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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

3
1999

ISSN 0233-7673

National Academy of Sciences of the Ukraine
Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental and Clinical Physiology
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ




# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ
# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

*Национальная Академия наук Украины*
*Отделение молекулярной биологии, биохимии, экспериментальной и клинической физиологии*
*Институт проблем криобиологии и криомедицины*
*Научно-теоретический журнал*
*Основан в 1985 году*
*Выходит 4 раза в год*

*National Academy of Sciences of the Ukraine*
*Department of Molecular Biology, Biochemistry, Experimental And Clinical Physiology*
*Institute For Problems of Cryobiology and Cryomedicine*
*Scientific and theoretical journal*
*Founded in 1985*
*Quarterly published*



**Главный редактор В. И. ГРИЩЕНКО**

**Редакционная коллегия**

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

**Редакционный совет**

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

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

**Editorial Board**

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

**Editorial Council**

A. D. Bugrov
P. A. Kaliman
V. V. 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



**Свидетельство о государственной регистрации:**
**Серия КВ, № 98 от 23.09.93**



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

e-mail; cryo@online.kharkov.ua



**State Registration Certificate:**
**KB Series № 98 of 23.09.93**



Address of the Editorial Office: *23, Pereyaslavskaya str., 310015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua



Матеріал, захищений авторським правом

3
1999

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

*Катков И. И.* Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. II. Объем воды и внутриклеточная концентрация проникающих криопротекторов в точках максимального отклонения объема в системах со многими растворенными веществами . . . . . 3

*Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Орлова Н. В.* Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку . . 10

*Микулинский Ю. Е.* Регуляция активности белков холодового шока . . . . . 16

*Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения . . . . . 21

*Загнойко В. И.* О гипометаболическом влиянии фракции эпителия кишечника зимнеспящего суслика *C. undulatus* на консервирование эмбрионов млекопитающих . . . . . 27

*Нардид О. А.* Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов . . . . . 31

*Кравченко Л. П., Семенченко О. А., Семенченко А. Ю., Белоус А. М.* Влияние водно-солевого экстракта плаценты человека на сохранность изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии . . 35

*Цуцаева А. А., Высеканцев И. П., Дарченко А. Л.* Динамика репаративных процессов в бактериях *Escherichia coli* после лиофилизации . . . . . 39

*Зинченко А. В., Зинченко В. Д.* Исследование акустической эмиссии в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при охлаждении–нагреве . . . . . 43

*Кощий С. В., Луговой В. И., Компаниец А. М., Николенко А. В.* Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина . . . . . 46

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

*Керос В. А.* Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии . . . . . 54

### КРИОМЕДИЦИНА

*Грищенко В. И., Щербина Н. А., Лазуренко В. В.* Некоторые аспекты применения локальной гипотермии в акушерско-гинекологической практике . . . . . 59

*Питько В. А.* Исследование влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе . . . . . 64

*Потапова Л. В.* Влияние имплантаций криоконсервированной ткани тимуса на иммунореактивность организма больных эндометриозом . . . . . 69

*Винник Ю. А., Котенко А. Е., Чибисов Л. П.* Интраоперационное криовоздействие в лечении рака прямой кишки . . . . . 72

### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

*Сынчикова С. П.* Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу . . . . . 77

*Бондаренко В. А., Кутиков А. Е., Никишкова И. Н.* Электроэнцефалограмма и морфофункциональные особенности головного мозга животных разного возраста при общем охлаждении . . . 80

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1999

Матеріал, захищений авторським правом

3
1999

# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

## CONTENTS

**THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY**

*Katkov I. I.* Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. II. Water Volume and Intracellular Concentration of Permeable Cryoprotectants at Points of Maximum Volume Excursions in Multi-Solute Systems 3

*Shpakova N. M., Pantaler E. R., Orlova N. V.* The Effect of Dodecyl-β,D-maltozide on the Resistnace of Preliminarily Dehydrated Erythrocytes to Hyperosmotic and Cold Shock . . . . . 10

*Mikulinsky Yu. E.* The Activity of Cold Shock Protein Regulation . . . . . 16

*Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of α-GPDG Activity in Cells of Growing and Regenerating Epithelium of Cornea in its Hypothermal Storage Procces . . . . . 21

*Zagnoyko V. I.* On Hypometabolic Effect of Intestine Epithelium Fraction of *C. undulatus* Hibernating Ground-Squirrel on Mammalian Embryos Cryopreservation . . . . . 27

*Nardid O. A.* The Effect of Freezing on Structural and Functional Properties of Some Hemoproteins 31

*Kravchenko L. P., Semenchenko O. A., Semenchenko A. Yu., Belous A. M.* The Effect of Aqueous and Saline Human Placenta Extraction Product on the Integrity of Isolated Hepatocytes Under the Hypothermia Conditions . . . . . 35

*Tsutsayeva A. A., Vysekantsev I. P., Darchenko A. L.* The Dynamics of Reparative Processes in the *Escherichia Coli* Bacteria after Lyophilization . . . . . 39

*Zinchenko A. V., Zinchenko V. D.* Investigation of an Acoustic Emission in Glycerol and 1,2-Propanediol Aqueous Solutions under Cooling and Heating . . . . . 43

*Koschiy S. V., Lugovoy V. I., Kompaniyets A. M., Nikolenko A. V.* Cryoprotectants of Glycerol Alkoxy-Substituted Compound Series . . . . . 46

**CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS**

*Keros V. A.* Cryopreservation of Human Fetus Testicular Tissue and Low Temperature Bank Creation for Further Application in Clinical Transplantology . . . . . 54

**CRYOMEDICINE**

*Grischenko V. I., Scherbina N. A., Lazurenko V. V.* Some Aspects of Local Hypothermia Application in Obstetrical and Gynaecological Practice . . . . . 59

*Pit'ko V. A.* The Study of the Effect of Chorion Cryoextraction and Placenta Extraction Products on Morphological Indices during Experimental Inflammatory Process . . . . . 64

*Potapova L. V.* Effect of Thymus Cryopreserved Tissue Implantations on Immune Reactivity of Patients' Organism with Endometriosis . . . . . 69

*Vinnik Yu. A., Kotenko A. E., Chibisov L. P.* Intraoperative Cryoeffect When Treating Rectal Cancer . 72

**BRIEF COMMUNICATIONS**

*Synchykova O. P.* Glucopyranosides Effect on Human Erythrocyte Resistance to Hyperosmotic Stress 77

*Bondarenko V. A., Kutikov A. E., Nikishkova I. N.* Electroencephalogram and Morphofunctional Peculiarities of Animals' Brain of Different Age at General Cooling . . . . . 80

© Translated from Russian by *E. N. Pushkova*

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 1999

Матеріал, захищений авторським правом

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ**

**THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY**

UDC 57.043

# Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. II. Water Volume and Intracellular Concentration of Permeable Cryoprotectants at Points of Maximum Volume Excursions in Multi-Solute Systems

Igor I. KATKOV

*Semen and Embryo Preservation Laboratory of Universal Preservation Technologies, Inc.*

# Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. II. Объем воды и внутриклеточная концентрация проникающих криопротекторов в точках максимального отклонения объема в системах со многими растворенными веществами

И. И. КАТКОВ

*Лаборатория сохранения спермы и эмбрионов, универсальные технологии сохранения, Инк.*

A two-parameter model of cell osmotic response (*Cryobiology*.– 1998.– 37.– P. 217–298) is expanded for multi-solute systems. The cell water volume $W$ and intracellular osmolalities of $N$ solutes are related as $W[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_i/P_i)] = W_0[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_{0i}/P_i)]$, where $M_i$ is the intracellular osmolality of the $i$-th solute ($i = 1, ..., N$), $P_i$ is the membrane permeability of the $i$-th solute, $L_p$ is the membrane hydraulic conductivity, $R$ is the gas constant, $T$ is the absolute temperature, and the subscript 0 denotes the initial values at time zero. Given formula allows calculating the final (equilibrium) volume when all entities are permeable. Simple algorithms for calculation of number and magnitude of transient maximum volume excursions are presented. Practical examples of one-, two-, and three- solute systems are discussed. Special attention is paid to situations when systems contain an impermeable component. All formulas are simple to use for optimization of variety of cryobiological protocols.

Расширено применение двупараметрической модели осмотической ответной реакции клеток (*Cryobiology*.– 1998.– 37.– P. 217–298) для систем со многими растворенными веществами. Объем клеточной воды $W$ и внутриклеточных осмоляльностей растворенных веществ $N$ рассматривается как $W[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_i/P_i)] = W_0[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_{0i}/P_i)]$, где $M_i$ — внутриклеточная осмоляльность $i$-го растворенного вещества ($i = 1, ..., N$); $P_i$ — проницаемость мембраны $i$-го растворенного вещества; $L_p$ — гидравлическая проводимость мембраны; $R$ — газовая постоянная; $T$ — абсолютная температура, нижний индекс 0 обозначает начальные величины при нулевом времени. Данная формула позволяет вычислить окончательный (равновесный) объем, когда все вещества являются проницаемыми. Представлены простые алгоритмы для расчета количества и величины переходных максимальных объемных отклонений. Обсуждаются практические примеры систем с одним, двумя и тремя растворенными веществами. Особое внимание уделяется ситуациям, когда система содержит непроницаемый компонент. Все формулы просты для использования при оптимизации разнообразия криобиологических протоколов.

