости криочувствительности системы биоэнергетики в цикле замораживания–отогрева от сроков развития плодов.

Митохондрии выделяли посредством дифференциального центрифугирования из печени плодов человека, полученных в результате абортов поздних сроков по медицинским показаниям в отделении патологии беременности 1-й Городской больницы г. Харькова. Дыхательную активность митохондрий определяли полярографическим методом, как описано в работе [2], при окислении глутамата+малата или сукцината. В качестве показателей прочности сопряжения процессов дыхания и окислительного фосфорилирования измеряли дыхательный контроль (ДК) по Ларди и Вэлману: отношение скорости дыхания с субстратом и адениндинуклеотидфосфатом (АДФ) (состояние 3) к скорости дыхания с субстратом (состояние 2). Мембранный потенциал оцени-

вали по флуоресценции потенциалзависимого зонда-катиона ДСМ⁺ (*n*-диметил-амино-метил-пиридиний), как описано в работе [2]. Структурные перестройки в липидной фазе замороженно-отогретых и нативных митохондриях измеряли, используя флуоресцентный зонд пирен [1], а уровень восстановления пиридиннуклеотидов – по [5]. Митохондрии замораживали одноэтапно со скоростью 200–300 °С/мин погружением полиэтиленовых ампул с суспензией органелл в жидкий азот (режим I) и сверхбыстро, с максимальной достигаемой в настоящее время скоростью при использовании устройства, разработанного сотрудниками Института проблем криобиологии и криомедицины АН Украины (режим II) [3]. При двухэтапном замораживании скорость на первом этапе составляла 1 °С/мин до –60 °С, после чего пробы быстро погружали в жидкий азот (–196 °С). Объем суспензии при всех апробированных скоростях не превышал 3,0 мл. Пробы отогревали на водяной бане при 37 °С. Белок измеряли по Лоури, а статобработку проводили по Фишеру-Стьюденту. Использовались криопротекторы диметилсульфоксид (ДМСО) и глицерин в концентрации 3 и 10% соответственно.

В таблице представлено изменение функционального состояния нативных и замороженно-отогретых митохондрий печени при окислении субстратов. Показано, что скорость окисления сукцината в нативных митохондриях с увеличением сроков развития уменьшается, дыхательная активность в состоянии 3 – не изменяется, а ДНФ-стимулируемое дыхание и прочность сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования – увеличиваются. Окисление глутамата+малата контрольными митохондриями происходит с более низкими скоростями, чем сукцината, однако, как и при окислении сукцината, в процессе развития увеличиваются максимальная активность дыхательной цепи и сопряженность дыхания и окислительного фосфорилирования.

Активность дыхательной цепи митохондрий печени плодов человека разных сроков развития в норме и после замораживания (скорости даны в мкМ О₂/мг белка/мин) *n*–5–6

Субстрат окисления	Сроки развития плодов, недели	Контроль				Замораживание (200–300 °С/мин)			
		Состояние 2	Состояние 3	+ДНФ	ДК	Состояние 2	Состояние 3	+ДНФ	ДК
Сукцинат	20	10,0±0,2	15,0±0,22	25,0±1,2	1,5±0,2	7,0±0,18*	7,0±0,18*	12,0±0,3*	1,0±0,07*
	21–22	10,2±0,25	16,0±1,8	27,0±1,4	1,6±0,07	8,3±0,3*	8,7±0,22*	13,1±0,32*	1,1±0,08*
	25–26	7,6±0,17°	15,2±0,18	25,0±1,3	2,0±0,10°	7,2±0,16*	11,0±0,26*	12,5±0,27*	1,5±0,1*
Глутамат+малат	20	4,0±0,10	5,0±0,10	8,2±0,15	1,2±0,04	3,0±0,15*	3,0±0,10*	4,6±0,1*	0,9±0,10*
	21–22	4,1±0,14	4,8±0,16	8,6±0,2	1,15±0,05	3,1±0,1*	3,2±0,12*	4,6±0,18*	1,0±0,07
	25–26	3,1±0,13	7,4±0,20	9,2±0,21	2,4±0,08	3,0±0,1	4,4±0,18*	4,7±0,2*	1,5±0,06*

Примечание. * – *p*<0,05 между контролем и опытом, ° – *p*<0,05 в контроле в зависимости от сроков развития.

В замороженно-отогретых митохондриях (режим I) 20–22 недель окисление сукцината несколько угнетается, а в более поздние сроки не отличается от величин, полученных в нативных органеллах. Угнетение дыхательной активности в состоянии 3 при этом характерно для митохондрий всех исследованных сроков развития. Митохондрии 20–24 недель после замораживания характе-

ризуются разобщением процессов дыхания и фосфорилирования, а в 26 недель эти процессы сопряжены (табл.).

Окисление глутамата+малата замороженно-отогретыми митохондриями 20–22 недель внутриутробного развития плодов, как и при окислении сукцината, происходило с более низкими скоростями, а в более поздние сроки – не

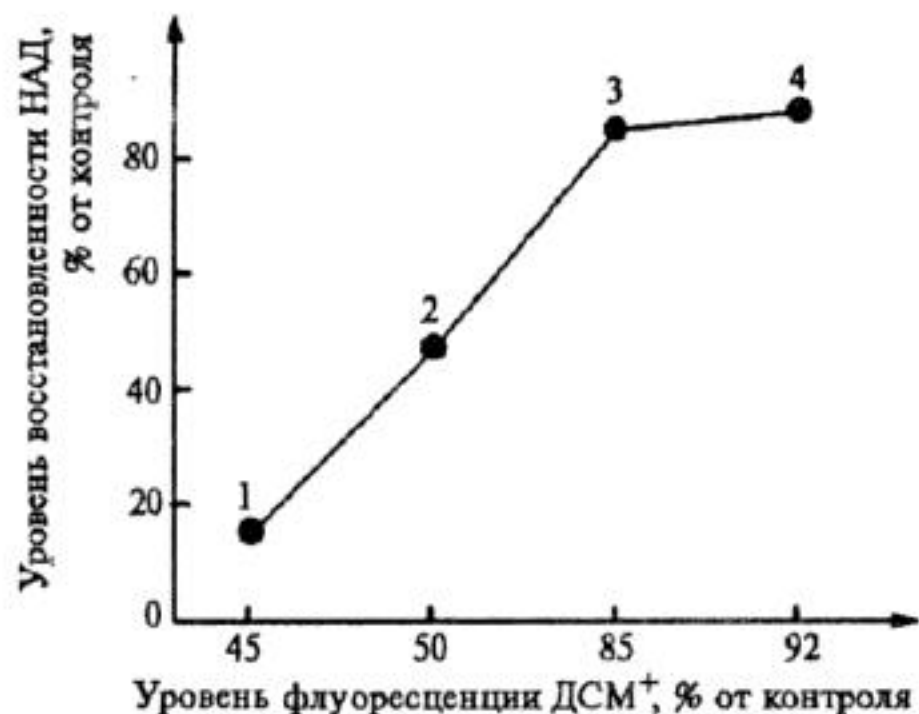


Рис. 1. Соотношение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов и мембранного потенциала в криоконсервированных митохондриях печени плодов человека разных сроков (недели) внутриутробного развития: 1 – 18, 2 – 20, 3 – 22, 4 – 26

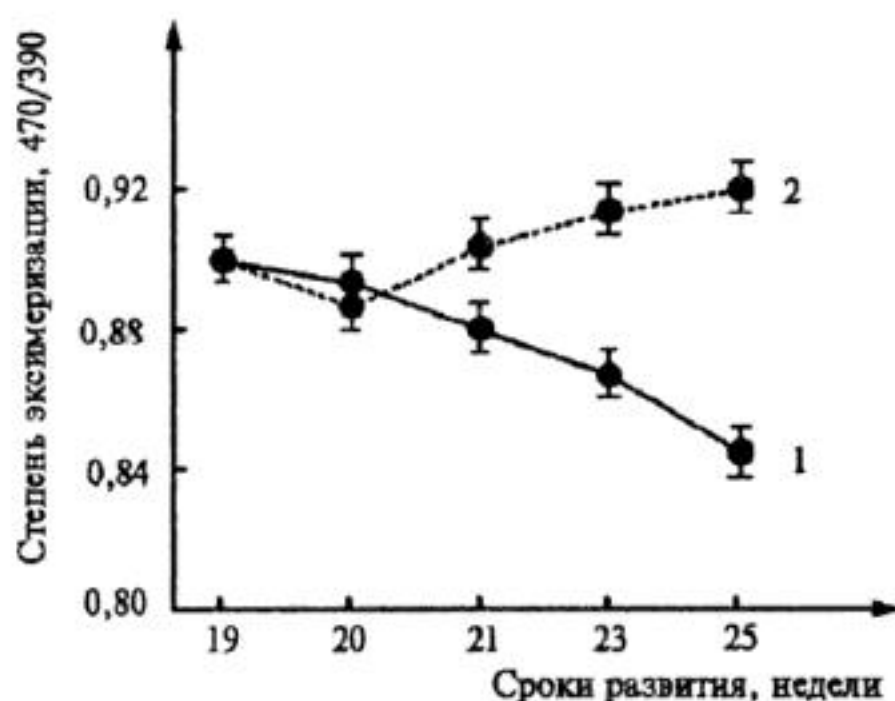


Рис. 2. Степень эксимеризации пирена в нативных и замороженно-отогретых митохондриях печени плодов разного срока развития: 1 – К 470/К390, 2 – БЗ 470/БЗ390

отличалось от контрольных величин. Дыхание в состоянии 3 было угнетено во все исследованные сроки развития плодов. В замороженно-отогретых митохондриях плодов 20–22 недель развития процессы дыхания и окислительного фосфорилирования были разобщены, а в 25–26 недель этот параметр сохранялся на уровне 62% от контрольного. В срок 10 недель интенсивность флуоресценции ДСМ⁺ в замороженно-отогретых митохондриях снижалась в 2 раза, а в 22–24–26 недель в среднем на 20% (рис. 1).

После деконсервации митохондрий наблюдалось резкое снижение уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, особенно выраженное в более ранние сроки развития. Снижение уровня восстановленности НАД коррелировало с уменьшением прочности сопряженности дыхания и фосфорилирования при окислении НАД-зависимых субстратов, уменьшением мембранного потенциала (рис. 1). Степень эксимеризации пирена, характеризующая изменение состояния структуры митохондрий при контроле скорости латеральной диффузии его молекул в липидной фазе бислоя, снижалась в процессе развития плодов, а после замораживания-отогрева увеличивалась, свидетельствуя об уменьшении микровязкости липидного бислоя мембран замороженно-отогретых митохондрий, поскольку образование эксимеров происходит только в жидкой мембране (рис. 2).

Таким образом, митохондрии, выделенные из печени плодов человека разного срока развития, характеризовались различной степенью крионарушений параметров системы биоэнергетики. Митохондрии печени плодов человека более ранних сроков развития (19–20 недель) повреждались при этом в большей мере, чем органеллы более поздних сроков развития. Характер крионарушений митохондрий всех изученных сроков развития плодов был одинаков и выражался в угнетении дыхательной активности в состоянии 3, разобщении или снижении прочности сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, резком угнетении ДНФ-стимулируемого дыхания, свидетельствующем о повреждении электротранспортной цепи ми-

тохондрий, снижении уровня восстановленности пиридиннуклеотидов, мембранного потенциала и уменьшении микровязкости липидного бислоя.

Присутствие в среде замораживания митохондрий ДМСО или глицерина в 10%-й концентрации при использовании режима I было мало эффективно, так как не предотвращало крионарушений биоэнергетических параметров митохондрий. Несмотря на то, что в присутствии криопротекторов дыхание в состоянии 3 угнеталось в замороженно-отогретых митохондриях всех сроков в

меньшей мере, чем в среде без криопротектора, сопряженность процессов дыхания и окислительного фосфорилирования сохранялась лишь в митохондриях 25–26 недель.

Интересным оказался полученный в процессе исследований вывод о неэффективности использования с целью криоконсервации митохондрий сверхбыстрых скоростей замораживания в присутствии 3%-го ДМСО или глицерина, хотя этот режим был эффективен при криоконсервации гепатоцитов. Степень и характер нарушений биоэнергетических параметров митохондрий в присутствии ДМСО не отлича-

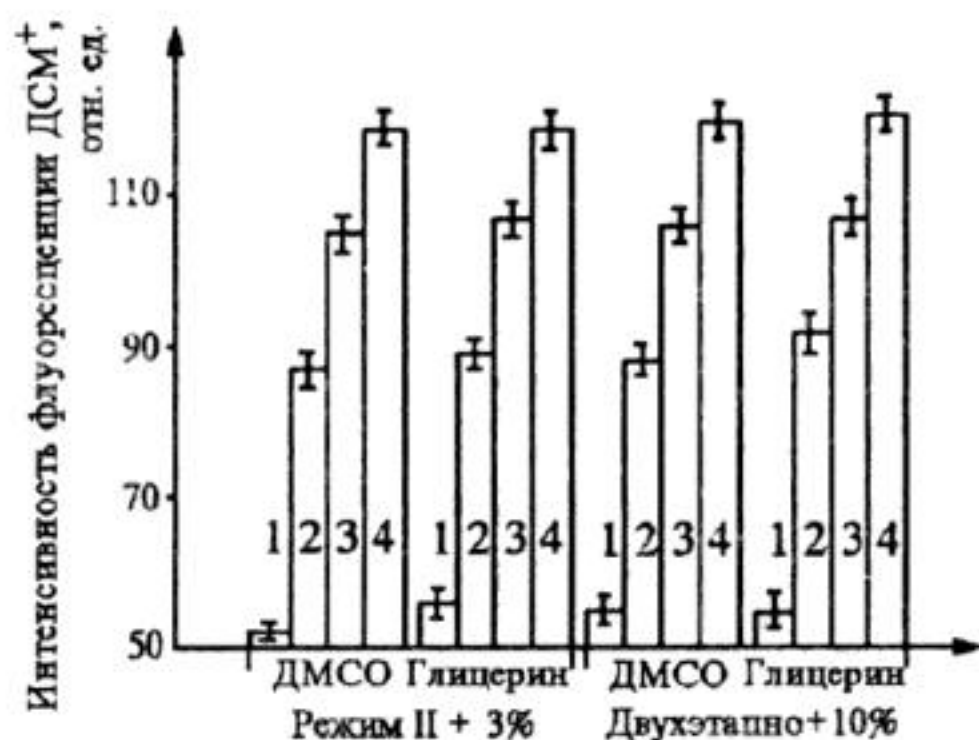


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции ДСМ⁺ в замороженно-отогретых митохондриях печени плодов человека при различных режимах замораживания: 1 – 18–20 недель, 2 – 21–22 недели, 3 – 25 недель, 4 – 26 недель

лись от полученных при замораживании со скоростью, обеспечиваемой режимом I: сопряженность дыхания и окислительного фосфорилирования сохранялись лишь в митохондриях 25–26 недель (рис. 3).

При двухэтапном режиме замораживания присутствие в среде 10%-го глицерина было более эффективно, чем ДМСО (рис. 3). В этом случае низкий ДК был обусловлен увеличением скорости дыхания в состоянии 2. Присутствие криопротекторов при двухэтапном режиме замораживания митохондрий позволяло сохранить активность дыхательной цепи на более высоком уровне, чем после одноэтапных режимов (I или II) как при окислении сукцината, так и глутамата+малата. Это выражалось в более высоких скоростях дыхания в состоянии 3, более прочной сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования. Вместе с тем выявлены особенности повреждений митохондрий в зависимости от различного характера действия криповреждающих факторов, обусловленных режимом замораживания. При одноэтапных быстрых режимах замораживания дыхательная активность в состоянии 2 либо угнеталась (20–22 недели), либо не изменялась (25–26 недель), а после двухэтапного замораживания окисление субстратов происходило с увеличенными скоростями как в присутствии криопротекторов, так и без них. Скорость дыхания в состоянии 3 угнеталась при этом независимо от режима охлаждения. Способность к синтезу АТФ, судя по величинам дыхательного контроля, снижалась в деконсервированных митохондриях более поздних сроков развития.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изменение режима, присутствие криопротекторов различного вида и концентрации практически не предотвращают крионарушение в митохондриях, выделенных из печени плодов 20–22 недель. Введение криопротекторов в среду заморажива-

ния было эффективно в отношении митохондрий 24–26 недель развития, а варьирование скоростей замораживания суспензии митохондрий, не содержащей криопротектора, – не эффективно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Медицина, 1976. – 415 с.
2. Суббота Н.П., Сукач А.Н. Криочувствительность митохондрий печени кроликов в онтогенезе // Криобиология. – 1987. – № 4. – С. 15–20.
3. Тарасов В.Ф. Влияние быстрого замораживания-отогрева на сохранность гепатоцитов при низкотемпературном консервировании: Автореф. дис....канд. биол. наук. – Харьков, 1988. – 17 с.
4. Шумаков В.И., Арзуманов В.С., Онищенко Н.А. и др. Лечение тяжелой печеночной недостаточности перфузией крови больного через взвесь криоконсервированных гепатоцитов // Хирургия. – 1990. – № 2. – С. 113–116.
5. Boyer P.D., Theorell H. The change in reduced diphosphopyridine nucleosides fluorescence upon combination with liver alcohol dehydrogenase // Acta Chem. Scand. – 1956. – 10. – P. 447–450.

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

Поступила 09.07.93

Н.П. СУБОТА

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЗАРОДКІВ ЛЮДИНИ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м. Харків

Вивчено стан біоенергетичних процесів у мітохондріях, ізольованих із печінки зародків людини 18–26 тижнів внутріутробного розвитку. Встановлено, що характер кріопшкоджень мітохондрій у вивчені строки розвитку зародків однотиповий і полягає у збільшенні швидкості окислювання субстратів, пригніченні електронтранспортного ланцюгу, зниженні поєднаності процесів дихання і окислювального фосфорилування, зниженні мембранного потенціалу, рівня відновлюваності піридиннуклеотидів. Глибина кріопшкоджень визначається інтенсивністю функціонування дослідженої системи у вивчені строки розвитку зародків, а також швидкістю заморожування, видом і концентрацією присутнього в середовищі кріопротектора.

N.P. SUBBOTA

THE FUNCTIONAL STATE OF CRYOPRESERVED MITOCHONDRIA OF HUMAN FETAL LIVER

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

Bioenergetic processes were studied in mitochondria isolated from liver of human embryos of the 18–26 weeks of the gestation period. It has been found that the character of cryoinjury is of one type in the studied gestation periods and involves an increase in substrate oxidative rate, inhibition of electron transport chain activity, decrease in coupling of respiratory processes and oxidative phosphorylation, decrease in membrane potential and pyridine nucleotide reduction. The extent of cryoinjury is determined by the intensity of function of the studied system in the gestation periods under study and freezing rate, type and concentration of cryoprotectant.

А.Н.Гольцев, Л.В.Останкова, Е.Д.Луценко, Т.Г.Дубрава

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК
(КОЕ_С) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА
МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА**

Показано, что: 1) среди адгезивных клеток миелотрансплантата присутствуют элементы, не обладающие колониеобразующей активностью, но являющиеся аксессуарными регуляторными клетками, обеспечивающими вместе с кроветворным микроокружением реципиента функционирование донорских кроветворных предшественников; 2) при криоконсервировании компонентный состав костного мозга нарушается не только за счет изменения состояния кроветворных предшественников, но и изменения параметров регуляторных клеток миелотрансплантата. Указывается на возможность селективной элиминации аксессуарных элементов в зависимости от выбранного режима криоконсервирования.

Опыт применения гемопоэтической ткани в эксперименте и клинической практике достаточно убедительно демонстрирует выраженные изменения характера формирования гемопоэтической системы реципиентов криоконсервированного костного мозга в сравнении с нативным. Предлагаются различные объяснения таких изменений, обусловленных нарушением метаболической активности, рецепторного аппарата [2], развитием нелетальных повреждений в кроветворных клетках [4]. Вместе с тем современные данные в области иммуногематологии дают основание считать, что модификация функциональных свойств криоконсервированного миелотрансплантата может быть обусловлена не только изменением функционального статуса самих кроветворных предшественников, но и модификацией качественных и количественных параметров клеточных популяций миелотрансплантата, обладающих по отношению к ним регуляторной активностью [2]. Решение этого вопроса представляет теоретический и практический интерес, являясь предпосылкой повышения эффективности применения криоконсервированного костного мозга.

Исходя из вышеизложенного, работа посвящена изучению роли компонентного состава трансплантируемого костного мозга в проявлении функциональной активности кроветворных предшественников, также представлены результаты, касающиеся влияния адгезивных клеток миелотрансплантата на колониеобразующую активность КОЕ_С.

Эксперименты выполнены на мышах линии (СВАхС57В1)F₁ массой 20-22 г. Костный мозг вымывали из бедренной кости средой 199 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и цитрата Na. Адгезию клеток проводили в чашках Петри, дважды инкубируя суспензию при 24 °С в течение 40 мин. Адгезивные клетки собирали резиновым шпателем. Макрофаги перитонеальной полости получали общепринятым методом [3].

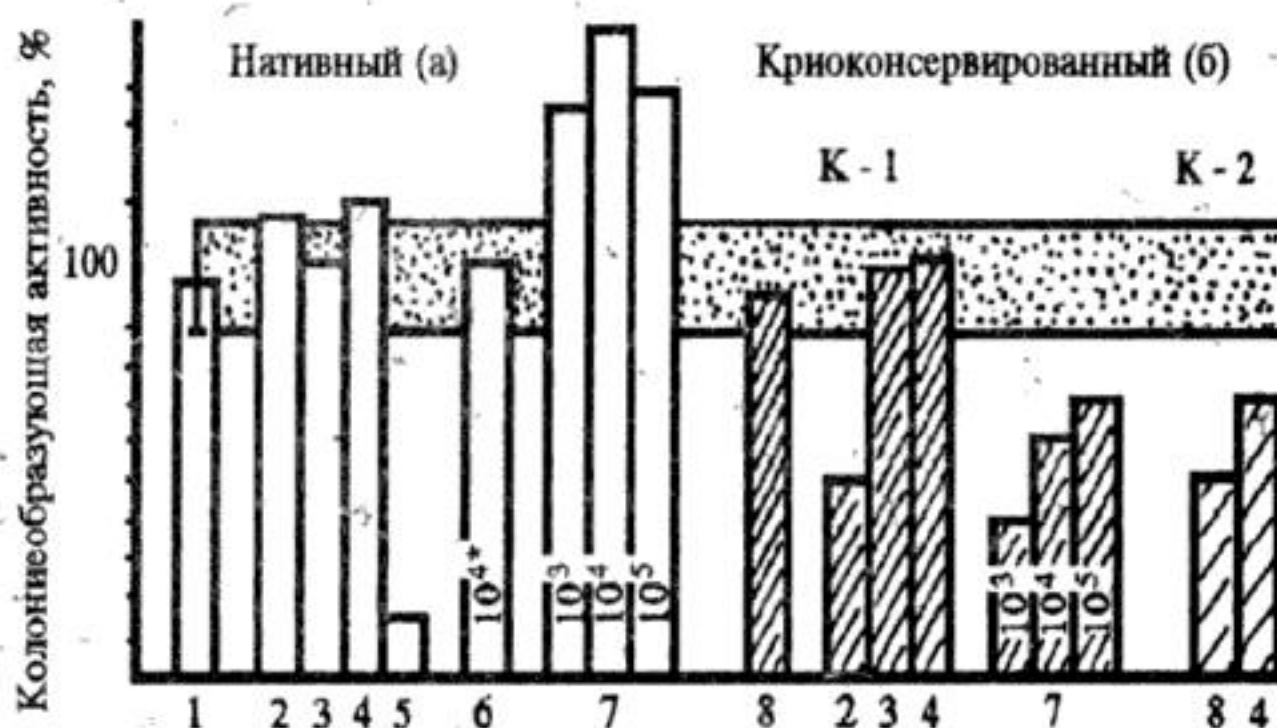
Костный мозг криоконсервировали на опытной установке УОП 00.00.00.01 производства ИПКиК АН Украины. В первом случае – в режиме К-1 – под защитой криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрации 10%. Скорость замораживания составила 1 °С/мин до -25 °С с последующим погружением ампул в жидкий азот. Во втором случае – режим К-2 – использовали криопротектор полиэтиленоксид (ПЭО) с молекулярной массой 400 также в 10%-й концентрации. Скорость замораживания была аналогич-

ной режиму К-1. В обоих случаях отогрев суспензии проводили на водяной бане при температуре 39–40 °С в течение 50–60 с. Более подробно все манипуляции, связанные с криоконсервированием костного мозга, описаны ранее [4].

Животных облучали на установке РУМ-17 в дозе 850 Р. Через 2–4 ч после облучения мышам-реципиентам внутривенно вводили 1×10^5 клеток в объеме 0,2 мл нативного или криоконсервированного костного мозга *per se* или совместно с соответствующими клетками. Экзогенное колониобразование оценивали на 9–10-е сут по общепринятому методу [2], содержание предшественников стромальных элементов – колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ_ф) в костном мозге – по методу [7]. Результаты обработаны статистически [1].

Полученные данные свидетельствуют о том, что в суспензии миелокарицитов содержится около 15–18% клеток, обладающих адгезивными свойствами, что согласуется с результатами других авторов [10]. Выделенные указанным способом адгезивные клетки сами по себе не обладали выраженной способностью формировать гемopoэтические колонии. При этом их удаление

Рис. 1. Влияние компонентного состава миелотрансплантата на колониобразующую активность костного мозга: 1 – интактный костный мозг (КМ), 2 – КМ без адгезивных клеток (АК), 3 – КМ без АК+АК, 4 – КМ+АК, 5 – АК, 6 – интактный КМ+перитонеальные макрофаги (ПМ), 7 – КМ без АК+ПМ, 8 – интактный КМ; * – доза макрофагов



не сказывалось существенным образом на колониобразующей активности нативного костного мозга (рис. 1, а). Тем не менее адгезивные клетки (АК) миелотрансплантата все же играют определенную роль в формировании кроветворного микроокружения *in situ*, что доказывается совместной трансплантацией костного мозга с клетками, обладающими в отношении КОЕ_с регуляторной активностью, в частности, макрофагами перитонеальной полости мышей [3]. Макрофаги не проявляли такой активности при совместном введении с нативным интактным костным мозгом (рис. 1, а; поз. 6). Однако после удаления из него АК отмечалось значительное стимулирующее действие макрофагов на КОЕ_с, что выражалось в повышении колониобразующей способности костного мозга (рис. 1, а; поз. 7). Таким образом, среди адгезивных элементов миелотрансплантата, выделенных указанным выше способом, присутствуют клетки, не обладающие свойствами кроветворных колониобразующих единиц, но играющие роль “буферной системы” в отношении влияния на КОЕ_с регуляторных сигналов, продуцируемых экзогенными макрофагами, и поддерживающие расселившиеся в кроветворном микроокружении реципиента КОЕ_с на определенном уровне функциональной активности. Идентификация гистогенетического профиля этих клеток не входила в задачу данного исследования, однако известно, что среди АК костного мозга присутствуют клеточные популяции, относящиеся к стромальным элементам костного мозга и создающие *in situ* его кроветворное микроокружение, в частности, предшественники фибробластов – КОЕ_ф [11]. В этой связи, переходя к вопросу об оценке