Розширено застосування двопараметричної моделі осмотичної реакції клітин у відповідь (*Cryobiology*.– 1998.– 37.– P. 217–298) для систем з багатьма розчиненими речовинами. Об'єм клітинної води $W$ і внутрішньоклітинних осмоляльностей розчинених речовин $N$ розглядається як $W[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_i/P_i)] = W_0[1+L_p RT\sum_{i=1}^{N}(M_{0i}/P_i)]$, де $M_i$ — внутрішньоклітинна осмоляльність $i$-ї розчиненої речовини ($i = 1, ..., N$); $P_i$ — проникність мембрани $i$-ї розчиненої речовини; $L_p$ — гідравлічна провідність мембрани; $R$ — газова стала; $T$ — абсолютна температура, нижній індекс 0 означає початкові величини при нульовому часі. Дана формула дозволяє обчислити остаточний (рівноважний) об'єм, коли всі речовини є проникними. Обговорюються практичні приклади систем з однією, двома і трьома розчиненими речовинами. Особливу увагу приділено ситуаціям, коли система містить непроникний компонент. Усі формули прості для використання при оптимізації різноманітності кріобіологічних протоколів.

## Introduction

Recent excellent review (15) gave a "second breath" to the discussion which approach is more appropriate or convenient for modeling of cell membrane permeability. It was convincingly shown that in many cases a two-parameter model is an appropriate and in some cases, is only way to describe the cell osmotic response. It is also consonant with criticism expressed



Матеріал, захищений авторським правом

in [1]. Inapplicability of the Kedem–Katchalsky formalism for independent pathways was briefly discussed in our recently submitted work [4], and will be explored in details elsewhere. Here, we will show how the use of a similar (though non-identical) two-parameter approach allows modeling of cell osmotic response in a multi-solute system that contains solutes with different membrane permeability. Special attention is paid to situations when the system contents an impermeable component ("salts"). As it is seen below, formulas obtained from this development are easy to calculate without using sophisticated software. They can be used by in a wide range of applied cryobiological problems.

## General consideration

***Basic derivations***. Consider a cell with surface area $A$ and initial water volume $W_0$. Intracellular osmolalities of $i = 1, 2, ..., N$ solutes are $M_{01}$, $M_{02}$, ..., $M_{0N}$ respectively. The cell membrane water permeability equals $L_p RT$, where $L_p$ is the membrane hydraulic permeability, $R$ is the gas constant and $T$ is the temperature. The cell at time zero is placed in an iso-thermal bath with the same temperature $T$. The bath also contains $N$ solutes with molal concentrations $M_{f1}$, $M_{f2}$, ..., $M_{fN}$, where subscript $f$ means that the intracellular final concentrations of the solutes will be equal their extracellular concentrations after full equilibration. The membrane permeability to the $i$-th solute is $P_i$. The solute permeabilities are set as $P_1 > P_2 > ... > P_N$. We consider diluted solutions, i.e. the osmotic and activity coefficients are set to be 1 for all solutes at any time of osmotic response. That means that osmolalities and activities of the solutes equal to their molal concentrations. We also assume no interaction between solutes and water passing across the membrane (independent pathways), and a two-parameter model of osmotic response is applicable (see [5] for justification of the chosen method).

The water flux is described by

$$\frac{dW}{dt} = -L_p RTA \sum_{i=1}^{N} (M_{fi} - M_i), \qquad (1)$$

where $W$ and $M_i$ are the actual value of water volume and intracellular osmolality of the $i$-th solute at time $t > 0$.

The solute fluxes of the 1, 2, ..., $i$, ..., $N$ solutes are described by

$$M_1 \frac{dW}{dt} + W \frac{dM_1}{dt} = P_1 A(M_{ft} - M_1), \qquad (2)$$

$$M_i \frac{dW}{dt} + W \frac{dM_i}{dt} = P_i A(M_{ft} - M_i), \qquad (3)$$

$$M_N \frac{dW}{dt} + W \frac{dM_N}{dt} = P_N A(M_{ft} - M_N). \qquad (4)$$

For convenience, we will operate when it is necessary with normalized to isotonic values of water volume and osmolality, such as $w \equiv W/W_{iso}$ and $m \equiv M/M_{iso}$, where $W_{iso}$ is the isotonic volume of the intact cell, and $M_{iso}$ is the isotonic osmolality. We also introduce characteristic time $\tau_{iso} \equiv W_{iso}/(L_p RTM_{iso})$. The actual time can be normalized and expressed as dimensionless argument $q = t/t_{iso}$. Then equations (1)–(4) can be re-written as follows:

$$\frac{dw}{dq} = -\sum_{i=1}^{N} (m_{fi} - m_i), \qquad (5)$$

$$m_1 \frac{dw}{dq} + w \frac{dm_1}{dq} = c_{rp1} (m_{f1} - m_{m_1}), \qquad (6)$$

$$m_i \frac{dw}{dq} + w \frac{dm_i}{dq} = c_{rpi} (m_{fi} - m_{m_i}), \qquad (7)$$

$$m_N \frac{dw}{dq} + w \frac{dm_N}{dq} = c_{rpN} (m_{fN} - m_{m_N}), \qquad (8)$$

where $c_{rpi} \equiv C_{rpi}/M_{iso} \equiv (P_i/L_p RT)/M_{iso}$ is the "relative permeability term" $C_{rpi}$ normalized to the isotonic osmolality. $C_{rpi}$ reflects membrane permeability to the $i$-th solute compared with the membrane water permeability. The relative permeability term is measured in molality units, e.g., in mol/kg $H_2O$ [3]. The other expression of $C_{rp}$ is $\omega/L_p$, where $\omega$ is the solute mobility. Eventhough this model does need the reflection coefficient, it is also useful to mention that $C_{rp} \upsilon_s = 1 - \sigma_{Nl}$, where is $\upsilon_s$ the partial molar volume of the solute, and $\sigma_{Nl}$ is the reflection coefficient for non-interaction case as described in [1, 5]. As we can see, this model operates with one parameter, namely, the relative water-to-solute permeability ratio that fully determines the pattern of osmotic response. To certain extend, such approach can be called as a "1-parameter" formalism. However, for kinetic measurements, one has to measure or calculate $L_p$ or $P_s$ independently. For example, $L_p$ and, subsequently, $\tau_{iso}$ can be calculated from osmotic reaction of the cell in a non-permeable solute, while $C_{rp}$ can be calculated from the level of maximum shrinkage in a two-component system [2].

Dividing each part of Eqs. (6)–(8) on $c_{rpi}$ ($i = 1, 2, ..., N$) respectively we obtain a system of equations:

$$\frac{dw}{dq} = -\sum_{i=1}^{N} (m_{fi} - m_i), \qquad (9)$$

$$\frac{m_1\, dw/dq + w\, dm_1/dq}{c_{rp1}} = m_{f1} - m_{m_1}, \qquad (10)$$

$$\frac{m_i\, dw/dq + w\, dm_i/dq}{c_{rpi}} = m_{fi} - m_{m_i}, \qquad (11)$$



Матеріал, захищений авторським правом

$$\frac{m_N\,dw/dq + w\,dm_N/dq}{c_{rpN}} = m_{fN} - m_N\,. \qquad (12)$$

Combining together Eqs. (10)–(12) and taking to advantage that $dm/dq = (dm/dw)(dw/dq)$, we obtain follows coupled equations:

$$\frac{dw}{dq} = -\sum_{i=1}^{N}(m_{fi} - m_i)\,, \qquad (13)$$

$$\sum_{i=1}^{N}\left[\frac{1}{c_{rpi}}\left(m_i\frac{dw}{dq} = w\frac{dm_i}{dw}\cdot\frac{dw}{dq}\right)\right] = \sum_{i=1}^{N}(m_{fi} - m_i)\,. \qquad (14)$$

Substituting (9) to (14), and after simplification it yields:

$$\sum_{i=1}^{N}\left[\frac{1}{c_{rpi}}\left(m_i + w\frac{dm_i}{dw}\right)\right] = -1\,. \qquad (15)$$

General solution of Eq. (15) is:

$$w\left(1 + \sum_{i=1}^{N}\frac{m_i}{c_{rpi}}\right) = \text{const}. \qquad (16)$$

Satisfying initial conditions mentioned above, we obtain:

$$w\left(1 + \sum_{i=1}^{N}\frac{m_i}{c_{rpi}}\right) = w_0\left(1 + \sum_{i=1}^{N}\frac{m_{0i}}{c_{rpi}}\right). \qquad (17a)$$

For absolute (non-normalized) values this equation can be rewritten as follows:

$$W\left(1 + L_p RT\sum_{i=1}^{N}\frac{M_i}{P_i}\right) = W_0\left(1 + L_p RT\sum_{i=1}^{N}\frac{M_{0i}}{P_i}\right). \qquad (17b)$$

In derivation of Eqs. (17), we implicitly assumed that $dw/dq \neq 0$. Simulations of Eqs. (1)–(4) and Eqs. (5)–(8) showed that the Eqs. (17) are also valid at the points when $dw/dq = 0$ (points of transient maximum or minimum).

***Final (equilibrium) volume***. At the equilibrium ($q \to \infty$) the intracellular final osmolalities of all $N$ solutes are equal to their extracellular values $m_{fi}$ on definition. Thus, the final (equilibrium) water volume will be:

$$w_f = \frac{1 + \sum_{i=1}^{N}(m_{0i}/c_{rpi})}{1 + \sum_{i=1}^{N}(m_{fi}/c_{rpi})}\,. \qquad (18)$$

Now, we consider the case when one of the solutes is quasi-**impermeable** in the period of time observed during experiments. We assume that $P_N \to 0$, while other entities are permeable ($P_1, P_2, ..., P_{N-1} \neq 0$). Equation (17a) transforms to follows:

$$wm_N = w_0\,m_{0N} \qquad (19a)$$

or in absolute values

$$WM_N = W_0\,M_{0N} \qquad (19b)$$

that is essentially the Boyle–vant-Hoff (BVH) relationship that reflects the fact that the number of moles of the impermeable solute $X_N = WM_N$ remains constant inside the cell. That gives us

$$w_f = w_0\,m_{0N}/m_{0N}\,. \qquad (19c)$$

That means that the final cell water volume is determined by the ratio of the initial and equilibrium osmolalities of the impermeable component. If the cell did not content any impermeable solute inside but outside only it would finally (when other entities are equalized) shrink until full collapse of cell water volume. If the cell had only intracellular impermeable entity it would swell infinitely (possible "physiological" consequences such as breaking of selective permeability is not a topic of this discussion).