функциональной полноценности криоконсервированного костного мозга, необходимо отметить, что на примере КОЕ_ф показана четкая зависимость их сохранности от режима криоконсервирования костного мозга. Так, при криоконсервировании в режиме К-1 выживаемость КОЕ_ф составила около 50%, тогда как при криоконсервировании в режиме К-2 – не более 10–15%. Режимом криоконсервирования определялась и выраженность ответа КОЕ_с на совместное введение макрофагов. Влияние макрофагов было минимальным, как и при введении с нативными интактными миелокариоцитами в случае со-трансплантации с костным мозгом, криоконсервированным в режиме К-1

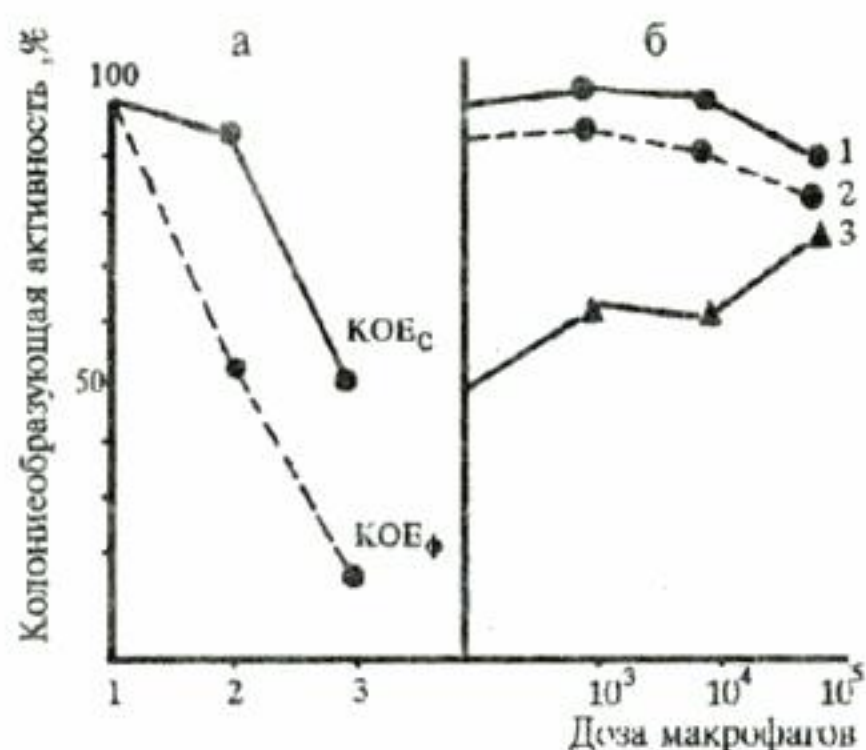


Рис. 2. Сохранность КОЕ_с и КОЕ_ф (а) и действие сингенных перитонеальных макрофагов на колониеобразующую активность (б) костного мозга: 1 – нативный костный мозг, 2, 3 – режимы криоконсервирования К-1 и К-2 соответственно

является достаточно близкие результаты, полученные при введении макрофагов с криоконсервированным в режиме К-1 костным мозгом, предварительно лишенным АК и криоконсервированным в режиме К-2 (рис. 1,б, поз.7 и рис. 2,б). Наши данные соответствуют представлениям о наличии в костном мозге *in situ* определенных “буферных” клеточных систем, ограничивающих пролиферацию КОЕ_с в ответ на экзо- или эндогенные стимулирующие факторы [5], и подтверждают “трансплантабельность” клеток, входящих в состав кроветворного микроокружения, при миелотрансплантации [8]. В таком случае режим К-2, в отличие от режима К-1, элиминирует какую-то часть клеток “буферной системы” и дает возможность экзогенным макрофагам проявлять регуляторную активность в отношении донорских КОЕ_с.

Тот факт, что стимулирующий эффект всех выбранных доз макрофагов на КОЕ_с нативного костного мозга, лишенного АК, был выше, чем при введении с криоконсервированным в режиме К-2 костным мозгом (рис. 1,а, поз.7 и рис. 2,б), дает основание предположить, что после адгезии в большей степени, чем после криоконсервирования в этом режиме из костного мозга элиминируются клетки, ограничивающие активность макрофагов. Однако нельзя исключить более сложного изменения компонентного состава костного мозга после криоконсервирования в сравнении с его состоянием после адгезии, в результате которого погибает и часть клеток, не входящих в популяцию адгезивных, но за счет которых реализуется стимулирующее действие макрофагов на КОЕ_с. Более того, анализ полученных результатов свидетельствует о наличии в нормальном костном мозге дублирующих друг друга клеточных популяций, проявляющих регуляторно-хелперную функцию в отношении колоние-

(рис. 2,б). При трансплантации с костным мозгом, криоконсервированным в режиме К-2, макрофаги проявляли в отношении КОЕ_с стимулирующую активность, подобно введению с нативным костным мозгом, лишенным адгезивных клеток (рис. 2,б и 1,а, поз.7). На основании этих данных и сохранности предшественников стромальных элементов КОЕ_ф, складывается впечатление, что в отношении клеток, входящих в популяцию адгезивных элементов костного мозга (в данном случае КОЕ_ф), режим К-2 подобен экспериментальной модели с искусственной их элиминацией методом адгезии. Подтверждением данного тезиса яв-

образующей активности донорских КОЕ_с [6]. Как уже было отмечено, элиминация АК из нативного миелотрансплантата не изменяла его колониеобразующей активности, тогда как предварительное их удаление из криоконсервированного в режиме К-1 костного мозга значительно снижало ее. То есть в первом случае в костном мозге все же остается популяция клеток, не входящая в состав адгезивных элементов и проявляющая хелперную активность в отношении КОЕ_с. Ситуация, наблюдаемая во втором случае, свидетельствует о высокой криочувствительности части этих клеток, которые погибают (теряют функциональную активность) даже в режиме К-1. Следовательно, при криоконсервировании в этом режиме интактного костного мозга функцию акцессорных хелперных клеток берут на себя сохранившиеся более криорезистентные популяции, входящие в состав АК. Предварительное удаление АК и последующая инактивация “дублирующей” популяции в процессе криоконсервирования приводят к разбалансировке регуляции КОЕ_с акцессорными клетками миелотрансплантата и кроветворным микроокружением реципиента. Складывается впечатление, что через популяцию “дублирующих” клеток-хелперов проявляют стимулирующую активность в отношении КОЕ_с костного мозга, лишенного АК, экзогенные макрофаги. По крайней мере, добавление макрофагов к истощенному по АК криоконсервированному в режиме К-1 костному мозгу стимулировало его колониеобразующую активность в меньшей степени, чем добавление к нативному костному мозгу без АК (рис. 1,а, поз.7 и 1,б, поз.7). Подобная закономерность с несколько иной степенью выраженности наблюдалась и при введении макрофагов с костным мозгом, криоконсервированным в режиме К-2 (рис. 2,б), при котором на фоне выраженной селективной элиминации предшественников стромальных элементов (КОЕ_ф) происходит, очевидно, и инактивация функции “дублирующих” клеток-хелперов. На возможность существования популяции “дублирующих” клеток-хелперов колониеобразования указывают и результаты работы [13]. Авторы идентифицировали в костном мозге клеточную популяцию, не входящую в состав АК, не обладающую колониеобразующей активностью, но являющуюся связующим звеном в стимуляции кроветворных предшественников (КОЕ_к) экзогенными колониестимулирующими факторами (КСФ). Популяция этих клеток теряла функциональную активность после криоконсервирования костного мозга под защитой ДМСО.

Оценивая степень влияния режимов К-1 и К-2 на костный мозг, необходимо отметить определенную корреляцию между его колониеобразующей способностью *in vivo* и сохранностью стромальных элементов – КОЕ_ф (рис. 2,а). Можно считать, что более оптимальные режимы криоконсервирования, в данном случае К-1, обеспечивают и более высокую сохранность непосредственно КОЕ_с, что проявляется соответствующим уровнем колониеобразования *in vivo*. Однако на примере “неоптимального” режима К-2 становится очевидным, что невысокая колониеобразующая активность криоконсервированного костного мозга обусловлена не только низкой сохранностью самих КОЕ_с. Добавление к криоконсервированному в режиме К-2 костному мозгу АК в исходной пропорции хотя и не восполняло до уровня нативного, но все же увеличивало его колониеобразующую активность (рис. 1,б, поз.4, 8). Более того, этот тезис подтверждается и при трансплантации криоконсервированного в режиме К-1 костного мозга, предварительно лишенного АК. Удаление АК сопровождалось выраженным снижением колониеобразования (рис. 1,б, поз.2), что, однако, не связано с повышением криочувствительности КОЕ_с в процессе элиминации АК, так как аналогичная процедура, выполненная в силиконизи-

рованной посуде, не изменяла существенно колониеобразование. В то же время возвращение АК в суспензию криоконсервированного костного мозга сопровождалось полным восстановлением колониеобразующего потенциала миелотрансплантата (рис. 1,б, поз.3). Следовательно, и в первом, и, особенно, во втором случае снижение колониеобразования связано с изменением компонентного состава миелотрансплантата, а именно – с отсутствием в нем АК, что доказывает наличие в этой популяции аксессуарных клеток, поддерживающих вместе с клетками кроветворного микроокружения реципиента введенные КОЕ_с на определенном функциональном уровне. Исходя из этого, очевидно, что в условиях измененного компонентного состава, то есть “полноты миелотрансплантата” костного мозга после криоконсервирования тест оценки колониеобразующей способности костного мозга *in vivo* не отражает истинной сохранности КОЕ_с. При этом важно отметить, что вне зависимости от режима криоконсервирования, сохранения или элиминация регуляторных, в частности АК, костный мозг хотя и снижал, но все же сохранял определенную колониеобразующую активность. Данный факт свидетельствует прежде всего о различной криоустойчивости КОЕ_с, то есть гетерогенности субпопуляций кроветворных предшественников по этому признаку. Кроме того, этот факт говорит о наличии в костном мозге различных субпопуляций КОЕ_с, даже в пределах одной “возрастной” генерации (формирующих колонии на 9–10-е сут), для которых значимость кооперативного взаимодействия с регуляторными клетками миелотрансплантата менее выражена. Показано, например, что в популяции кроветворных клеток с высоким пролиферативным потенциалом (ВПП-КОЕ), относящихся к мультифактор-отвечающим клеткам [10], присутствуют различные субпопуляции, отвечающие на стимуляцию либо сложного комплекса факторов (КСФ–1 + ИЛ–1 + ИЛ–3 + ИЛ–6), либо более простого сочетания факторов (КСФ–1 + ИЛ–1 + ИЛ–6) [9]. И наконец, не исключено наличие и сохранение в миелотрансплантате после криоконсервирования в обоих режимах других аксессуарных клеточных систем, берущих на себя вместе с кроветворным микроокружением реципиента функцию регуляции тех КОЕ_с, которые и обеспечивают “остаточное” колониеобразование.

В совокупности полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

— функциональная активность кроветворных предшественников в организме облученного реципиента существенным образом зависит от компонентного состава миелотрансплантата. В этой связи мы вводим понятие “полнота миелотрансплантата”, то есть сбалансированный состав аксессуарных клеточных компонентов, которые, как доказывают наши данные, обладают трансплантабельностью и обеспечивают с микроокружением реципиента функциональный статус донорских КОЕ_с;

— при криоконсервировании компонентный состав костного мозга нарушается: изменяется не только количественное содержание самих кроветворных предшественников, но и обладающих в отношении этих клеток регуляторной активностью аксессуарных элементов. В зависимости от выбранного режима криоконсервирования может происходить селективная элиминация аксессуарных элементов;

— тест колониеобразования *in vivo* [12] может быть объективным в отношении оценки истинного содержания КОЕ_с в криоконсервированном костном мозге при условии обеспечения сбалансированного клеточного состава миелотрансплантата, так как он является интегральным показателем, определяемым сохранностью КОЕ_с и функцией аксессуарных клеток костного мозга;

— криоконсервирование с использованием различных режимов замораживания-оттаивания может служить методом селективной элиминации костного мозга различных субпопуляций регуляторных клеток и в связи с этим дает возможность расшифровки механизма регуляции гемопоэза и повышения эффективности трансплантации криоконсервированного костного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы микробиологических исследований. — Л.: Медицина, 1972. — 180 с.
2. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга.: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — ИПК и К АН Украины. — Харьков, 1988. — 35 с.
3. Кравцов В.Д. Взаимодействие макрофагов и стволовых кроветворных клеток мышей *in vivo* и *in vitro* // Цитология. — 1989. — 31, № 3. — С. 359–362.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий / под общ. ред. Цуцаевой А.А. — Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
5. Лорд Б.И., Цырлова И.Т. Эндогенные регуляторы пролиферации гемопоэтических колониеобразующих клеток: их роль в защите стволовых кроветворных клеток и регуляции гуморального иммунного ответа // Иммунология. — 1987. — № 4. — С.14–20.
6. Мирошниченко И.В., Ярилин А.А., Рябинина И.Д. и др. Факторы, секретируемые клетками костного мозга и тимуса, обогащенные предшественниками Т-лимфоцитов: сравнение с известными цитокинами и характеристика клеток-продуцентов // Иммунология. — 1989. — № 6. — С.23–27.
7. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. — М.: Медицина, 1980. — 215 с.
8. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая клетка и ее микроокружение. — М.: Медицина, 1984. — 237 с.
9. Bertonecello I., Kriegler A.B., Bradleu T.R. The effect of interleukin-6 on hemopoietic stem cell subsets resolved by rhodamine-123 // Exp. Hematol. — 1990. — 18, № 6. — P. 550.
10. Mcniece I.K., Temeles D.S., Fuller K.H. Further characterization of human high proliferative potential colony forming cells // Exp. Hematol. — 1990. — 18, № 6. — P. 552.
11. Mori M., Sadahira Y. Characteristics of bone marrow fibroblastic colonies (cfu-f) formed in collagen gel // Exp. Hematol. — 1987. — 15, № 11. — P. 1115–1120.
12. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Radiat. Res. — 1961. — 14, №2. — P. 213–222.
13. Schlunk T., Ruber E., Schleyer M. Survival of human bone marrow progenitor cells after freezing: improved detection in the colony-forming assay // Cryobiology. — 1986. — 18, № 2. — P. 111–116.
14. Vogt Ch., Pentz S., Rich Ivan N. A role for macrophage in normal hemopoiesis: *in vitro* and *in vivo* erythropoietin gene expression in macrophages detected by *in situ* hybridization // Exp. Hematol. — 1989. — 17, №3. — P. 391–397.

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

Поступила 21.12.92

А.М. ГОЛЬЦЕВ, Л.В. ОСТАНКОВА, О.Д. ЛУЦЕНКО, Т.Г. ДУБРАВА

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН (КОЕ_с) ЗАЛЕЖНО ВІД КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ МІЄЛОТРАНСПЛАНТАТА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини АН України, м.Харків

Показано: що серед адгезивних клітин мієлотрансплантата присутні елементи, котрі не володіють колоніюутворюючою активністю, але є акцесорними регуляторними клітинами і забезпечують разом з кровотворним мікрооточенням реципієнта функціонування донорських кровотворних попередників; і що при кріоконсервуванні компонентний склад кісткового мозку порушується не лише за рахунок зміни стану кровотворних попередників, але і зміни параметрів регуляторних клітин мієлотрансплантата. Вказується на можливість селективної елімінації акцесорних елементів залежно від обраного режиму кріоконсервування.

A.N.GOLTSEV, L.V.OSTANKOVA, E.D.LUTSENKO, T.G.DUBRAVA

THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF CRYOPRESERVED HEMOPOIETIC CELLS (CFUs) AS A FUNCTION OF THE MYELOGRAFT COMPONENT COMPOSITION

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

It has been shown that elements having no colony-forming activity but representing accessory regulatory cells that provide (with the hemopoietic microenvironment) for the function of donor hemopoietic precursors are found among adhesive cells of myelograft. Cryopreservation appeared to modify the component composition of bone marrow not only due to changes in state of hemopoietic precursors but also in parameters of myelograft regulatory cells. The possibility of selective elimination of accessory elements depending on chosen cryopreservation protocol is indicated.

УДК 57.043:591.463.11.044

Т.П.Линник

ПОДХОДЫ И ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД ДЛЯ СПЕРМЫ ПТИЦ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обзор исследований, посвященных созданию многокомпонентных криозащитных сред для спермы птиц и млекопитающих. Изложены основные принципы и подходы к разработке сред, отмечены перспективные направления в этой области. Предпринята попытка систематизировать требования к свойствам и составу криозащитной среды в зависимости от физиологических особенностей спермиев конкретного вида животных.

Широкое применение искусственного осеменения в практике животноводства и птицеводства обусловило интенсивное развитие одной из важнейших областей криобиологии – разработки теоретических и прикладных основ криоконсервации спермы. По данной проблеме накоплен огромный экспериментальный материал, изданы объемные монографии и обзорные труды [3, 9, 12, 16, 17, 18, 19, 22]. Разработаны, стандартизованы и внедрены в практику методы криоконсервирования для различных видов сельскохозяйственных животных, обеспечивающие удовлетворительное получение потомства [9, 12, 16, 22]. Но считать проблему криоконсервирования спермы полностью решенной преждевременно. У некоторых видов животных (баран, жеребец, хряк, кролик) не удается сохранить высокую оплодотворяющую способность спермиев после замораживания-оттаивания, что приводит к нестабильным и низким результатам оплодотворяемости самок при осеменении [9, 16, 17, 18]. Нередко на практике приходится увеличивать спермодозу или кратность осеменений, особенно часто это применяют для птиц, поскольку для получения племенного молодняка требуется сохранять яйценоскость в течение длительного времени [3, 15, 22]. Особо важное значение приобретают доза и качество криоконсервированной спермы у диких видов животных (редких и исчезающих) из-за трудности получения исходного материала [18, 26]. Поэтому до настоящего времени совершенствование методов криоконсервирования спермы птиц и млекопитающих остается объектом внимания многих исследователей.

Основным технологическим приемом при любом методе криоконсервирования спермы является использование многокомпонентных криозащитных сред. Именно состав и свойства защитной среды в основном определяют эффективность криоконсервирования. В литературе опубликованы результаты

испытаний огромного числа различных сред для разбавления и замораживания спермы [3, 9, 12, 13, 16, 19]. Предлагались и опробованы разнообразные подходы к созданию защитных сред, основные из которых следующие: среды, близкие по составу к плазме эякулята; среды, компоненты которых выполняют определенную функцию – компенсируют или предотвращают изменения и повреждения в спермиях, возникающих на разных стадиях криоконсервирования, например поддерживают осмотический баланс, снижают электропроводность, предотвращают агглютинацию, повышают антиокислительную активность спермиев, подавляют или убивают микрофлору, стабилизируют белково-липидные комплексы мембран [9, 13, 16, 17, 18]. В 1962 г. В. К. Милованов сформулировал основные требования к средам, определил на их основе базовый состав компонентов, предложил теоретический подход к созданию защитных сред, который выдержал проверку временем и интенсивно развивается до настоящего времени [12]. Основная идея – не копировать состав плазмы, а нейтрализовать “вредные действия” секретов половых желез, активирующих сперму во время эякуляции, тормозить метаболические процессы, максимально переводить спермии в состояние покоя на этапе разбавления и эквilibрации.

В настоящее время накоплены многочисленные факты в пользу того, что экзогенное или эндогенное торможение метаболизма клеток в условиях стресса может иметь защитное значение [6, 11, 13, 24]. Хорошо известно [6, 24], что природа наделила многие биологические объекты различного уровня организации (от клетки до целого организма) свойством переходить в состояние покоя, сохраняя при этом жизнеспособность и значительно повышая их устойчивость к неблагоприятным и стрессорным воздействиям. Последнее становится понятным, если предположить, что доля метаболического потока, нарушаемого воздействием, тем выше, чем активнее поток, а повреждение клетки тем сильнее и гибель ее наступает тем быстрее, чем активнее ее метаболизм [11]. При всей привлекательности и внешней простоте этого подхода и несмотря на определенные достигнутые успехи, в полной мере реализовать его в практике криоконсервирования спермы не удастся. Одной из основных причин, конечно, является недостаточность знаний о метаболических путях жизненного цикла спермы млекопитающих и, особенно, птиц. Но, вероятно, существует еще один барьер, на наличие которого указывает удивительная закономерность: самые эффективные среды, самые оптимальные режимы охлаждения и замораживания и качественный исходный материал не позволяют сохранить более 40–50% абсолютно полноценных спермиев после замораживания-оттаивания [3, 9, 16, 17]. Возможно, причина этого в том, что популяция эякулированных сперматозоидов является гетерогенной из-за разной степени их зрелости [5] или из-за большого числа генетически атипичных спермиев [35]. Так, например, Salisbury G.W. [35] считает, что на каждые 50 сперматозоидов в эякуляте – один генетически дефектный. Но предположим наличие еще одной причины: генетической предопределенности поведения спермиев [23]. Предположим, что определенной части спермиев в популяции генетически обусловлено выполнение одной или нескольких функций на этапах оплодотворения: одна часть создает поток и облегчает сближение гамет в половом тракте самки, другая – обеспечивает деполимеризацию и растворение остатков яйценосного бугорка, следующая – избирательную реакцию спермиев с прозрачной оболочкой яйца и т. д. вплоть до взаимной ассимиляции ядра спермия с ядром яйца. При этом энергетические ресурсы как отдельного сперматозоида, так и всей популяции эякулята в целом могут распределяться по-

этапно и расходоваться рационально. Отсюда следует, что и чувствительность разных спермиев отличается так же, как и их защитная реакция на неблагоприятные внешние воздействия. Тогда становится понятным “роковое” число полноценных спермиев, максимально сохраняющихся при криоконсервировании, но подходы к разработке способов защиты и восстановления жизнеспособности спермиев должны быть другими.

Реализация подхода к разработке защитных сред, основанного на торможении жизнедеятельности клетки, осложняется и тем, что метаболизм спермиев разных видов млекопитающих и птиц значительно отличается. Например, разбавленная сперма петуха показывает хорошую оплодотворяющую способность (более 70%) при аэробных и анаэробных условиях хранения в присутствии углеводов, в то время как сперма индюка – только при аэробных условиях [39]. По особенностям метаболизма сперматозоиды можно условно разделить на два типа [12, 25, 39]. К 1-у типу отнесем сперму, получающую энергию преимущественно анаэробным гликолитическим путем, дыхание менее выражено. Высокая концентрация спермы в небольшом объеме плазмы, в которой много углеводов, но мало солей. При эякуляции секреты половых желез незначительно меняют состав плазмы из придатка (бык, олень, баран, козел, петух). Как правило, у этих животных при естественном спаривании “влагилищный” способ осеменения. Спермии отличаются высокой жизнеспособностью и устойчивостью к внешним воздействиям. Спермии 2-го типа энергию получают преимущественно аэробным гликолизом, выражено дыхание. Невысокая концентрация спермы в большом объеме плазмы, в которой мало углеводов, но много солей. При эякуляции резко меняется состав плазмы секретами половых желез (хряк, жеребец, собака, кролик). У данных животных (исключая кролика) при естественном спаривании “маточный” способ осеменения. Спермии чувствительны к внешним воздействиям. Спермии 1-го типа достаточно успешно переносят криоконсервирование в отличие от 2-го. Следует отметить, что при любом разбавлении спермы 1-го типа искусственной защитной средой существенно меняется состав плазмы, то есть уже частично выполняется требование “нейтрализовать действие секретов половых желез”. Тот же эффект достигается и для спермы 2-го типа, если всю или большую часть плазмы заменить на искусственную среду – только при таком условии удастся результативно криоконсервировать сперму 2-го типа [9, 13].

Следует отметить еще одну немаловажную и характерную особенность сперматозоидов разных видов животных – время, необходимое для завершения капацитации. Это время у разных видов значительно отличается, например у кролика – 5–6 ч, коровы – 6–7 ч, а у овцы – 16 ч. Капацитация может ингибироваться так называемым фактором декапацитации, содержащимся в семенной плазме. Химическая природа этого фактора не выяснена. Предполагают, что он ингибирует некоторые ферменты сперматозоидов, т. е. стабилизирует их поверхность, предотвращая преждевременную акросомную реакцию. Так как роль ферментативной активности в процессах капацитации у разных видов животных различна, следовательно будет отличаться и природа факторов декапацитации, а также и механизм их действия.

Хорошо известно [10, 12, 14, 25], что спермии, находящиеся в хвостовой части эпидидимиса, сохраняют оплодотворяющую способность более одного месяца. Обнаружено длительное переживание сперматозоидов и в половых путях самок для многих видов млекопитающих, срок хранения колеблется от 1 сут до 60–80 дней. У птиц переживание спермы известно приблизительно для 30 видов, длительность “физиологической консервации” от 6 до 70–80 дней. Как правило, местом переживания у млекопитающих являются железы матки, у птиц – железы матковлагалищного соединения [10]. Сперматозоиды, длительно хранящиеся в “хвосте” эпидидимиса и в половых путях самок, находятся в заторможенном состоянии, интенсивность метаболических процессов низкая [12, 14, 25]. Поэтому естественно предположить, что идеальной средой для длительного хранения спермиев при положительных и низких температурах могут быть среды, близкие по составу и свойствам либо к эпидидимальному секрету, либо к секрету “спермохранящих” желез полового тракта самок, например, к среде трубчатых желез хранения сперматозоидов в яйцеводe кур и индеек [38].

В литературе опубликованы некоторые данные о составе и свойствах семенной жидкости придатков некоторых видов животных и секрета полового тракта самок [12, 21, 25, 31]. Имеется много общего. Так, например, значения pH среды в придатках разных видов млекопитающих колеблются от 5,5 до 6,7, а pH секрета половых путей овцы варьирует от 6,5 до 6,9 [12, 25]. Содержание K^+ в семенной жидкости придатков в 2–3 раза выше, чем в плазме крови [21], а в секрете матки кур ко времени яйцекладки – в 4 раза выше [10]. Обнаружено присутствие инозитола как в секрете придатков, так и в экстракте различных областей яйцевода кур и индеек, наибольшее количество в воронке и железах матковлагалищного соединения [21, 31]. Отмечено повышенное содержание ионов Zn^{2+} в придатках семенников некоторых видов животных [32], а также в “спермохранящих” органах самок. Например, содержание ионов Zn^{2+} в железах матковлагалищного соединения индюшек значительно выше, чем в других областях яйцевода [10]. Предполагается, что цинк, возможно, является естественным метаболическим ингибитором переживающей спермы, он обратимо тормозит обмен, подвижность и капацитацию сперматозоидов [30]. По мнению ряда авторов [5, 14, 25], некоторая аналогия наблюдается в системе энергообеспечения спермиев в придатках и половых путях самок. При этом следует отметить, что условия хранения сперматозоидов, как в придатках семенников (содержание кислорода в 10–20 раз меньше, чем в воздухе [12, 25]), так и в “спермохранящих” железах полового тракта самок [10, 14, 21] анаэробные.