***Water volume at the points of maximum volume excursion***. If membrane permeabilities to the solutes are very different from each other ($c_{rp1} >> c_{rp2} >> c_{rpN}$) than osmotic response can be considered as consisting $N$ phases. In the first phase, water is flowing quickly to equalize external and internal total osmotic pressure, while at the same time some amount of the most permeable solute ($i = 1$) permeates the cell. At the certain moment, the water volume reaches the **first** ($k = 1$) transient extremum (maximum or minimum). At this point, the transmembrane gradient of osmotic pressure equals 0, that means that $dw/dq = 0$, and the water volume reaches its first extremum value $w_{m1}$. Because at this moment the water flux equals zero, then from Eq. (5) we can calculate intracellular osmolality of the first, most permeable solute:

$$m_{m11} = \sum_{i=1}^{N} m_{fi} - \sum_{i=2}^{N} m_{m1i}\,, \qquad (20)$$

where $m_{m1i}$ is the cellular concentration of the $i$-th solute at the moment of the first transient extremum. Up to this moment, all other solutes are assumed to be quasi-impermeable, that means that numbers of moles of the $i$-th solute ($i = 2, ..., N$) inside the cell remains almost constant. Thus, according to (19a):

$$w_{m1}\,m_{m11} \sim w_0\,m_{0i}\,, \qquad (21)$$

where $i = 2, ..., N$. Substituting Eqs. (20), (21) to Eq. (17a), we have after simplifications:

$$w_{m1} \sim w_0\frac{1 + \sum_{i=1}^{N} m_{0i}/c_{rp1}}{1 + \sum_{i=1}^{N} m_{fi}/c_{rpi}}\,. \qquad (22a)$$

This One
JL0Q-08E-LJLA



Матеріал, захищений авторським правом

$$w_{m1} \sim w_0 \frac{c_{rp1} + \sum_{i=1}^{N} m_{0i}}{c_{rp1} + \sum_{i=1}^{N} m_{fi}}, \qquad (22b)$$

that is equivalent to the relationships we previously described [3] for $N=2$.

The second phase ($k=2$) begins right after the moment of the first transient extremum. The main changes at this phase occur for the second permeable solute. Its flux across the membrane during this stage is accompanying by eventual equalizing of concentration of the first solute inside and outside the cell. Now, flux of the first solute just follows the water flux determined by the movement of the second solute, then:

$$m_{m21} \sim m_{f1}. \qquad (23)$$

At the end of the second stage, a new non-stable equilibrium between total tonicity inside and outside the cell leads to $dw/dq=0$. Thus, the intracellular concentration of the second solute can be calculated similar to Eq. (20) taking to account Eq. (23) as follows:

$$m_{m22} = \sum_{i=2}^{N} m_{fi} - \sum_{i=3}^{N} m_{m2i}. \qquad (24)$$

The less permeable solutes are still considered being quasi-impermeable, thus:

$$w_{m2}\, m_{m2i} \sim w_0\, m_{0i}, \qquad (25)$$

where $i=3,\ldots,N$.

Substituting Eqs. (23)–(25) to Eq. (17a), we have after simplifications:

$$w_{m2} \sim w_0 \frac{1 + m_{01}/c_{rp1} + \sum_{i=1}^{N} m_{0i}/c_{rp2}}{1 + m_{f1}/c_{rp1} + \sum_{i=1}^{N} m_{fi}/c_{rp2}}. \qquad (26)$$

This iteration can be repeated for any $2 \le k < N$.

At the $k$-th moment of the transient maximum excursion (extremum), the water volume can be estimated as follows:

$$w_{mk} \sim w_0 \frac{1 + \sum_{i=1}^{k-1} (m_{0i}/c_{rpi}) + \sum_{i=1}^{N} m_{0i}/c_{rpk}}{1 + \sum_{i=1}^{k-1} (m_{fi}/c_{rpi} + \sum_{i=1}^{N} m_{fi}/c_{rpk}}. \qquad (27)$$

Formula (27) transforms to formula (18) for $k=N$. In this case, however, the $N$-th extremum is not a transient but in fact, the final (equilibrium) value that can be reached only when time asymptotically approaches to $\infty$.

Before we start analyzing some examples, we need to emphasizes that osmotic responses of the cell does not necessary always content $N-1$ transient extremums, but sometimes less or even none of them depending on combinations of initial and final concentration of the solutes and relative membrane permeabilities to the components. We have analyzed these conditions for case $N=2$ in details [4]. For $>2$, we may say that the essential conditions for existence of the $k$-th extremum are:

— for a maximum:

$$w_{m,k-1} < w_{mk} > w_{m,k+1}, \qquad (28a)$$

— for a minimum:

$$w_{m,k-1} > w_{mk} < w_{m,k+1}, \qquad (28b)$$

where $k=1,2,\ldots,N-1$, $w_{m0}=w_0$, $w_{mN}=w_f$ and $w_{m,k-1}$, $w_{mk}$ and $w_{m,k+1}$ are pre-calculated from (27) values.

Another important moment is that formulas (22), (26) and (27) are not exact. The estimation given above is quite accurate for the first extremum [3]. This accuracy decreases however, with increase of $k$.

## 1-solute system

Now we consider some examples of practical applications of the theory described above. First, we discuss a one-solute system ($N=1$). The cell in such system does not exhibit transient volume extremums, but

**Parameters (given and calculated) of the cell osmotic Response in multi-solute media depicted on Figs. 1–3.**

| Fig. № | Curve | Given parameters* | | | | | | | | | Calculated values | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1st solute ($i=1$) | | | 2nd solute ($i=2$) | | | 3rd solute ($i=3$) | | | $w_{m1}$ | | $w_{m2}$ | | $w_f$ | |
| | | $m_0$ | $m_f$ | $c_{rp}$ | $m_0$ | $m_f$ | $c_{rp}$ | $m_0$ | $m_f$ | $c_{rp}$ | sim. | f-la | sim. | f-la | sim. | f-la |
| 1 | *1* | 1 | 3.76 | 0.0024 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.27 | 0.27 |
| | *2* | 1 | 3.76 | 0.9710 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.42 | 0.42 |
| | *3* | 0 | 2.76 | 0.0024 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0 | 0 |
| | *4* | 2.76 | 0 | 0.0024 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | $\to\infty$ | $\to\infty$ |
| 2 | *1* | 0.69 | 1.38 | 0.971 | 1 | 2.76 | 0.0024 | — | — | — | NE | 0.52 | — | — | 0.36 | 0.36 |
| | *2* | 0.69 | 1.38 | 0.971 | 1 | 1 | 0.0024 | — | — | — | 0.83 | 0.79 | — | — | 1.0 | 1.0 |
| | *3* | 0.69 | 1.38 | 0.971 | 1 | 0.28 | 0.0024 | — | — | — | NE | [1.01] | — | — | 3.56 | 3.56 |
| | *4* | 0 | 2.76 | 0.971 | 1 | 1 | 0.0490 | — | — | — | 0.47 | 0.42 | — | — | 0.88 | 0.88 |
| 3 | *1* | 0 | 2.76 | 0.971 | 2.59 | 2.52 | 0.049 | 1 | 1 | 0.0024 | 0.68 | 0.63 | NE | [0.98] | 1.0 | 1.0 |
| | *2* | 0 | 1.38 | 0.971 | 2.59 | 1.72 | 0.049 | 1 | 0.34 | 0.0024 | NE | [1.03] | NE | [1.66] | 2.59 | 2.59 |
| | *3* | 0 | 5.52 | 0.971 | 2.76 | 0 | 0.049 | 1 | 1 | 0.0024 | 0.74 | 0.63 | 2.41 | 2.87 | 1.12 | 1.12 |
| | *4* | 0 | 2.41 | 0.971 | 2.76 | 0 | 0.049 | 1 | 1 | 0.0024 | NE | [1.08] | 2.76 | 3.26 | 1.13 | 1.13 |

* — Initial cell volume $w=1$.



Матеріал, захищений авторським правом

only monotonic decrease or increase of water volume and in opposite manner, the intracellular osmolality. There are two possibilities:

1) Both sides contain impermeable "salts" that can be considered as the same entity with $c_{rp} \to 0$. In this case the BVH-relationship is applicable, then

$$wm = w_0 m_0 . \tag{29}$$

The final volume can be calculated as follows:

$$w_f = w_0 m_0 / m_f . \tag{30}$$

2) Both sides contain one permeable solute only (for example after electroporation in a medium that mimics intracellular compartment or for dialysis processes). In this case, from Eq. (17a) we have:

$$w(c_{rp} + m) = w_0 (c_{rp} + m_0 ). \tag{31}$$

The final volume can be calculated as follows:

$$w_f = w_0 (c_{rp} + m_0 )/(c_{rp} + m_f ) \tag{32}$$

The case $N = 1$ is the only case when relationship between water volume and time can be expressed by exact formula. It can be done by combining equations (5), (31) and (32). After separation of variables and integration, we have follows:

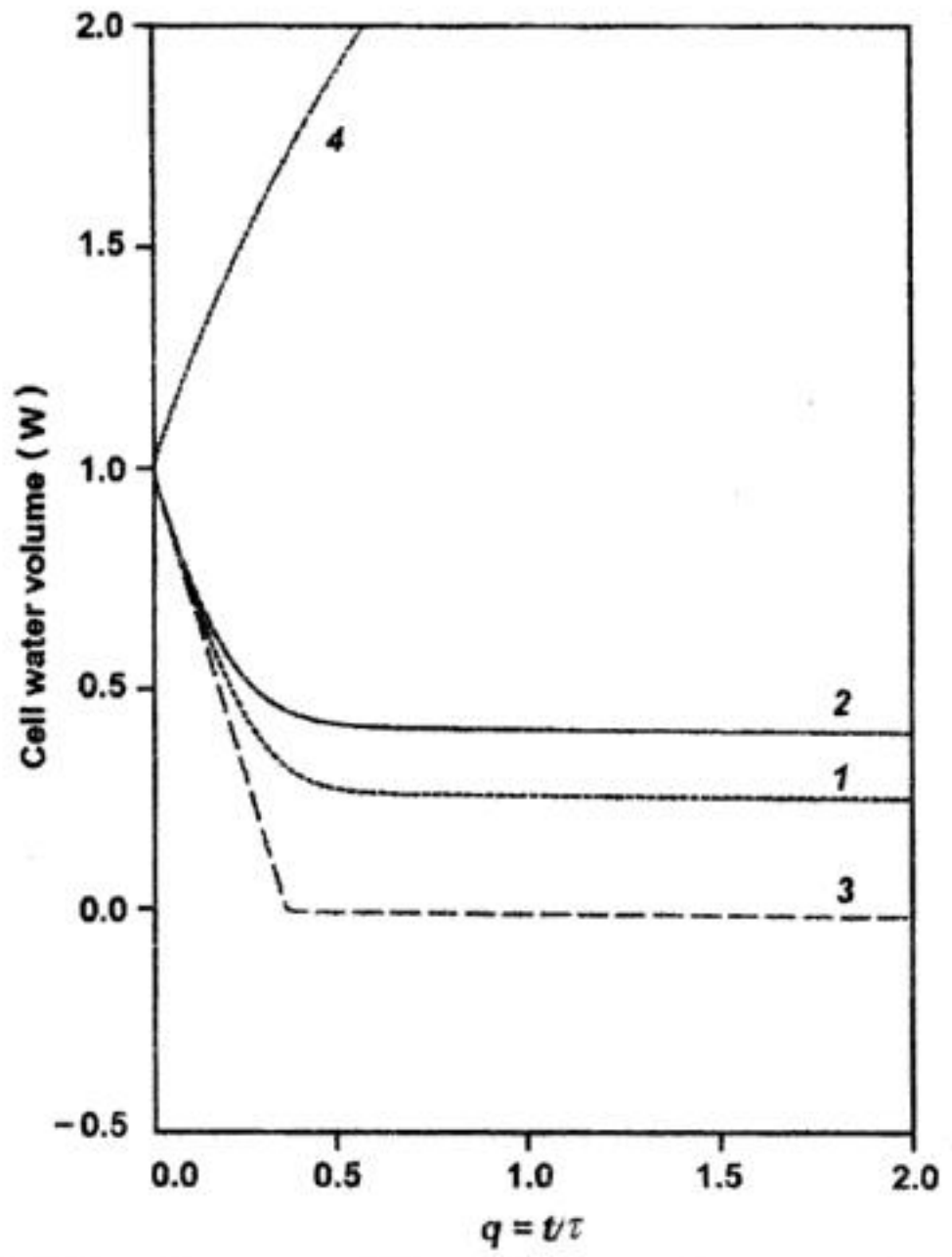



**Fig. 1.** Osmotic response of the cell in a one-solute system. *1*: an **impermeable** solute is present inside as well as outside the cell (relative permeability term $c_{rp} \sim 0$); *2*: a **permeable** solute is present outside and inside the cell ($c_{rp} \sim 1$). *3*: an impermeable solute is outside the cell, while intracellular concentration of the solute equals zero. *4*: impermeable solute is inside the cell while an extracellular compartment does not include any osmotically active component. Note that curves *1–3* have the same initial slope that equals $m_0 - m_f$. Other conditions and calculated values are given in the Table.

$$(c_{rp} + m_f )q = w_0 - w + w_f \ln [(w_0 - w_f )/(w - w_f )] . \tag{33}$$

Pattern of osmotic response for one-solute system is depicted in Fig. 1. Curve *1* represents a quasi-impermeable case, curve *2* is the osmotic response in case of $c_{rp} = 0.971$. Cell parameters, initial and boundary conditions are given in Table. It can be seen that excursion between the initial and the final volume $|w_0 - w_f|$ is always higher for an impermeable than for a permeable case at equal $m_0$ and $m_f$.

If the cell initially contains an impermeable solute outside only ($m_0 = m = 0$), it will shrink linearly with time according to the formula:

$$w = w_0 - m_f q , \tag{34}$$

At the time $q_c = w_0 / m_f$ the cell water volume collapses to 0, as it shown on curve *3* in Fig. 1.

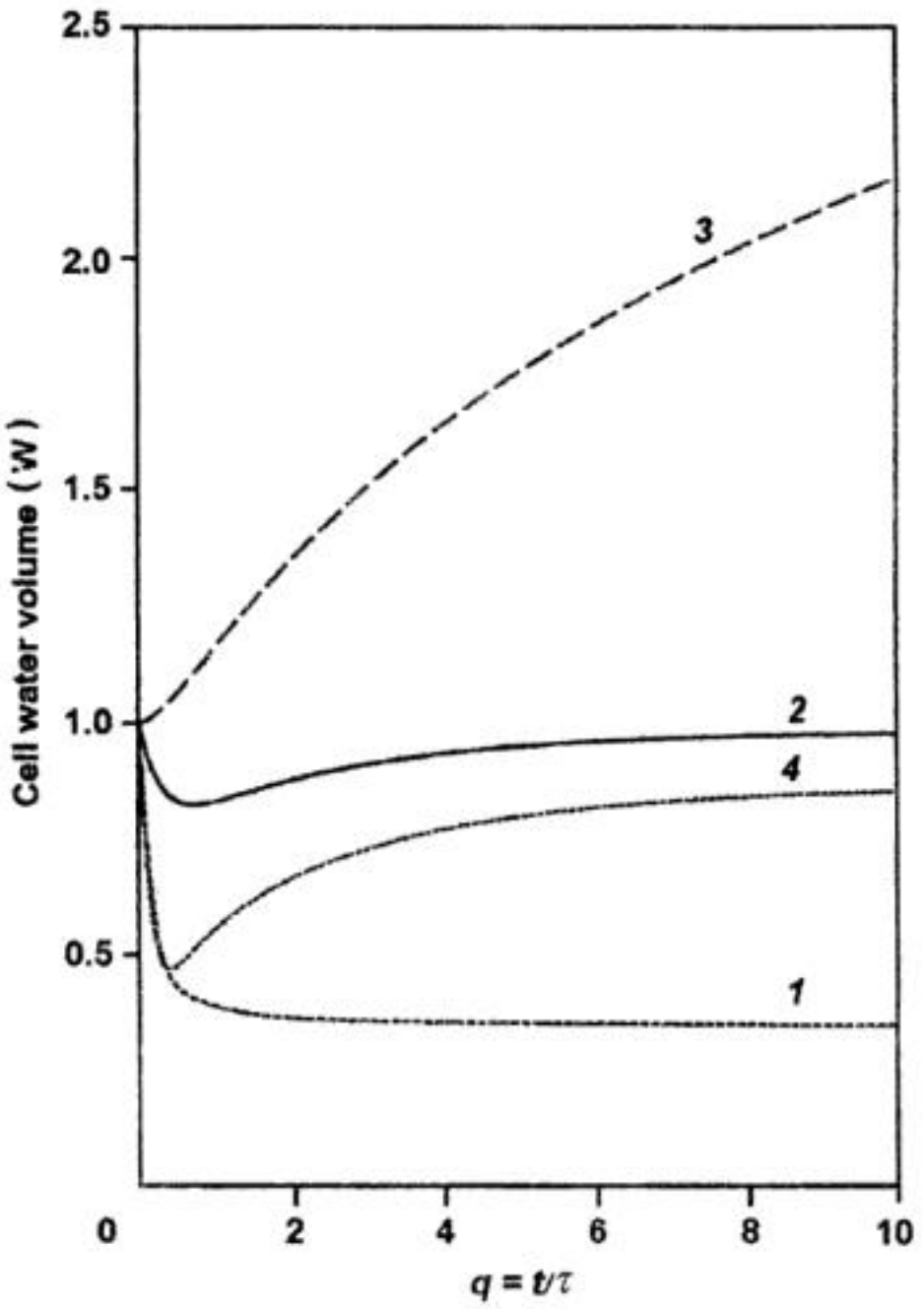



**Fig. 2.** Osmotic response of the cell in a two-solute system. Initial intracellular osmolality of the highly permeable component is lower that the extracellular osmolality ("loading"). *1–3*: permeable + impermeable solute systems. *1*: "hyper-saturation" effect [3]. High external concentration of the impermeable component leads to fast shrinkage during the first stage. It causes to hyperconcentration of the permeated solute inside the cell; the permeable component starts leaving the cell; the cell continues shrinking; no transient extremum occurs. *2*: a classical case of shrinkage (fast phase) with slow re-swelling to the same final value if the initial intracellular and extracellular osmolalities of an impermeable component are equal. *3*: low osmolality of the external impermeable solute suppresses initial shrinkage; only swelling occurs. *4*: the second solute is less permeable that the first component, but substantially enough to permeate the cell. Eventhough the initial and final osmolalities of the low-permeable component are equal, some amount of the solute leaves the cell during fast shrinkage, and water volume regains to a smaller value ($w_f < w_0$). Other conditions and calculated values are given in the Table.



Матеріал, захищений авторським правом

If the cell had no impermeable solute outside but inside only ($m_f = 0$), than taking into account (29), it would swell infinitely as a square root function of time as follows:

$$w = \sqrt{w_0^2 + 2w_0 m_0 q} \qquad (35)$$

as it is partially depicted on curve *4* in Fig. 1.