Последние 10–15 лет настойчиво и интенсивно ведется поиск факторов, определяющих переживаемость спермиев в половых путях самок. Особенно много работ для спермиев птиц [27, 29, 30, 31, 32, 38]. Инкубируют спермии с эпителиальными тканями различных участков яйцевода птиц [27], выделяют биологически активные вещества [31], диализируют эпителиальные среды “спермохранящих” желез и определяют фракции, увеличивающие, по мнению авторов, переживаемость спермиев [27, 29, 31], при этом данные о молекулярной массе и химической природе выделенных фракций у разных авторов часто отличаются. Искусственно моделируют условия “физиологической консервации” спермиев, подбирая газовый состав в камерах инкубации и варьируя композицию среды [31]. Консервируют спермии с экстрактами клеточных культур, полученных из желез моллюсков, почек птиц, скелетных мышц эмбрионов птиц [27, 31].

Параллельно проводится изучение состава семенной плазмы спермы. Пытаются выделить из плазмы и определить факторы, обладающие либо стимулирующим, либо ингибирующим влиянием на подвижность, потребление кислорода, содержание АТФ и, конечно, на оплодотворяющую способность спермиев [7, 28, 36]. Несмотря на определенные достигнутые успехи, остается целый ряд неясных вопросов, не позволяющих применить результаты этих исследований на практике: противоречивость данных разных авторов о составе семенной плазмы и эпителиальных секретов “спермохранящих” желез; отсутствие, как правило, четкой идентификации выделенных из них биологически активных фракций, отсюда – незнание ни химической природы, ни механизма их действия на метаболизм спермиев; и, наконец, технологическая сложность многих из вышеперечисленных приемов [7, 27, 28, 29, 31, 36, 38].

Тем не менее в настоящее время накоплено достаточно экспериментальных данных, позволяющих в той или иной мере искусственно моделировать условия природной “физиологической” инактивации и использовать их при криоконсервировании спермы. Это и хорошо известный “кислотный анабиоз” [12], и эквilibрация спермы до замораживания в атмосфере инертных газов (водород, азот, гелий, углекислый газ), и химические добавки наркотического характера действия. Следует отметить, что перечисленные выше приемы дают положительный эффект только при условии хорошо подобранной композиции криозащитной среды.

Одна из удачных схем состава предложена Т. J. Sexton (1983 г.) для криоконсервирования спермы птиц, но как основа может быть использована и дополнена при необходимости для спермиев любого вида животных. Состав среды формируется из компонентов, выполняющих определенные функции, обеспечивающие осмотический баланс, постоянное значение pH , комплексообразование с токсичными ионами металлов. Кроме того, в состав среды входят энергосубстраты, антибактериальные средства и криопротектор. В зависимости от типа спермы (1-й или 2-й) в качестве компонентов могут применяться различные вещества или различные их сочетания. Так, например, используя один и тот же состав среды, но изменяя концентрацию компонентов, разработали среды BPSE-I и BPSE-II для спермиев петуха и индюка соответственно. Отличаются среды по осмотичности и значению pH : BPSE-I – pH 6,5, осмотичность – 333 мОсмоль/кг; BPSE-II – pH 6,5, 350 мОсмоль/кг.

Подобный подход к композиции универсальной среды для спермиев разных видов животных в 1985 г. предложили В. К. Милованов с соавторами [13]. Особое внимание авторы уделили комплексонам в составе сред, учитывая высокую потребность сперматозоидов в 2-валентных катионах (Ca^{2+} , Mg^{2+}), и повышенную чувствительность к концентрации данных ионов. Трудно не согласиться с мнением авторов о нецелесообразности такого огромного числа разнообразных сред, тем более, что они мало отличаются друг от друга, состоят, как правило, из компонентов, выполняющих одинаковые функции – меняются либо вещества (например, различные углеводы), либо их сочетания.

Анализ литературных данных и собственных исследований позволяет определить требования к физико-химическим свойствам криозащитных сред для криоконсервирования спермиев птиц и млекопитающих. Основные из них следующие. Осмотичность среды в пределах 340–400 мОсмоль/кг в зависимости от физиологических особенностей спермы конкретного вида животного. Значение pH от 6,1 до 6,9, так, например, для спермы индюков – 6,5, петухов – 6,9, гусаков – 6,3, селезней – 6,9, барана – 6,55, быка – 6,55, хряка – 6,9. Можно рекомендовать различные солевые буферы в зависимости от характера

метаболизма спермиев, но лучше органические. Критериями отбора может служить высокая буферная емкость, совместимость с другими компонентами среды и максимально низкая температура замерзания. Например, такие буферы как TRIS, TES, TEST не замерзают при температуре до -30°C . Следует учитывать также возможность изменения pH буфера при понижении температуры. Так, pH TEST с 7,15 при 37°C падает до 6,5 при -14°C [34]. Одним из важных физико-химических показателей среды является электропроводность, которая должна быть значительно ниже, чем в семенной плазме. Известно, что в придатках электропроводность семенной жидкости в 10 раз меньше, чем в эякуляте. Электропроводность плазмы спермиев 1-го типа ниже, чем 2-го [12, 25]. Варьировать уровень электропроводности позволяет соотношение неэлектролит : электролит в составе среды (содержание неэлектролита в среде может достигать 80 %). Важный физико-химический параметр – температура замерзания среды [9, 19], управлять которой позволяют как солевые компоненты, так и криопротекторы. И, наконец, максимально высокая вязкость среды. Последняя характеристика практически не учитывается при создании сред, но потенциальные возможности имеет немалые. В вязкой среде движение спермиев замедляется, экономятся энергетические ресурсы. Четкое выполнение эмпирически установленных требований к свойствам и составу криозащитных сред позволяет в некоторой степени моделировать физико-химические условия “физиологической консервации” спермы, но является явно недостаточным для получения высоких результатов после криоконсервирования (80–90% абсолютно полноценных спермиев).

В течение последних 10 лет многими исследователями проводится тщательное изучение метаболизма спермиев различных видов животных, изыскание возможности целенаправленного его регулирования [1, 14, 31, 37, 38, 39]. Опробованы десятки веществ в качестве биологически активных добавок к криозащитной среде. Систематизируя экспериментальный материал [7, 8, 33], биологически активные добавки по характеру действия можно разделить на две группы. К первой группе отнесем соединения, действующие на организм самки (имплементоры [12]). Данные вещества увеличивают переживаемость спермиев вне организма, при этом они стимулируют моторику матки, облегчают продвижение спермиев в половых путях самки, ускоряют овуляцию яйцеклеток. Как правило, это либо ферменты (например, муциназа), либо гормоны (например, эстрофан, окситоцин, различные простагландины) [8, 9, 12]. Вторая группа биологически активных добавок включает вещества, влияющие непосредственно на функциональные характеристики спермиев – антиоксиданты, стабилизаторы, ингибиторы и другие метаболические регуляторы.

Наиболее хорошо изучено и освещено в литературе использование антиоксидантов, в качестве которых опробованы сотни веществ, начиная от неорганических солей (например, тиосульфат Na) и заканчивая сложными природными соединениями (например, бакланоид, эхинохром – красный пигмент морских ежей, каратиноиды и др.) [9, 13, 16, 17, 18, 20]. Следует отметить, что применение антиоксидантов целесообразно при криоконсервировании спермиев только тех видов животных, у которых обнаружено выраженное перекисное окисление липидов (ПОЛ). Обычно это спермии 2-го типа (хряк, жеребец, кролик) и сперматозоиды барана, у которых наблюдается интенсивное ПОЛ на этапах криоконсервирования [9, 16, 17, 18]. По мнению авторов [16, 17], у спермиев перечисленных видов животных

или отсутствуют, или значительно отличаются по составу и активности системы, ингибирующие ПОЛ.

Особый интерес вызывают работы, посвященные изучению метаболизма циклических нуклеотидов в спермиях, конкретнее, одному из четырех – цАМФ (циклическому аденозин-3', 5'-монофосфату). Исследуется изменение содержания и активности нуклеотида в сперматозоидах на этапах криоконсервирования, а также возможность направленного воздействия на цАМФ. По мнению авторов [1, 37] действие цАМФ на физиологические свойства и функциональную активность спермиев связано прежде всего с влиянием нуклеотида на процессы биоэнергетики, которые в конечном итоге обуславливают и подвижность, и выживаемость спермиев. Изучен целый ряд биологически активных соединений, влияющих на активность и концентрацию цАМФ в спермиях, – аденозин и его многочисленные аналоги, теofilлин, дипиридамол, дибукаин, моненсин и др. [37]. Обнаружено, что добавление к сперме ингибиторов фосфодиэстеразы (фермента распада цАМФ) оказывает положительный эффект на результат криоконсервирования спермиев [1]. Имеются данные об успешном применении ингибиторов других ферментативных систем (например, кальмодулина, сукцинатдегидрогеназы и др.) в процессе криоконсервирования спермиев различных видов животных.

Изучение особенностей метаболизма спермиев и способов его регулирования, а также поиск биологически активных соединений, позволяющих компенсировать эффект разбавления или удаления семенной плазмы и управлять обменными процессами в сперматозоидах, является в настоящее время одним из самых перспективных направлений при совершенствовании методов криоконсервирования спермы различных видов животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонюк В.С., Юсипова Н.А., Безлюдников Л.Г. и др. Циклические нуклеотиды и оплодотворяющая способность спермиев хряков // С.-х. биология. – 1986. – № 10. – С. 102–105.
2. Бекер М.Е., Раппопорт А.И., Калакуцкий Л.В. и др. Торможение жизнедеятельности клеток. – Рига: Зинатне, 1987. – 240 с.
3. Броевский А.В. Криоконсервация спермы сельскохозяйственной птицы (Обзор иностранной литературы) // С.-х. биология. – 1989. – № 2. – С. 33–39.
4. Данилова Л.В. Полиморфизм сперматозоидов и атипичный сперматогенез // Сперматогенез и его регуляция. – М.: Наука, 1983. – С. 98–141.
5. Данилова Л.В., Габер Е.С. Транспорт и созревание сперматозоидов в половых путях самца и самки // Сперматогенез и его регуляция. – М.: Наука, 1983. – С. 65–97.
6. Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А. Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме. – М.: Наука, 1983. – 176 с.
7. Кононов В.П., Семенова В.А., Ерохин А.С. Факторы плазмы спермы, повышающие устойчивость спермы при замораживании // С.-х. биология. – 1986. – № 10. – С. 98–101.
8. Корбан Н.В., Фрейманис Я.Ф., Мороз Л.Г. и др. Функциональное состояние спермы хряков при криоконсервации под влиянием 11-дезоксипростагландина E₁ // С.-х. биология. – 1986. – № 10. – С. 106–109.
9. Курбатов А.Д., Платов Е.М., Корбан Н.В. и др. Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных. – Л.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
10. Максудов Г.Ю., Артюшкова В.А. Физиологическая консервация спермы позвоночных. – Пушкино: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1989. – 73 с.
11. Мелехов Е.И. О возможном принципе регуляции повреждения и защитной реакции клетки // Журн. общей биол. – 1983. – XLIV, № 3. – С. 386–397.
12. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. – М.: Изд-во с.-х. литературы, журналов и плакатов, 1962. – 696 с.
13. Милованов В.К., Варнавская В.А., Шайдулин И.Н. Среда для глубокого охлаждения семени // Животноводство. – 1985. – № 7. – С. 39–41.
14. Мушамбаров Н.Н. Биохимия сперматогенеза // Усп. совр. биол. – 1983. – 96, вып. 1(4). – С. 101–116.
15. Нарубина Л.Е., Целютин К.В., Бубляева Г.Б. и др. Резервы повышения эффективности искусственного осеменения кур // Бюл. ВНИИРГЖ. – 1990. – № 119. – С. 5–8.

16. Наук В.А. Структура и функция спермиев сельскохозяйственных животных при криоконсервировании. – Кишинев: Штиинца, 1991. – 199 с.
17. Наук В.А., Борончук Г.В., Гуськов А.М. и др. Проблемы и перспективы консервации генома сельскохозяйственных животных // С.-х. биология. – 1989. – № 2. – С. 25–32.
18. Наук В.А., Борончук Г.В., Ротт Н.Н. Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких животных // Консервация генетических ресурсов (Методы, проблемы, перспективы). – Пушино: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1991. – С. 35–81.
19. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – Киев: Урожай, 1978. – 255 с.
20. Парамонова Л.И., Ревина А.А., Лизунов А.Ф. и др. Взаимодействие каротиноидов с супер-оксид анион-радикалом в связи с их стабилизирующим действием при криоконсервации спермы // Докл. ВАСХНИЛ. – 1989. – № 11. – С. 30–32.
21. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. – М.: Наука, 1985. – 206 с.
22. Сахацкий Н.И. Низкотемпературная консервация спермы гусей и уток. – Пушино: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1984. – 23 с.
23. Уманский С.Р. Генетическая программа клеточной гибели: гипотеза и некоторые приложения (трансформация, канцерогенез, старение) // Усп. совр. биол. – 1982. – 93, вып. 1. – С. 139–148.
24. Цветкова Н.М., Тенцов Б.Г. Механизмы адаптации пойкилотермных животных и растений к экстремальным условиям // Биол. науки. – 1989. – № 5. – С. 14–24.
25. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 1967. – 232 с.
26. Эпштейн Б.С. Искусственное осеменение животных в зоопарках и питомниках. – Пушино: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1984. – 33 с.
27. Ashizawa K., Nishiyama H. Prolonged survival of fowl spermatozoa in organ culture // Brit. Poultry Sc. – 1983. – 24, № 1. – P. 27–32.
28. Ashizawa K., Okauchi K. Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma // J. Reprod. Fert. – 1984. – 71, № 2. – P. 593–598.
29. Bakst M.R. Oviducal storage of spermatozoa in the turkey: its relevance to artificial insemination technology // Brit. Poultry Sc. – 1989. – 30, № 2. – P. 423–429.
30. Bakst M.R. Zinc reduces turkey sperm oxygen uptake *in vitro* // Poultry Sci. – 1985. – 64, № 3. – P. 564–567.
31. Fujihara N., Koga O. Factor(s) influencing the survival of cock spermatozoa *in vitro* // Can. J. Anim. Sci. – 1982. – 62. – P. 951–953.
32. Hidiroglu M., Knipfel J.E. Zinc in mammalian sperm: A review // J. Dairy Sc. – 1986. – 67, № 6. – P. 1147–1156.
33. Howarth B. Influence of neuraminidase on fertility and on sperm storage in the Hen's oviduct // Poultry Sc. – 1990. – 69, № 1. – P. 119–123.
34. Jeyendran R.S., Graham E.F. Effect of cooling and freezing on pH of semen extender // Cryobiology. – 1982. – 19, № 1. – P. 16–19.
35. Salisbury G.W., Hart R.G., Ladge J.R. The spermatozoon // Perspect. Biol. and Med. – 1977. – 20. – P. 372–393.
36. Torska J., Strzezek J. Macromolecular acrosin inhibitor in bull seminal plasma: Biochemical and immunological properties // Biol. Immunol. Reprod. Sofiiy. – 1987. – 13. – P. 88–89.
37. Vijayazaghavan S., Hoskins D.D. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3,5-monophosphate by adenosine and its analogues // Biol. Reprod. – 1986. – 34, № 3. – P. 468–477.
38. Wishart G.I. Physiological changes in fowl and turkey spermatozoa during *in vitro* // Brit. Poultry Sc. – 1989. – 30, № 2. – P. 443–454.
39. Wishart G.I. Maintenance of ATP concentrations in and of fertilizing ability of fowl and turkey spermatozoa *in vitro* // J. Reprod. Fert. – 1982. – 66. – P. 457–482.

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

Поступила 29.10.92

Т.П. ЛИННИК

ПІДХОДИ І ПРИНЦИПИ СТВОРЕННЯ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ СПЕРМИ ПТАХІВ ТА ССАВЦІВ

Інститут проблем криобіології і криомедицини АН України, м.Харків

Приведено огляд досліджень, що стосуються проблеми створення багатокомпонентних кріозахисних середовищ для сперми птахів та ссавців. Викладені основні принципи і підходи щодо розробки середовищ, які використовуються на цей час. Відмічені перспективні напрямки в галузі.

Здійснена спроба систематизувати вимоги щодо властивостей і складу криозахисного середовища в залежності від фізіологічних особливостей спермій конкретного виду тварин.

T.P.LINNIK

APPROACHES AND CREATION PRINCIPLES FOR CRYOPROTECTIVE MEDIA FOR FOWL AND MAMMALIAN SPERM

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences, Kharkov

Studies devoted to the creation of multicomponent cryoprotective media for bird and mammalian sperm are reviewed. Basic principles and approaches to working out the media are discussed. Promising approaches are outlined. An attempt to systematize requirements for the properties and composition of cryoprotective media taking into account physiological features of the sperm of particular animal species has been made.

УДК 619:57.042:57.085.23

Б.Т.Стегний, В.А.Бусол

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И КОНТАМИНАЦИИ МИКОПЛАЗМАМИ НА СОХРАНЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

С целью индикации микоплазм из клеточных культур предлагается использование усовершенствованного бактериологического метода в комплексе с цитохимическим и электронно-микроскопическим. Эффективная деконтаминация от микоплазм достигнута за счет инкубации контаминированных клеток во взвешенном состоянии в микоплазмацидной среде специального состава с последующим их селективным клонированием. Криоконсервирование клеток и тканей рассматривается как технологический процесс, существенным этапом которого является оптимизация условий их восстановления из замороженного состояния.

Стабилизация биологических свойств культивируемых в условиях *in vitro* клеток является непременным условием их успешного использования в вирусологии, молекулярной биологии и биотехнологии. В процессе работы клеточные культуры неизбежно подвергаются воздействию ряда экстремальных факторов (протеолитических ферментов при дезагрегации тканей и снятии клеток с поверхности субстрата во время их пересева, адаптации к новым условиям культивирования, использованию нестандартных компонентов питательных сред, контаминации микроорганизмами, криоконсервированию и др.). При этом в технологическом процессе использования клеточных культур наиболее значимыми и практически неизбежными являются такие воздействия, как криоконсервирование и контаминация микроорганизмами, главным образом микоплазмами. Следовательно, проблема стабилизации клеточных культур тесно связана как с использованием в работе клеток, свободных от микоплазм-контаминантов, так и обеспечением стандартных условий их поддержания путем низкотемпературного консервирования [2, 11].

Существующие в настоящее время методы криоконсервирования клеточных культур в целом обеспечивают сохранность исходных биологических свойств клеток [2, 10, 13, 16]. Между тем для разработки технологического процесса криоконсервирования этих биообъектов имеется настоятельная необходимость в проведении исследований по изучению механизмов криоповреждения, оптимизации условий их подготовки к замораживанию, криозащиты и восстановления из замороженного состояния. В частности, существует потребность в дальнейшем развитии исследований по подбору состава криозащитных сред с высоким эффектом криозащиты и отсутствием побочного цитотоксического действия, в том числе с использованием мембранотропных ве-

ществ [4], по изучению влияния криоконсервирования на цитогенетическую характеристику и чувствительность клеточных систем к вирусам [10, 12]. Кроме того, получение первичных клеточных культур часто затруднено из-за отсутствия возможности получения в нужный момент свежих органов и тканей, что нередко нарушает плановую работу лабораторий, отрицательно сказывается на стандартности экспериментальных исследований [19]. В связи с этим целесообразным представляется создание запаса криоконсервированных тканей для получения из них клеточных культур.

Одним из факторов, вызывающих существенные изменения в клетках культур и затрудняющих проведение исследований, является их контаминация микоплазмами, которая чаще всего протекает латентно. Многочисленные исследования указывают на то, что от 50 до 100% длительно культивируемых клеточных культур контаминированы микоплазмами [3, 9, 14, 17]. Таким образом, при работе с клеточными культурами практически неизбежно приходится сталкиваться с микоплазменной инфекцией, даже в тех случаях, когда предпринимаются самые настойчивые усилия для предотвращения и устранения контаминации. Инфицирование клеток микоплазмами ведет к снижению качества клеточных культур, снижению уровня репродукции вируса в них, что отрицательно сказывается на достоверности и стандартности проводимых с их использованием исследований, а также существенно снижает качество культуральных биопрепаратов [11, 14].

Целью данной работы является, с одной стороны, выбор эффективных и технологически приемлемых методов индикации микоплазм-контаминантов в клеточных культурах и деконтаминации, а с другой стороны, — разработка технологии криоконсервирования клеток и тканей. В работе использовали первично-трипсинизированные клетки: почки плода коровы (ППК), почки плода свиньи (ППС), почки куриного эмбриона (ПКЭ), фибробласты куриного эмбриона (ФКЭ), а также фрагменты почек, легких, кишечника плодов коровы, свиньи, куриные эмбрионы и селезенки ленейных мышей BAIB/c; из перевиваемых линий клеток — почки теленка (ПТ), почки овцы (ПО), легкого эмбриона коровы (ЛЭК), трахеи коровы (ТК), Vero, VNK-21, свиной почки эмбриональной версенизированной (СПЭВ), FLK/BLV, миеломные клетки — RA1 и SR 2/0. Получение первично-трипсинизированных клеток, культивирование и снятие с поверхности субстрата проводили в соответствии с общепринятыми методами [2, 6]. С целью индикации микоплазм в клеточных культурах применяли бактериологический, цитохимический (флюорохромирование ДНК микоплазм оливомицином и реактивом Хехста 33258), цитологические методы (окраска цитопрепаратов по Романовскому-Гимза и электронная микроскопия), а также проводили иммунофлюоресценцию [11].

Для криоконсервации клеток и тканей использовали различные прописи криозащитных сред, включающие в свой состав наряду с традиционными криопротекторами (диметилсульфоксидом (ДМСО), формамидом, глицерином, этиленгликолем (ЭГ), полиэтиленгликолем-1500 (ПЭГ-150), 1,2-пропандиолом (1,2-ПД)) также вновь синтезированные в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины — оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=3$ и $n=5$, ацетамид. Кроме того, на этапах подготовки к замораживанию, восстановления из замороженного состояния и проведения деконтаминации клеток от микоплазм испытывали эффективность введения в состав криозащитных и восстанавливающих сред мембранотропных веществ (пропранолола, дипиридамола, дексаметазона, гидрокортизона, компламина, дроперидола, ацетилсалициловой кислоты и глюкозы).

При этом клетки расфасовывали в металлические и стеклянные контейнеры емкостью от 1 до 100 мл при плотности от 5 до 60×10^6 кл/мл, а фрагменты тканей и органов размером 2–5 мм³ — в контейнеры специальной конструкции емкостью 5–100 мл. После эквilibрации с криозащитной средой в условиях гипотермии клеток в течение 30–40 мин, тканей — 60 мин, осуществляли регулируемое охлаждение в камере аппарата программного замораживания биообъектов по ранее разработанным нами режимам [10].

Пролиферативную способность клеток изучали путем определения митотического индекса, соотношения фаз митоза на 1000 клеток и процента патологических форм их деления [1]. Для проведения цитогенетического анализа клеток препараты хромосом готовили по стандартной методике [5]. Модальное число хромосом определяли подсчетом в не менее чем 50 метафазных пластинках. Чувствительность криоконсервированных клеток к вирусам определяли по титру инфекционной активности [12]. Кроме того, влияние криоконсервирования и микоплазменной контаминации на клетки культуры оценивали путем определения уровня перекисного окисления липидов, активности кислой фосфатазы, кислой рибонуклеазы и 5-моноклеотидазы [15, 18], активности дыхания полярографическим методом с помощью закрытого платинового кислородного электрода Кларка [7], а также уровня аденозинтрифосфата (АТФ) люциферин-люциферазным методом [8]. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с помощью критерия Стьюдента-Фишера. Различия сравниваемых величин считали существенными при $p > 0,05$.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что в инфицированных микоплазмами клеточных культурах морфофункциональные изменения в подавляющем большинстве случаев имеют острый характер, которому предшествует скрытый период течения инфекции. Для начального периода течения микоплазменной инфекции характерно снижение адгезивной способности клеток и заметное подавление их митотической активности (до 7,9%), что сопровождается удлинением сроков формирования сплошного монослоя. В последующем на отдельных участках монослоя появляются пространства без клеток (“окна”), имеющие неровные, изъеденные границы. Затем в монослое появляются широкие свободные пространства, в цитоплазме развивается мелкочаечистая вакуолизация, которая заканчивается образованием более крупных вакуолей с последующим развитием явления плазморексиса.

Опытами по сравнительному исследованию методов индикации микоплазм в клеточных культурах установлено, что с помощью бактериологического метода в комплексе с цитохимическим и электронно-микроскопическим удастся быстро и достаточно надежно выявить контаминацию клеток. Использование предложенной нами селективной питательной среды для выделения микоплазм из клеток, а также концентрирование вероятных контаминантов в исследуемых образцах сыворотки крови и в гомогенате клеток путем их осаждения с помощью ПЭГ-6000 и на мембранах типа “Миллипор” (с диаметром пор 0,22 мкм) и УАМ-500, позволяет повысить чувствительность бактериологического метода, по меньшей мере, в 2–3 раза [11]. Проведенными электронно-микроскопическими исследованиями установлена тесная связь микоплазм с цитоплазматической мембраной клетки, что в известной мере является причиной существующих трудностей, связанных с проведением эффективной деконтаминации. Введение микоплазмацидных препаратов в клеточные суспензии во время их посева, то есть на длительное время в предельно

допустимых дозах для клеток, не обеспечивает эффективной деконтаминации, а лишь ведет к снижению титра микоплазм и чревато появлением резистентных форм микроорганизмов. Вместе с тем рациональным оказалось внесение этих препаратов в клеточную суспензию на ограниченный промежуток времени (от 1 до 4 ч) в ударных дозах с последующим их удалением путем осаждения клеток центрифугированием. При этом деконтаминирующего эффекта можно достичь за счет инкубации клеток в суспензионном состоянии в деконтаминирующей смеси, которая содержит в своем составе микоплазмацидный препарат в ударной дозе (например, гентамицина – 600–800 мкг/мл), димексид, протеолитический фермент и трилон В. Обязательным условием успешной деконтаминации является многократность такой обработки (3–4 цикла) с интервалом 1–2 пассажа. Деконтаминация клеток с помощью макрофагов оказалась эффективной лишь для миеломных линий клеток. В связи с тем, что одним из наиболее вероятных источников контаминации клеточных культур являются коммерческие сыворотки крови животных и трипсин, нами разработан метод их стерилизации в лиофилизированном виде с помощью потока ускоренных электронов в дозе 1,6–2 Мрад.