## 2-solute system

If two solutes are present ($N = 2$), the final volume can be calculated as follows:

$$w_f = w_0 \frac{1 + m_{01}/c_{rp1} + m_{02}/c_{rp2}}{1 + m_{f1}/c_{rp1} + m_{f2}/c_{rp2}}. \qquad (36)$$

If the second solute is quasi-impermeable, than $w_f = w_0 m_{02}/m_{f2}$ (formula (19c)).

In case of $N = 2$, in general one transient volume excursion can be observed. However, at certain conditions, the character of the osmotic response may be mono-phasic. Conditions in case when one of the solutes is permeable while other impermeable entity is considered as "salts" are discussed elsewhere [4]. Fig. 2 (curves *1–3*) represents some of possible cases briefly described in the figure legend. In case when $w_m$ exists it can be approximated from formula (22b):

$$w_m \sim w_0 \frac{c_{rp1} + m_{01} + m_{02}}{c_{rp1} + m_{f1} + m_{f2}}. \qquad (37)$$

Curve *4* in Fig. 2 represents a general case when both solutes are permeable, and a transient extremum exists. Values of $w_f$ and $w_m$ calculated from formulas (36) and (37) give good approximations in comparison with actual simulation (see Table). Agreement is complete for the final volume $w_f$, accuracy is also good for $w_m$.

## 3-solute system

In case $N = 3$, in general two extremums, a maximum and a minimum, can be observed. However, it may be one only or none of them. Figure 3 depicts some of possible cases.

The final water volume can be estimated from formula (18):

$$w_f = w_0 \frac{1 + m_{01}/c_{rp1} + m_{02}/c_{rp2} + m_{03}/c_{rp3}}{1 + m_{f1}/c_{rp1} + m_{f2}/c_{rp2} + m_{f3}/c_{rp3}}. \qquad (38)$$

First extremum can be approximated from (21a) as follows:

$$w_{m1} = w_0 \frac{c_{rp1} + m_{01} + m_{02} + m_{03}}{c_{rp1} + m_{f1} + m_{f2} + m_{f3}}. \qquad (39)$$

Approximation of the second extremum is given by (26):

$$w_{m2} = w_0 \frac{1 + m_{01}/c_{rp1} + (m_{02} + m_{03})/c_{rp_2}}{1 + m_{f1}/c_{rp1} + (m_{f2} + m_{f3})/c_{rp_2}}. \qquad (40)$$

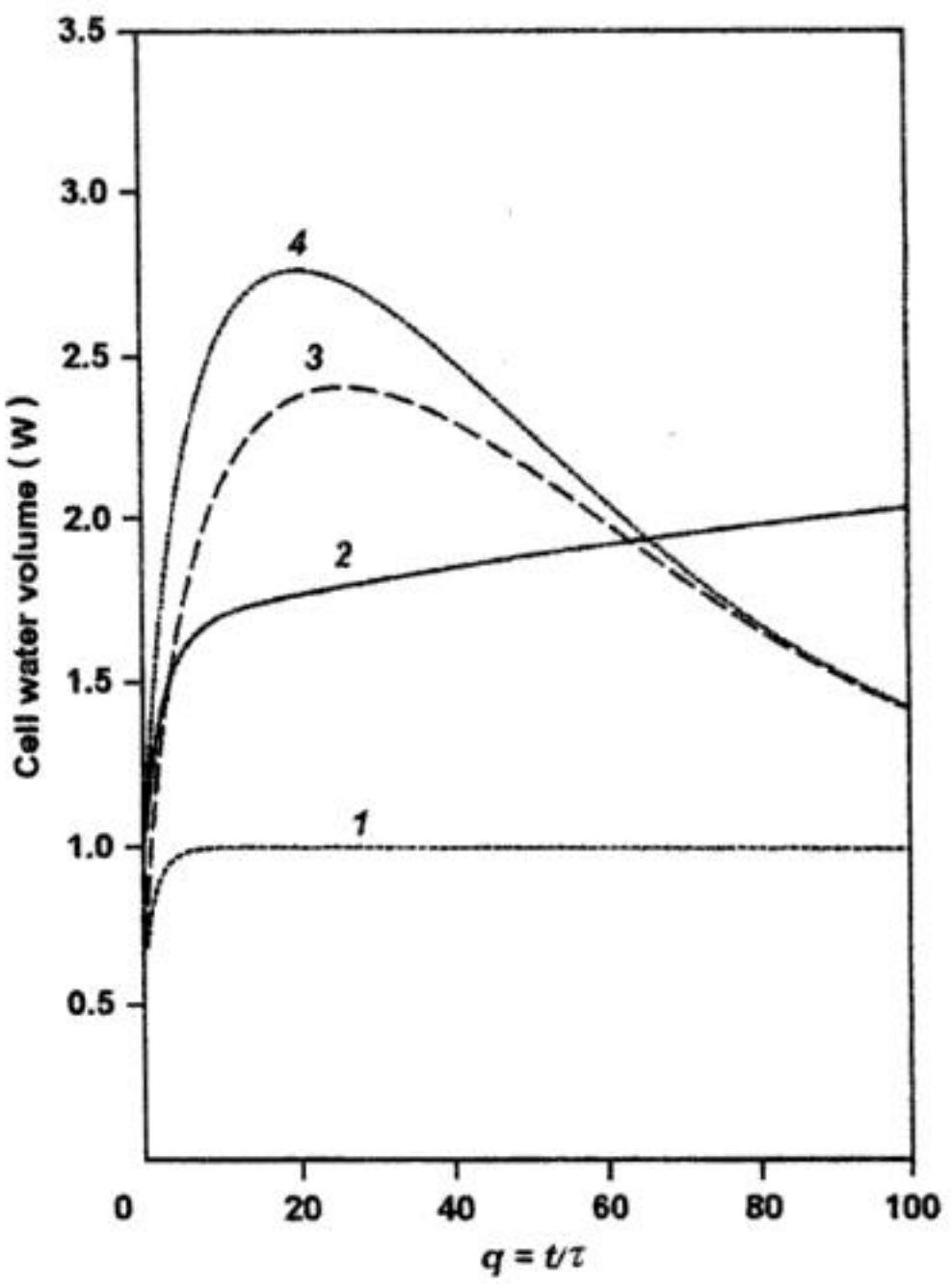



**Fig. 3.** Osmotic response of the cell in a three-solute system. The cell that initially contained quasi-impermeable solute ($c_{rp3} = 0.0024$) is placed into a bath that contains a highly-permeable solute ($c_{rp3} = 0.971$) and the same quasi-impermeable solute. They cell is pre-loaded with a low permeable solute ($c_{rp3} = 0.049$). *1*: the bath contains a low-permeable solute with osmollities that is almost equal to the intracellular ($m_{02} \sim m_{f2}$). The cell shrinks initially "squeezing" a certain amount of the intracellular low-permeable solute, than cell water volume regains to the same value; only transient minimum exists. *2*: similar situation is accompanying by low extracellular concentration of quasi-impermeable solute ($m_{f3} = 0.34$); both shrinkage and swelling extremums are suppressed, the cell swells to 1/0.34 times higher than the initial water volume. If the low permeable solute presents initially only inside the cell (*3*), than after fast (not seen in the figure) initial shrinkage the cell swells to a maximum volume and than re-shrinks to the equilibrium value ($w_f \sim w_0$). Both local minimum and second (maximum) extremum exist. *4*: external bath does not content a low-permeable component as in case *3*, but initial intracellular osmolality of the low-permeable solute is higher than extracellular osmolality of the high-permeable solute. Initial shrinkage is suppressed; the cell swells to a local maximum and re-shrinks to $w_f \sim w_0$. One local transient extremum is observed. Other conditions and calculated values are given in the Table.

Actual simulations performed for the curves in Fig. 3 showed that approximation of the first extremum is satisfactory for curves *1* and *3*. For curves *2* and *4* the first minimum calculated from formula (38) does not exist because the values calculated from (39) do not satisfy inequity (27). For the second extremum if it exists (curves *3* and *4*), the approximation given by formula (40) is less accurate but still presents a general picture of the magnitude of volume excursions.



Матеріал, захищений авторським правом

## Intracellular solute concentrations (osmolality) at the point of transient maximum volume excursion

Estimation of values of intracellular concentrations of the solutes at the moments of volume excursions are self-evident from the assumptions made for the derivations (e.g. formulas (21), (22) or (23)–(25)), as it was done in [3] for $N=2$. In general, the intracellular osmolality of the $i$-th solute at the $j$-th point of transient maximum volume excursions can be estimated as follows:

— if $i<j$

$$M_{mij} \sim M_{fi}, \tag{41a}$$

— if $i=j$

$$M_{mij} \sim \sum_{i=j+1}^{N} (M_{fi} - M_m)_{ij}, \tag{41b}$$

— if $i>j$

$$M_{mij} \sim W_0 M_{0i} / W_{mj}, \tag{41c}$$

where $j=1, 2, ..., N-1$. Note that approximations above are applicable for situations when the $j$-th maximum exists (see conditions (28)).

## Total cell volume

If water cell volume $w$ and all intracellular osmolalities $m_i$ are known, than the total cell volume $V$ can be calculated as follows:

$$V = V_{\text{iso}} \left\{ v_b + w(1 - v_b) \left[ 1 + M_{\text{iso}} \sum_{i=1}^{N} (m_i \upsilon_i) \right] \right\}, \tag{42}$$

where $V_{\text{iso}}$ and $M_{\text{iso}}$ are the total isotonic volume of the cell and iso-osmolal concentration respectively, $v_b$ is the partial volume of osmotically inactive component, and $\upsilon_i$ is the partial molar volume of the $i$-th solute.