В последующих экспериментах, касающихся криоконсервирования клеточных культур, установлено, что уровень сохранности культур, замороженных под защитой димексида, оксиэтилированного глицерина (ОЭГ), $n=3$, 1,2-ПД, ЭГ, ПЭГ-1500 и их различных сочетаний, достигал 90% при конечной концентрации криопротекторов в криозащитной среде от 5 до 10%. При этом достоверного улучшения криозащитного эффекта, особенно для первично-трипсинизированных клеток, достигали за счет дополнительного введения в криозащитную среду компламина и гидрокортизона в конечной концентрации от 10^{-2} до 10^{-4} М, а также 2–3%-й глюкозы. Наиболее высокого криозащитного эффекта в отношении фрагментов органов и тканей достигли в случае их 2–3-ступенчатой эквивибрации (по восходящему градиенту концентрации) в криозащитной среде, включающей в свой состав ДМСО и ПЭГ-1500. Учитывая то обстоятельство, что криоконсервированию клеток предшествует наслоение технологически неизбежного повреждающего действия на поверхностные структуры клеточной мембраны трипсина и версена в процессе протеолитической дезагрегации тканей и снятия клеточных культур с поверхности субстрата, проведены эксперименты, направленные на создание оптимальных условий для восстановления возникших повреждений клеток перед их замораживанием, а фрагментов органов и тканей — после размораживания перед проведением их трипсинизации. Из результатов этих исследований следует, что введение перед за-

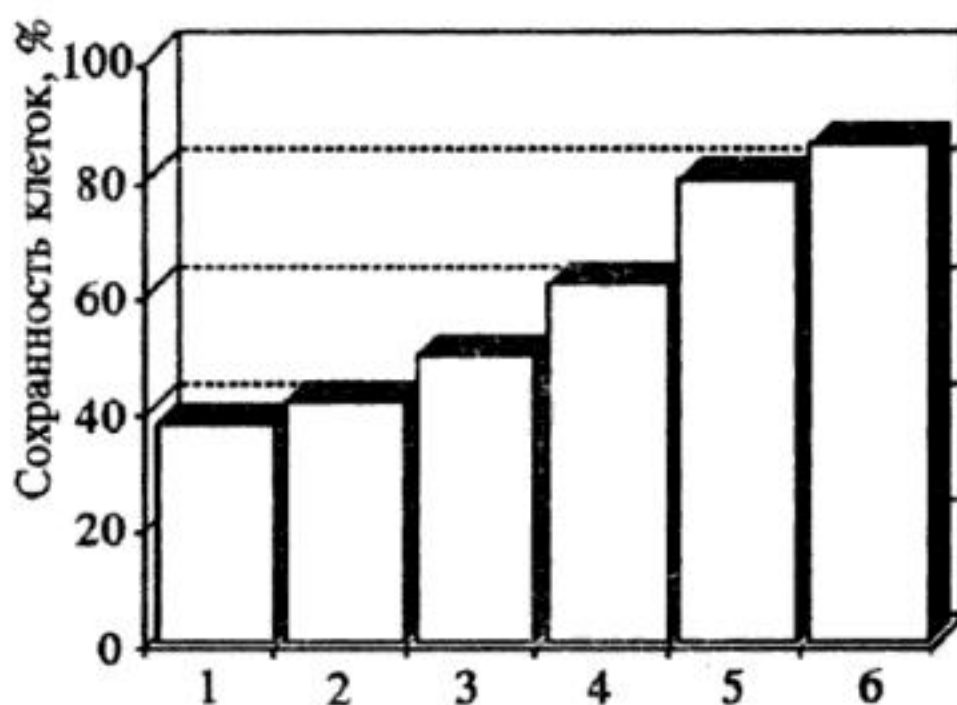


Рис. 1. Влияние инкубирования перед замораживанием клеток в обогащенной питательной среде в течение 2 ч на их сохранность после криоконсервирования: 1 – первичные клетки ППК, не подвергавшиеся инкубации; 2 – первичные клетки ППК, подвергавшиеся инкубации без перемешивания клеток суспензии; 3 – первичные клетки ППК, подвергавшиеся инкубации с перемешиванием в суспензии; 4 – перевиваемые клетки ПТ, не подвергавшиеся инкубации; 5 – перевиваемые клетки ПТ, подвергавшиеся инкубации без перемешивания клеток в суспензии; 6 – перевиваемые клетки ПТ, подвергавшиеся инкубации с перемешиванием в суспензии

мораживанием этапа 2-часового суспензионного инкубирования клеток в питательной среде обогащенного состава позволяет увеличить уровень восстановленных из замороженного состояния клеток на 4–10% и сократить время формирования сплошного монослоя по сравнению с контролем (рис. 1). При восстановлении из замороженного состояния фрагментов тканей целесообразным оказалось оптимизирование

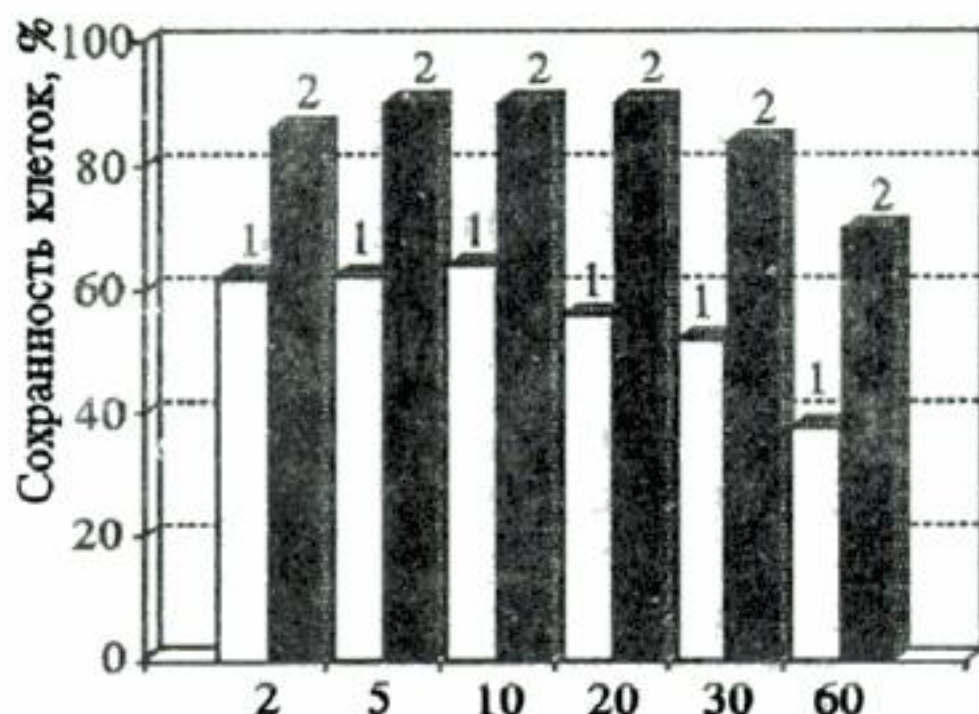


Рис. 2. Влияние исходной концентрации клеток культуры в суспензии на их сохранность после криоконсервирования: 1 – первично-трипси-низированные клетки ППС, 2 – перевиваемые клетки ПО

в обогащенной питательной среде и снижении концентрации криопротектора в градиенте сахарозы как на этапе суспензионного инкубирования, так и в процессе трипсинизации.

Результаты изучения влияния исходной концентрации клеток в суспензии на уровень их сохранности после криоконсервирования показывают, что для первичных культур клеток оптимальной концентрацией является $2-15 \times 10^6$ кл/мл, а для перевиваемых линий — $2-35 \times 10^6$ кл/мл (рис. 2). Значительного улучшения условий восстановления клеточных культур из замороженного состояния достигли за счет того, что их последующее культивирование осуществляли в специально подготовленных культуральных емкостях (экспозиция в них в течение 12–24 ч питательной среды с содержанием 20–30%-й фетальной сыворотки крови или фибронектина из расчета 30–40 мкг/мл) с использованием питательной среды, дополнительно содержащей 20–30% кондиционированной питательной среды, нуклеината натрия (20–30 мкг/мл), селенита натрия (10^{-4} М) и некоторые другие добавки. При этом достоверно сокращается срок восстановления клеток из замороженного состояния за счет повышения митотической активности и уменьшения числа патологических форм деления клеток (табл.)

В клеточных культурах, подвергнутых криоконсервированию и микоплазменной контаминации, отмечается некоторое снижение эндогенного дыхания, увеличение сукцинатстимулированного дыхания, что можно объяснить снижением эффективности окислительного фосфорилирования митохондрий клеток. Однако этот показатель, равно как и незначительное снижение активности ферментов, уровня перекисного окисления липидов и аденозинтрифосфата восстанавливается до исходного уровня после 1–2 последовательных пересевов размороженных клеток и спустя 3–4 восстановительных пассажа после проведения процедуры их деконтаминации от микоплазм. Что касается влияния криоконсервирования и микоплазменной инфекции клеточ-

ным оказалось оптимизирование условий удаления криопротектора с целью предупреждения возможных осмотических эффектов и создание благоприятных условий для репарации сублетальных повреждений в структурах клеток, вызванных последовательно наслаивающимся нежелательным воздействием на них криопротекторов, низкой температуры, процесса размораживания и диспергирующего фермента перед тем, как использовать их в качестве клеточной культуры. При этом наилучшие условия восстановления размороженных тканей были получены при их суспензионном инкубировании в течение 4–5 ч

ных культур на их цитогенетическую характеристику, то следует отметить, что криоконсервирование по неоптимальным программам, длительный контакт с криопротекторами, а также контаминация клеток микоплазмами ведет к изменению числа модального класса хромосом и появлению хромосомных aberrаций.

Митотический индекс клеток перевиваемой линии ПТ после криоконсервации и культивирования в питательных средах различного состава ($n=5$) $M \pm m$

Число пассажей после размораживания клеток	Митотический индекс, %			Количество патологических митозов, %
	через 24 ч	через 48 ч	через 72 ч	
Контроль	19,2±2,1	25,0±1,9	26,1±1,4	4,3±0,8
Культивирование в питательной среде обычного состава:			„	
1-й пассаж	3,4±1,8 $p<0,05$	9,0±0,7 $p<0,05$	17,9±1,3 $p<0,05$	12,7±1,1 $p>0,05$
2-й пассаж	8,9±1,6 $p<0,05$	24,7±1,9 $p>0,05$	28,4±2,0 $p>0,05$	8,9±1,4 $p>0,05$
3-й пассаж	15,3±0,7 $p<0,05$	25,1±2,5 $p>0,05$	26,5±1,4 $p>0,05$	7,1±1,7 $p>0,05$
Высев клеток в емкости со специальной подложкой и культивирование в питательной среде обогащенного состава:			„	
1-й пассаж	3,9±1,4 $p<0,05$	11,7±1,0 $p<0,05$	23,7±1,8 $p>0,05$	11,6±1,3 $p>0,05$
2-й пассаж	18,7±0,9 $p>0,05$	24,9±1,8 $p>0,05$	25,8±1,2 $p>0,05$	5,9±1,0 $p>0,05$
3-й пассаж	20,1±0,9 $p>0,05$	26,9±1,6 $p>0,05$	27,3±1,9 $p>0,05$	4,8±1,1 $p<0,05$

Таким образом, полученные результаты исследований дают все основания рассматривать проблему стабилизации биологических свойств культивируемых в искусственных условиях клеток путем криоконсервирования в контексте с предотвращением их контаминации микоплазмами, что является непременным условием успешной работы создаваемых криобанков клеточных культур, свободных от микроорганизмов-контаминантов и, прежде всего, микоплазм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алов И.А., Аспиз М.Е., Казанцева И.А. Определение митотического режима ткани в патогистологической диагностике предраковых процессов и рака. Метод. указания. – М.: Б.и., 1973. – 14 с.
2. Дьяконов Л.П., Глухов В.Ф., Поздняков А.А. Культура клеток и тканей животных. – Ставрополь: Б.и., 1980. – 110 с.
3. Казан Г.Я. Микоплазмы в патологии человека. Научн. обзор. – М.: Б.и., 1981. – 84 с.
4. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембрансвязанные ферменты: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Харьков, 1985. – 38 с.
5. Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Пинаев Г.П. Характеристика кариотипа постоянной клеточной линии. 2. Изменчивость и сбалансированность хромосомного набора клеток *Hela* // Цитология. – 1986. – 28. – С. 193–203.
6. Методы культивирования клеток / Под ред. Г.П. Пинаева. – Л.: Наука, 1988. – 319 с.

7. *Мохова Е.Н.* Использование различных тканевых препаратов при полярографическом изучении дыхания и сопряженных с ним реакций. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М.: Б. и., 1973. – С. 175–189.
8. *Петренко А.Ю., Гришук В.П., Сукач А.Н. и др.* Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // Биохимия. – 1989. – 54, № 10. – С. 1750–1753.
9. *Стегний Б.Т.* Методы индикации микоплазм в клеточных культурах и их деконтаминация // Ветеринария. – Киев: Урожай, 1992, вып. 57. – С. 56–58.
10. *Стегний Б.Т.* Криоконсервирование первичных клеточных культур и тканей для вирусологических исследований: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Владимир, 1982. – 29 с.
11. *Стегний Б.Т.* Методические рекомендации по индикации, деконтаминации и предотвращению микоплазменной инфекции клеточных культур. – Харьков: Б. и., 1991. – 18 с.
12. *Сюрин В.Н.* Руководство по ветеринарной вирусологии. – М.: Колос, 1966. – 686 с.
13. *Цуцаева А.А.* Криоконсервирование клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1983. – 239 с.
14. *Barile M.F., Mc Garryty G.J.* Isolation of mycoplasmas from cell cultures by agar culture and liquing medium techniques // Methods in mycoplasmatology. – 1983. – 2. – P. 159–166.
15. *Bodansky O.* Acid phosphatase // Adv. Clin. Chem. – 1975. – 15. – P. 43–47.
16. *Kendall O.S.* Low-temperature storage of surface-attached living cell culture // Cryobiology. – 1981. – 18, № 4. – P. 251–257.
17. *Mc Garryty G.J., Kotani H.* Cell culture mycoplasmas. – Orlando, 1985. – 4. – P. 353–390.
18. *Lesko L., Donlon M., Merinetti G.V.* A rapid method for the isolation of rat liver plasma membranes using an aqueous two-phase polymer system // Biochim. et Biophys. Acta. – 1973. – 311, № 2. – P. 173–179.
19. *Ratnamohan N., Shradbrow P.B.* Preservation of avian cells at subzero temperatures // Austr. J. Biol. Sci. – 1979. – 32. – P. 475–481.