## Summary

In summary, presented in the paper approaches allows to predict the final value of cell water and estimate magnitude of maximum volume excursions for complex systems when two or more permeable solutes are presented in the medium without using sophisticated software. That can be useful for developing practical protocols with multi-component cocktails and for other cryobiological applications.



## Aknowledgements

Author is grateful to Dr. P. Mazur for support of the research (NIH grant RO1-HD30274) that was a prelude to this analysis. The author deeply appreciates the help of Dr. F. W. Kleinhans with MicroMath Software and for pointing out the advantages of the 2-parameter approach. We are also thankful to Drs. J. K. Critser and J. Liu for thoughtful discussions that ignited the idea of necessity in developing this theory.


## REFERENCES


1. *Filkenstein A.* Water movement Through Lipid Bilayers, Pores and Plasma Membranes: Theory and Reality.– Willey, New York, 1987.
2. *Katkov I.I.* Time frame of osmotic response of gametes and zygotes: 1-membrane vs 2-membrane models // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 439–440.
3. *Katkov I.I.* Water volume and intracellular concentration of permeable cryoprotectants at points of maximum volume excursions (MVE) during addition and dilution of CPA // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 441–442.
4. *Katkov I.I.* Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. I. Main physical events and conditions for existence of the point of maximum volume excursion // Probl. of Cryobiology.– 1999.– № 2.– P. 3–?.
5. *Kleinhans F.W.* Membrane permeability modeling: Kedem–Katchalsky vs a two-parameter formalism // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 271–289.





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.1: 57.043: 611–018.51

UDC 577.1: 57.043: 611–018.51

# Влияние додецил-β,D-мальтозида на устойчивость предварительно дегидратированных эритроцитов к гиперосмотическому и холодовому шоку

Н. М. ШПАКОВА, Е. Р. ПАНТАЛЕР, Н. В. ОРЛОВА

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

# The Effect of Dodecyl-β,D-maltozide on the Resistnace of Preliminarily Dehydrated Erythrocytes to Hyperosmotic and Cold Shock

N. M. SHPAKOVA, E. R. PANTALER, N. V. ORLOVA

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

Изучали совместное действие предварительной дегидратации эритроцитов и неионного амфифильного соединения додецил-β,D-мальтозида (ДМ) на устойчивость клеток к последующему гиперосмотическому воздействию. Получили антигемолитическую активность ДМ при перенесении клеток в 4,0 М NaCl. Протектирующий эффект амфифила наблюдался, если клетки подвергались гиперосмотическому стрессу при 37 °С. Характер и степень выраженности защитного действия ДМ определяются температурой предварительной дегидратации клеток. Обнаружили протектирующий эффект амфифила в условиях холодового шока эритроцитов (при охлаждении клеток в гипертонических средах от 37 до 0 °С).

Вивчали сумісну дію попередньої дегідратації еритроцитів і неіонної амфіфільної сполуки додецил-β,D-мальтозиду (ДМ) на стійкість клітин до наступної гіперосмотичної дії. Отримали антигемолітичну активність ДМ при перенесенні клітин в 4,0 М NaCl. Протектуючий ефект амфіфілу спостерігається, якщо клітини зазнають гіперосмотичного стресу при 37 °С. Характер і ступінь вираження захисної дії ДМ визначаються температурою попередньої дегідратації клітин. Виявили протектуючий ефект амфіфілу в умовах холодового шоку еритроцитів (при охолодженні в гіпертонічних середовищах від 37 до 0 °С).

Combined action of preliminary dehydration of erythrocytes and non-ionic apmphiphilic compound dodecyl-β,D-maltozide (DM) on a cell resistance to following hyperosmotic effect was studied. DM antihemolitic activity was revealed when the cells were transferred into 4.0 M NaCL. Protecting effect of amphiphile was observed, if the cells were subjected to hyperosmotic stress at 37 °C. The character and manifesting degree of protective DM effect are determined by the temperature of preliminary cell dehydration. Protecting effect of amphiphile was found under cold shock conditions of erythtocytes (during cells cooling in hypertonic media from 37 down to 0 °C).

Моделирование условий замораживания позволило установить, что чувствительность эритроцитов к высоким концентрациям солей можно изменять. Так, например, в результате предварительной инкубации в 0,45 М NaCl устойчивость эритроцитов к перенесению в 4,0 М NaCl возрастает [4]. Положительно заряженные производные фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифторперазин также позволяют существенно повысить устойчивость эритроцитов как к холодовому, так и гипертоническому стрессу [2, 5]. Эти соединения оказывают многообразное действие на структуру и функцию клеток, их модифицирующий эффект проявляется на уровне как белковых, так и липидных компонентов [12]. Чтобы выяснить, являются ли защитные эффекты катионных амфифильных соединений в условиях гипертонического и холодового шока эритроцитов специфическими только для катионных фенотиазинов, необходимо было изучить особенности влияния неионных амфифилов, в частности ДМ, на устойчивость клеток к температурному и осмотическому воздействиям. Выбор данного соединения обусловлен его способ-

Modelling of freezing conditions permitted to establish, that erythrocyte sensitivity to high concentrations of salts can be modified. For example, in the result of preliminaty incubation in 0.45 M NaCl the resistance of erythrocytes to a transfer into 4.0 M NaCl increases [4]. Positively charged derivatives of phenothiazine row chlorpromazine and trifluoperazine also allow to significantly increase the resistance of erythrocytes both to a cold and hypertonic stress [5]. These compounds cause versatile effect on a structure and function of cells, their modifying effect is revealed both at the level of protein and lipid components [12]. In order to elucidate whether protective effects of cation amphiphilic compounds under conditions of hypertonic and cold shock of erythrocytes are specific only for cation phenothiazines, it would be necessary to study the peculiarities of the effect of non-ionic amphiphiles, in particular DM, on the resistance of cells to a temperature and osmotic effects. The selection of given compound is stipulated by its capability to protect the cells under conditions of hypotonic shock [9]. Morphological changes of cells under DM effect occur almost instantly, and the caused changes



Матеріал, захищений авторським правом

ностью защищать клетки в условиях гипотонического шока [9]. Морфологические изменения клеток под действием ДМ происходят практически мгновенно, и вызванные изменения формы эритроцитов сохраняются в течение длительного времени (до 60 мин) [9]. Таким образом, ДМ проникает в мембрану достаточно быстро и не перераспределяется в ней со временем.

Цель работы — изучение влияния неионного амфифильного соединения ДМ и предварительной дегидратации клеток на чувствительность эритроцитов к гиперосмотическому шоку, развивающемуся при их добавлении к 4,0 М NaCl, а также действия данного соединения на дегидратированные клетки в условиях холодового шока при изменении температуры от 37 до 0 °С.

Эритроциты получали из донорской крови II группы. После удаления плазмы эритромассу дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, *pH* 7,4) и хранили в виде плотного осадка не более 2-х часов при 0 °С. Среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, *pH* 7,4. В работе были использованы ДМ фирмы Calbiochem и реактивы отечественного производства квалификации ХЧ и ЧДА.

Гиперосмотический шок осуществляли следующим образом. С помощью поршневого дозатора Gilson по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 0,5 мл раствора NaCl (0,15–1,0 М) при заданной температуре (0 или 37 °С) и инкубировали 2 мин (этап предварительной инкубации). Затем из каждой пробы по 50 мкл осадка эритроцитов переносили в 1 мл 4,0 М NaCl при той же температуре на 5 мин (этап собственно гиперосмотического шока).

При холодовом шоке эритроцитов клетки инкубировали 10 мин в средах определенной тоничности при 37 °С, а затем переносили на то же время в среды той же тоничности при 0 °С. После этого клетки осаждали центрифугированием и при длине волны 543 нм спектрофотометрически определяли количество гемоглобина в супернатанте. Выход гемоглобина из клеток рассчитывали в процентах по отношению к 100%-му гемолизу в присутствии тритона Х-100 (0,1%).

Эритроциты характеризуются высокой чувствительностью к изменению осмотических условий среды [3]. Добавление клеток в растворы хлористого натрия повышенной тоничности, предшествующее действию гиперосмотического стресса, позволяет снизить уровень лизиса эритроцитов при их последующем перенесении в 4,0 М NaCl [2, 4, 5]. Из рис. 1 и 2 видно, что предварительная инкубация клеток в средах, содержащих NaCl в концентрации 0,2–0,6 М, сопровождается снижением уровня повреждения клеток при их последующем перенесении в 4,0 М NaCl как при температуре 37, так и при 0 °С, причем в последнем случае уровень гиперосмотического лизиса предварительно дегидратированных клеток гораздо ниже. Наши результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными Позднякова [4], который связывает появление максимальной устойчивости эритроцитов, дегид-

in erythtocytes' shape keep within a long time (up to 60 min) [9]. Thus DM penetrates through a membrane quite rapidly and is not redistributed in it with a time.

The aim of this work was to investigate the effect of non-ionic amphiphilic compound DM and preliminary cell dehydration on the sensitivity of eryhtrocytes to hyperosomotic chock, developing at their adding to 4.0 M NaCl, as well as the effect of given compound on dehydrated cells under cold shock conditions during temperature changing from 37 to 0 °C.

Erythrocytes were obtained from donor's blood of the 2nd group. After removal of plasm an erythromass was twice washed-out by physiological solution (0.15 M NaCl, 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4) and stored as a dense sediment not more than 2 hrs at 0 °C. Media were prepared in 0.01 M phosphate buffer, *pH* 7.4. In the work we used DM (Calbiochem) and reagents of home production of "chemically pure" and "pure for analysis" qualification. Hyperosmotic shock was accomplished by the following way. By means of plunger dosator Gilson the erythrocyte sediment by 50 µl was removed into 0.5 ml of NaCl solution (0.15–1.0 M) at determined temperature (0 or 37 °C) and incubated during 2 min (stage of preliminary incubation). Then from every sample the erythrocyte sediment by 50 µl was transferred into 1 ml of 4.0 M NaCl at the same temperature for 5 min (stage of hyperosmotic shock itself). At cold shock of erythrocytes the cells were incubated for 10 min in the media of certain tonicity at 37 °C, and then were transferred into the media of the same tonicity at 0 °C for the same time. After this the cells were sedimented by centrifugation and the hemoglobin quantity in supernatant was spectrometrically determined at a wave length of 543 nm. Hemoglobin yielding from cells was calculated in a percentage in respect to 100% hemolysis in the presence of triton X-100 (0.1%).

Erythrocytes are characterized by a high sensitivity to the change in osmotic conditions of an environment [3]. Adding of cells into the solutions of sodium chloride of an increased tonicity, prior to the effect of hyperosmotic stress, allows to reduce the erythrocytes lysis level at their following transfer into 4.0 M NaCl [2, 4, 5]. Figs. 1 and 2 show that preliminary incubation of cells in the media, containing NaCl in the concentraitons of 0.2–0.6 M, is accompanied by a decrease in the level of cells damage at their following removal into 4.0 M NaCl both at the temperature of 37 and 0 °C, meanwhile at the latter case the level of hyperosmotic lysis of preliminarily dehydrated cells is much lower. Our results are well coordinated with earlier obtained data [4], associating the appearence of maximum resistance of erythrocytes, dehydrated under certain conditions, with volumetric changes of cells, accompanying by the modification of cytoskeleton-membrane complex. An increase in the salt concentration in the medium of preliminary incubation



Матеріал, захищений авторським правом

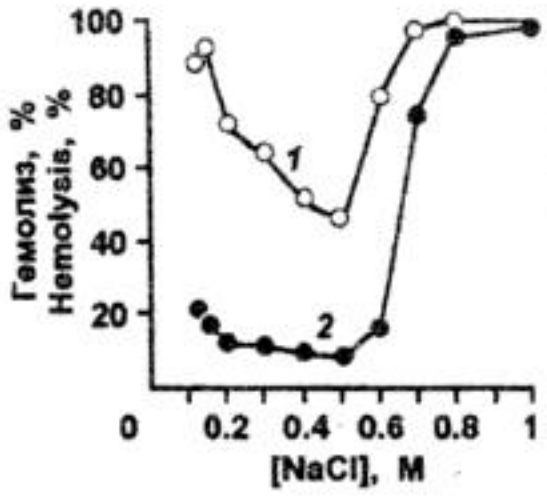



**Рис. 1.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура 37 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 1.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature is 37 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

ратированных в определенных условиях, с объемными изменениями клеток, сопровождающимися модификацией комплекса цитоскелет–мембрана. Повышение концентрации соли в среде предварительной инкубации (> 0,6 М) приводит к увеличению гемолиза клеток до уровня контроля (рис. 1, 2).

Данные о влиянии ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М) на чувствительность к гиперосмотическому шоку предварительно дегидратированных эритроцитов представлены кривыми *2* на рис. 1 и 2. Неионный амфифил находился в лизирующей среде в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М. Следует отметить, что эта концентрация ДМ гораздо ниже концентрации вещества, максимально эффективной при гипотоническом лизисе [9]. Если и предварительная инкубация клеток, и непосредственно гиперосмотический шок в 4,0 М NaCl осуществлялись при 37 °С, присутствие ДМ в лизирующей среде (4,0 М NaCl) позволяет существенно снизить гемолиз клеток (рис. 1). Выраженность эффекта ДМ при 37 °С определяется осмолярностью среды предынкубации. ДМ приводит к сглаживанию левого плеча кривой зависимости гиперосмотического лизиса от осмолярности сред предварительной инкубации. Начиная с концентрации хлористого натрия 0,6 М в среде предварительной инкубации, гемолиз эритроцитов в 4,0 М NaCl в присутствии амфифила увеличивается и достигает уровня контроля в области концентрации соли 0,8–1,0 М. Таким образом, при физиологической температуре присутствие ДМ в момент действия гиперосмотического стресса позволяет значительно снизить уровень гиперосмотического повреждения контрольных и умеренно дегидратированных клеток.

В условиях гиперосмотического стресса снижение температуры до 0 °С приводит к устранению защитного действия ДМ на клетки (рис. 2). При использовании в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М данное соединение почти не оказывает на эритроциты дополнительного лизирующего действия в отличие от катионного амфифильного соединения хлорпромазина [5]. Это, по-видимому, связано с тем, что ДМ, вызывающий эхиноцитоз клеток, встраивается во внешний монослой мембраны, а хлорпромазин, индуцирующий стоматоцитоз, — во внутренний [9]. Липиды внешнего монослоя (фосфатидилхолин и сфингомиелин) лучше смешиваются и менее

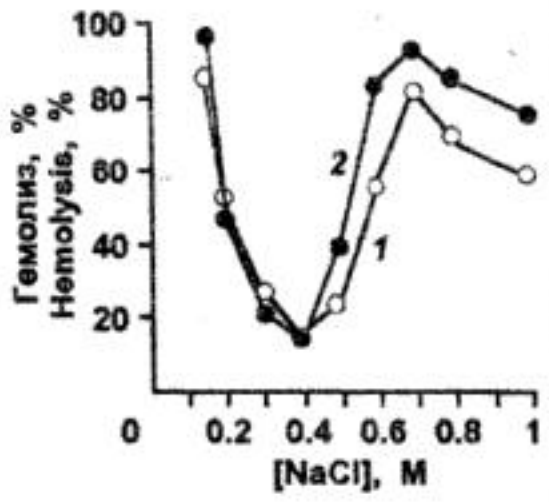



**Рис. 2.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура 0 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 2.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature is 0 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

(> 0.6 M) results into a rise of cell hemolysis upto the control level (Figs. 1, 2).

The data on DM effect ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M) on the sensitivity to hyperosmotic shock of preliminarily dehydrated erythrocytes are represented by the curves *2* in Figs. 1 and 2. Nonionic amphiphile was in a lysing medium in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M. It should be noted, that this DM concentration is considerably lower than one of the substance, maximum effective at hypotonic lysis [9]. If preliminary both cell incubation and directly hyperosmotic shock in 4.0 M NaCl were performed at 37 °C, DM presence in a lysing medium (4.0 M NaCl) allows to significantly reduce cell hemolysis (Fig. 1). The manifestation degree of DM effect at 37 °C is determined by the preincubation medium osmolarity. DM results in the smoothing of the left shoulder of the dependency curve of hyperosmotic lysis on the osmolarity of preliminary incubation media. Starting from the concentration of sodium chloride of 0.6 M in the preliminary incubation medium, erythrocyte hemolysis in 4.0 M NaCl in the presence of apmphiphile increases and reaches the control level in the salt concentration range of 0.8–1.0 M. Thus at physiological temperature the DM presence in the moment of hyperosmotic stress action permits to considerably reduce the level of hyperosmotic damage of the control and moderately dehydrated cells.

Under conditions of hyperosmotic stress the reduction of temperature down to 0 °C results in an elimination of protective DM effect on cells (Fig. 2). When using this compound in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M it almost does not cause an additional lysing effect to erythrocytes in contrast to cation amphiphile compound chlorpromazine [5]. This is probably related to the fact, that DM, causing cell echinocytosis, builds into an outer monolayer of a membrane, and chlorpromazine, inducing stomatocytosis, — into an inner one [9]. Lipids of outer monolayer (phosphatidyl choline and sfingomyelin) are better mixed and less subjected to phase separation in comparison with the components of inner monolayer [1]. Thus, a slight manifestation degree of DM destabilizing effect at 0 °C, probably is substantiated by the fact, that the substance under low temperature, being locally concentrated, does not reach the level of lytic concentrations.



Матеріал, захищений авторським правом

подвержены фазовому разделению по сравнению с компонентами внутреннего монослоя [1]. Таким образом, слабая выраженность дестабилизирующего эффекта ДМ при 0 °С, вероятно, обусловлена тем, что вещество, концентрируясь локально, при низкой температуре все же не достигает уровня литических концентраций.

Вышеописанные эксперименты включали: этап предварительной дегидратации и этап собственно гиперосмотического шока, на котором и реализовалось действие амфифила. Данные, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют, что при температуре 37 °С проявляется антигемолитическая активность ДМ, тогда как при 0 °С эффект отсутствует. Однако не совсем правильно говорить о влиянии температуры на защитный эффект ДМ при изотермическом режиме эксперимента, когда оба этапа проводились либо при 0 °С, либо при 37 °С. В этом случае эритроциты находились в неравных условиях уже перед гиперосмотическим стрессом, так как одни клетки были исходно дегидратированы при 0 °С, а другие — при 37 °С.

Интересно было выяснить, зависит ли реализация защитного эффекта ДМ от температуры, при которой происходит собственно гиперосмотический лизис, либо характер действия ДМ определяется особенностями предварительной дегидратации клеток при различных температурах. В данном случае возможны 4 комбинации температурных условий (37 → 37 °С, 0 → 0 °С, 0 → 37 °С и 37 → 0 °С), позволяющие выяснить вклад температуры на каждом этапе отдельно. Первые две уже были описаны выше; последняя не представляла интереса, так как добавляла к гиперосмотическому шоку еще и холодовой, вызванный охлаждением дегидратированных клеток [4, 5]. На рис. 3 представлены данные эксперимента, в котором предварительную дегидратацию клеток проводили при 0 °С, а собственно гиперосмотический шок в 4,0 М NaCl — при температуре 37 °С. Видно, что уровень гемолиза в присутствии ДМ существенно снижается как для умеренно дегидратированных эритроцитов, так и для клеток, достигших критического уровня дегидратации. В то же время амфифильное соединение проявляет невысокую антигемолитическую активность при данном температурном режиме эритроцитов, которые переносили в 4,0 М NaCl из физиологических по тоничности условий (рис. 3).