Ин-т экспериментальной и клинической ветеринарной
медицины Украинской академии аграрных наук, г. Харьков

Поступила 15.04.93

Б.Т. СТЕГНИЙ, В.О. БУСОЛ

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ І КОНТАМІНАЦІЇ МІКОПЛАЗМАМИ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ЯКОСТЕЙ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини,
Українська академія аграрних наук, м.Харків

З метою індикації микоплазм з клітинних культур пропонується використання удосконаленого бактеріологічного методу в комплексі із цитохімічним і електронно-мікроскопічним. Ефективна деконтамінація від микоплазм досягнута за рахунок інкубації контамінованих клітин у зваженому стані в микоплазмацидному середовищі спеціального складу з наступним їх селективним клонуванням. Криоконсервування клітин і тканин розглядається як технологічний процес, істотним етапом якого є оптимізація умов їх відновлення із замороженого стану.

B.T. STEGNIY, V.A. BUSOL

THE INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION AND MYCOPLASMA CONTAMINATION ON THE STABILITY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CELL CULTURE

Institute of experimental and clinical veterinary medicine of the Ukrainian
academy of agrarian sciences, Kharkov

A combination of improved bacteriological method with cytochemical and electron microscopic methods is suggested to indicate Mycoplasma in cell culture. The effective decontamination from Mycoplasma was achieved by incubating suspended contaminated cells in a special mycoplasma acid medium and further selective cloning. Cryopreservation of cells and tissues is considered as a technological process whose important stage is the optimization of cell recovery after freezing.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.352.4:57.043

С.Х.Межидов, В.А.Моисеев

О ВЛИЯНИИ СОСТАВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО РАСТВОРА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

До настоящего времени не изучены до конца причины, приводящие к нарушению проницаемости мембран эритроцитов для гемоглобина (гемолиз) в растворах как проникающих, так и не проникающих в клетку веществ при медленных скоростях замораживания. Как проникающие в клетку низкомолекулярные, так и не проникающие высокомолекулярные криопротекторы связывают воду, уменьшают концентрацию солей вне клеток, способствуют образованию мелкокристаллического льда и т. д. [1, 2, 3], но тем не менее в их присутствии нарушается проницаемость мембран и происходит выраженное повреждение эритроцитов при медленных скоростях замораживания [1, 2, 3].

С нашей точки зрения одной из причин, приводящей к нарушению проницаемости мембран эритроцитов для гемоглобина, может быть высокое осмотическое давление, создаваемое внеклеточной средой на мембране по мере вымораживания внеклеточной воды и концентрирования вне клетки электролитов и неэлектролитов. При проверке данного предположения исходили из следующих соображений: 1) если в двух- или многокомпонентной системе присутствуют кристаллы льда и она находится в равновесном состоянии, то при данной температуре химический потенциал раствора имеет постоянное значение и не зависит от состава раствора; 2) если осмотическое давление, создаваемое внеклеточным раствором на мембране при замораживании, является ведущим фактором, приводящим к нарушению проницаемости мембраны и повреждению клеток, то в растворах с различными непроницаемыми веществами нарушение проницаемости и соответственно количество разрушенных клеток должно быть одинаковым.

Эксперименты проводились на эритроцитах донорской крови человека 3–4 сут хранения при 4 °С. Эритроциты отмывали 3 раза 1:1 физиологическим раствором хлорида натрия. Центрифугирование проводилось при 3000 об/мин 10–15 мин. После отмывки к одной части эритроцитарной массы 1:1 добавляли физиологический раствор хлорида натрия (электролит), а к другой – 20%-й поливинилпирролидон-12600±2700 (ПВП-12600±2700, неэлектролит-криопротектор), приготовленный на физиологическом растворе хлорида натрия. Суспензии эритроцитов помещали в стеклянные пробирки диаметром 7,3±0,3 мм и длиной 80±2 мм, а затем в программный замораживатель УОП-8 производства ИПКиК АН Украины. Охлаждение проводили со скоростью 0,4 °С/мин и для предупреждения повреждения клеток из-за переохлаждения и внутриклеточной кристаллизации [1, 2, 3] производили затравку кристаллом льда при –2÷–3 °С. Образцы охлаждали до (–13±0,5) °С и отогревали со скоростью 0,2 °С/мин до (–7,5±0,5) °С для того, чтобы процесс кристаллообразования в образцах завершился и система стала равновесной, так как в растворах с высокомолекулярными веществами процесс кристаллизации идет очень медленно [4]. При этой температуре образцы выдерживались 20 мин и отогревались со скоростью 0,2 °С/мин. Отогрев проводился медленно, так как в растворе, содержащем высокомолекулярный ПВП-12600 коэффициент самодиффузии воды заведомо ниже, чем в растворе хлорида натрия, что могло повлиять на получаемый результат в силу различий в скорости регидратации клеток. Нарушение проницаемости мембран эритроцитов для гемоглобина определялось по отношению количества гемоглобина в надосадке к общему количеству (гемолиз). Гемолиз определяли на ФЭК-56М. В физиологическом растворе хлорида натрия гемолиз составил (82±10) % (n=4), а в растворе, содержащем 20%-й ПВП-12600, – (80±7) % (n=4). Из результатов эксперимента видно, что различия в гемолизе нет. Таким образом, можно сделать вывод, что одним из факторов, приводящих к нарушению проницаемости мембран эритроцитов для гемоглобина и повреждению эритроцитов, является осмотический и что высокомолекулярный криопротектор ПВП-12600 ведет себя при медленных скоростях замораживания так же, как и хлорид натрия. Полученный результат имеет важное значение для понимания механизмов криозащиты и криоповреждения как для высокомолекулярных не проникающих в клетку, так и низкомолекулярных проникающих в клетку криопротекторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы криобиологии / Под ред. Н.С. Пушкаря, А.М. Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608 с.
2. Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С. Криоконсерванты. – Киев: Наук. думка, 1979. – 198 с.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – Киев: Наук. думка, 1978. – 202 с.

4. Williams R.J. The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity // Cryobiology. – 1983. – 20. – P. 521–526.

Работа выполнена в рамках приоритетного финансирования ГКНТ Украины по теме: “Исследование проницаемости эритроцитов для электролитов и неэлектролитов с целью определения вклада в нее мембраны и физико-химических свойств внутри- и внеклеточной среды”.

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

Поступило 04.11.92

57.043:612.111.014.43

Н.И.Песина

РАЗВИТИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ К ОХЛАЖДЕНИЮ В СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ НЕЭЛЕКТРОЛИТЫ

Одним из главных факторов, контролирующих холодовую и осмотическую чувствительность клеток, является их объем к моменту охлаждения и действия гипертонического стресса [3, 4]. При этом изменения клеточного объема связывают с осмотическим ответом клетки на сдвиг осмолярности наружной среды. Практически не исследованы процессы, модулирующие объем клеток и имеющие в своей основе изменение полупроницаемых свойств мембраны. Существует предположение, что чувствительность клеток к изменениям температурных и осмотических условий среды зависит не только от объемной дегидратации, но и от степени обезвоживания полимерного белкового слоя, формирующего цитоскелет клетки [1]. Предполагается, что критической фазой обезвоживания клеток является достижение состояния, когда из них удаляется объемная вода и развивается дегидратация белкового геля [2]. Однако конкретный вклад белковых структур цитоскелета как опорной системы клетки в механизм развития неустойчивости мембраны при сдвиге температурных и осмотических параметров среды до сих пор не прояснен.

Как показали результаты наших экспериментов, при дегидратации в растворах, содержащих неэлектролиты, фактором, контролирующим чувствительность эритроцитов к холодовому и осмотическому воздействию, помимо осмолярности и температуры среды, является продолжительность экспонирования клеток в этих средах. Продолжительность инкубации является фактором, определяющим критическую границу осмолярности, выше которой происходит нарушение барьерных свойств мембраны и развивается холодовой шок. Продолжительность инкубации контролирует холодовую чувствительность в определенных интервалах осмолярности (до 1000 мОсм). Показано, что кинетика сенсibilизации эритроцитов к охлаждению в неэлектролитных средах имеет две фазы – начальную фазу возрастания чувствительности и фазу максимальной чувствительности, не меняющейся во времени. При этом первая фаза соответствует периоду, в пределах которого скорость освобождения внутриклеточного калия достаточно велика. Степень сенсibilизации эритроцитов к охлаждению коррелирует с уровнем выхода внутриклеточного электролита. Введение электролитов в неэлектролитные среды изменяет характер ответа эритроцитов на продолжительное экспонирование в гиперосмотических средах и динамику сенсibilизации к охлаждению. В зависимости от концентрации электролита в неэлектролитной среде, влияние продолжительности контакта клеток со средой на развитие чувствительности к охлаждению имеет двухфазный характер. По мере увеличения продолжительности инкубации эритроцитов в среде, содержащей 0–100 мМ KCl (или NaCl), чувствительность клеток к охлаждению возрастает. При введении в среду 150–450 мМ соли чувствительность к холодовому воздействию уменьшается. В последнем случае клетки демонстрируют увеличение объема по отношению к имеющемуся в условиях неэлектролитной дегидратации.

Установлено, что процесс выхода внутриклеточного калия сопровождается дополнительным, по отношению к осмоиндуцированному, уменьшением клеточного объема. Наиболее этот процесс выражен в 0,3–0,5 М растворах сахарозы, при повышении осмолярности среды до 0,7–0,8 М на фоне значительной осмотической дегидратации K^+ -индуцированные изменения объема становились минимальными. При введении в неэлектролитную среду 150 мМ соли K^+ -индуцированные изменения объема отсутствовали, равно как и отток внутриклеточных электролитов.

Процесс выхода внутриклеточного калия в условиях неэлектролитной дегидратации сопровождается смещением кислотно-основного равновесия клетки в сторону уменьшения pH , что приводит к повышению чувствительности эритроцитов к осмотическому и холодовому воздействию. Глубина развития указанных процессов зависит от кислотности сред, в которых клетки экспонируются перед охлаждением. Наибольшая степень закисления внутриклеточного содержимого регистрируется к моменту развития наибольшего дефицита клеточных катионов и максимальной чувствительности к охлаждению. Дополнительным эффектом закисления цитозоля явилось дальнейшее уменьшение клеточного объема. Введение солей или повышение pH инкубационной сре-

ды до щелочных значений блокировало это уменьшение. Как показали результаты наших экспериментов, структурной основой подобной феноменологии может быть протонирование и конденсирование цитоскелета, являющегося ионным гелем [5]. Снижение pH среды приводит к агрегированию изолированных цитоскелетных комплексов; при приближении к $pH=5$ – изоэлектрической точке спектрина – процесс достигает максимальной интенсивности. Наибольшие изменения в электрофоретическом спектре белков тканей эритроцитов регистрировались к моменту наибольшего развития кислотных и ионных изменений, а также максимальной чувствительности к охлаждению. При $pH=5$ к 180-й мин инкубации полоса спектрина представляла собой комплекс агрегатов. Повышение pH среды позволяло сохранить полосу спектрина почти в нативном виде. При снижении pH среды наблюдается кренирование эритроцитов, а при достижении $pH=5$ отмечается резкое уменьшение коэффициента сферичности, клетки и тени трансформируются в сферы, что может отражать нарушение прикрепления цитоскелета к мембране.

Показано, что процессы, имеющие в своей основе нарушение полупроницаемых свойств мембраны проявляют себя в случае низкотемпературной инкубации ($T=-10^{\circ}\text{C}$) и замораживании до -196°C .

Подводя итог, можно заключить, что степень сенсibilизации эритроцитов к охлаждению и гиперосмотическому стрессу может контролироваться двумя группами процессов: процессами, связанными с осмотическим обезвоживанием клеток, и процессами, имеющими в своей основе нарушение полупроницаемых свойств мембраны, что приводит к освобождению электролитов. Последнее сопровождается дополнительным, по отношению к осмоиндуцированному, уменьшением клеточного объема.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.А. Развитие и предупреждение температурного шока эритроцитов: Автореф. дис...д-ра биол. наук. – Харьков, 1989. – 26 с.
2. Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П., Руденко С.В. Эффекты дегидратации в контроле холодной и осмотической чувствительности клеток // Проблемы криобиологии. – 1992. – № 4. – С. 14–25.
3. McGrath J.J. Cold shock injury // Cryo-Lett. – 1985. – 6, № 4. – P. 211–215.
4. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. – 1971. – 8, № 5. – P. 489–500.
5. Stokke B.T., Mikkelsen A., Elgsaeter A. The human erythrocyte membrane skeleton may be an ionic gel. 1. Membrane mechanochemical properties // Eur. Biophys. J. – 1986. – 13, № 4. – P. 203–219.

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

Поступило 05.07.93

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИЙ

В специализированном совете при Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины в мае 1993 г. защищена диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук Т.М. Гуриной на тему: “Исследование фазового состояния замороженных растворов криопротекторов, клеточных суспензий и тканей методом термопластической деформации”, в которой разработан новый метод для изучения фазовых и структурных переходов в замораживаемых биосистемах – метод термопластической деформации, позволяющий впервые исследовать не только кинетику этих процессов, но и определять упруго-пластические свойства системы, связанные с этими переходами. Создана оригинальная установка с набором деформационных приставок для реализации метода термопластической деформации в криобиологическом эксперименте. Впервые проведено изучение термопластических свойств целого ряда растворов криопротекторов и биосистем в широких интервалах температур и внешних напряжений. На водных растворах криопротекторов обнаружено новое явление их заторможенного низкотемпературного эвтектического расслоения. Рассмотрен механизм действия этого явления как одного из основных повреждающих факторов при криоконсервировании биосистем с суммарной концентрацией криопротекторных веществ до 30%.

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

4¹⁹⁹³

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.

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

ISSN 0233-7673. ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1993. № 4. 1-56 ИНДЕКС 70474