Таким образом, антигемолитическая активность ДМ проявляется, когда клетки подвергаются гиперосмотическому стрессу при 37 °С. В данном случае характер и степень выраженности протектирующего эффекта ДМ определяются температурой этапа предварительной дегидратации. Если клетки предварительно инкубировались в средах, содержащих 0,15–0,3 М NaCl, при физиологической температуре, то эффект ДМ в условиях гиперосмотического стресса проявляется в уменьшении чувствительности этих клеток к перенесению в 4,0 М NaCl. Дегидратация клеток при 0 °С сопровождается комплексом изменений, проявляющихся в конеч-

Mentioned above experiments included: the stage of preliminary dehydration and the stage of hyperosmotic shock itself, at which the action of anphiphile was realized. The data, represented in Figs. 1 and 2, testify, that at the temperature of 37 °C DM antihemolytic activity is manifested, meanwhile at 0 °C the effect is absent. However it is not correct to speak about the temperature effect on protective DM effect at isothermic regimen of an experiment, when both these stages were conducted either at 0 °C or 37 °C. In this case erythrocytes were under inequal conditions even before hyperosmotic stress, since one part of cells were initially dehydrated at 0 °C, another one — at 37 °C.

It was interesting to elucidate, whethet the realization of protective DM effect depends on a temperature, at which hyperosotic lysis itself takes place, or the character of DM action is determined by the peculiarities of preliminary cell dehydration under various temperatures. In this case 4 combinations of temperature conditions (37 → 37 °C, 0 → 0 °C, 0 → 37 °C and 37 → 0 °C), allowing to discover the contribution of temparature at every stage in particular, are possible. The first two of them have already been described above; the latter was not of interest, because of the addition of a cold shock to hyperosmotic one, caused by cooling of dehydrated cells [4, 5]. Fig. 3 shows the experimental data, where preliminary cell dehydration was done at 0 °C, and hyperosmotic shock itself in 4.0 M NaCl at the temperature of 37 °C. It is obvious, that the hemolysis level in the DM presence significantly decreases both for moderately dehydrated erythrocytes and for cells, reached a critical level of dehydration. At the same time amphiphilic compound manifests not high antihemolytic activity at given temperature regimen of erythrocytes, which were transferred into 4.0 M NaCl from physiological on tonicity conditions (Fig. 3).

Thus, antihemolytical activity of DM manifests when the cells are subjeceted to hyperosmotic stress at 37 °C. In this case the character and manifestation degree of DM protecting effect are determined by the temperature of the stage of preliminary dehydration. If cells were preliminarily incubated in the media, containing 0.15–0.3 M NaCl at physiological temperature, then DM effect under conditions of hyperosmotic stress is manifested in the reduction of these cells sensitivity to a removal into 4.0 M NaCl. Cell dehydration at 0 °C is accompanied by the complex of the changes, finally revealing in a considerable decrease in the DM presence of the level of hyperosmotic hemolysis of cells, preincubated in the media with NaCl concentration > 0.6 M NaCl. This testifies to the fact, that the preincubation temperature of cells determines the character of DM effect on the development of hyperosmotic lysis in 4.0 M NaCl at 37 °C. Combined application of media of preliminary dehydration and certain temperature regimen of dehydration stage allows to obtain antihemolytical ac-



Матеріал, захищений авторським правом

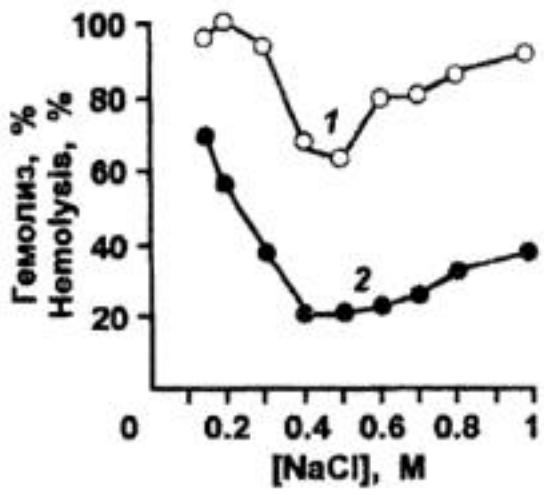



**Рис. 3.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при перенесении в 4,0 М NaCl после предварительной инкубации в солевых дегидратирующих средах (температура дегидратирующих сред 0 °С, температура 4,0 М NaCl 37 °С): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 3.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes when transferring them into 4.0 M NaCl after preliminary incubation in salt dehydrating media (temperature of dehydrating media is 0 °C, temperature of 4.0 M NaCl is 37 °C): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

ном итоге в значительном снижении в присутствии ДМ уровня гиперосмотического гемолиза клеток, предынкубированных в средах с концентрацией NaCl > 0,6 М. Это свидетельствует о том, что температура предынкубации клеток определяет характер влияния ДМ на развитие гиперосмотического лизиса в 4,0 М NaCl при 37 °С. Сочетанное использование сред предварительной дегидратации и определенного температурного режима этапа дегидратации позволяет получить антигемолитическую активность вещества во всем исследованном диапазоне сред предварительной инкубации. Кривая зависимости гемолиза клеток в 4,0 М NaCl от осмолярности сред предварительной дегидратации имеет перевернутую колоколообразную форму с минимальным значением лизиса в 0,45 М NaCl. ДМ позволяет убрать как левое, так и правое плечо данной кривой в зависимости от выбранного температурного режима этапа дегидратации.

Было исследовано влияние ДМ на чувствительность эритроцитов к холодовому шоку. На рис. 4 представлена зависимость уровня гемолиза эритроцитов от концентрации соли в среде при сдвиге температуры от 37 до 0 °С. Как видно, гемолиз клетки резко возрастает, начиная с концентрации NaCl 0,75 М, и достигает максимума в среде, содержащей 1,2 М NaCl. ДМ в концентрации $7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М оказывает небольшое защитное влияние на клетки, выраженное гораздо слабее по сравнению с аналогичным эффектом катионного соединения хлорпромазина [5].

Известно, что амфифилы в сублитических концентрациях защищают эритроциты от гипотонического гемолиза [6]. Но при больших концентрациях эти же вещества индуцируют гемолиз эритроцитов даже в изотонической среде. Например, ДМ в концентрации 40 мкМ значительно снижает гипотонический лизис эритроцитов, тогда как амфифил вызывает повреждение клеток при концентрациях свыше 60 мкМ [9]. Такое бифазное поведение амфифилов при повышении концентрации характерно для большого количества химически разнородных соединений и, по-видимому, является следствием амфифильного характера веществ.

Молекула ДМ по форме представляет собой усеченный конус (большая площадь сечения у полярной головы и небольшая у гидрофобной части). Следовательно, такие молекулы должны оказывать при встраивании в липидный бислой дестабилизирующее действие. Так как ДМ индуцирует быструю трансформацию клеток по типу дискоцит-эхи-

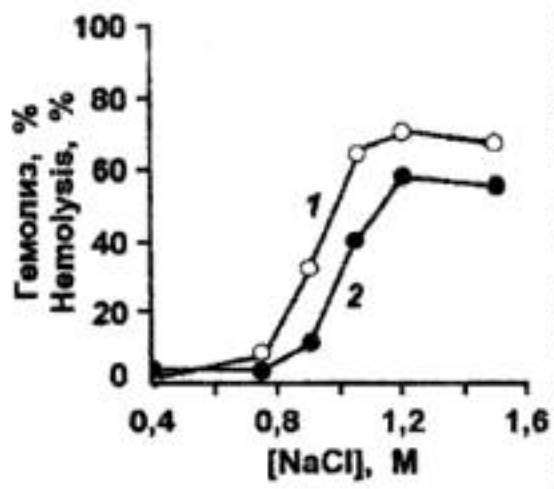



**Рис. 4.** Влияние ДМ на уровень гемолиза эритроцитов при холодовом шоке (охлаждение от 37 до 0 °С в гипертонических средах): *1* — контроль; *2* — ДМ ($7{,}5 \cdot 10^{-6}$ М).

**Fig. 4.** DM effect on the hemolysis level of erythrocytes at cold shock (cooling from 37 down to 0 °C in hypertonic media): *1* — control; *2* — DM ($7.5 \cdot 10^{-6}$ M).

tivity of the substance in all investigated range of media of preliminary incubation. The dependecy curve of cell hemolysis in 4.0 M NaCl on the osmolarity of media of preliminary dehydration has a turned over bell-like form with a minimum lysis value in 0.45 M NaCl. DM permits to eliminate both left and right shoulder of this curve depedning on the chosen temperature regimen of dehydration stage.

DM effect on erythrocyte sensitivity to a cold shock was studied. Fig. 4. demonstrates the dependency of erythrocyte hemolysis level on salt concentration in the medium at temperature shift from 37 down to 0 °C. As it is seen, cell hemolysis sharply increase, starting from the concentration of NaCl 0.75 M and reaches the maximum in the medium, containing 1.2 M NaCl. DM in the concentration of $7.5 \cdot 10^{-6}$ M causes a slight protective effect on cells, that was manifested considerably slighter in comparison with analogous effect of cation compound chlorpromazine [5].

It is known, that amphiphiles in sublytic concentrations protect erythrocytes against hypotonic hemolysis [6]. However under high concentrations the same substances initiate hemolysis of erythrocytes even in an isotonic medium. For example, DM in the concentration of 40 μM significantly decreases hypotonic lysis of erythrocytes, meanwhile as amphiphile causes the cell damage under concentration higher than 60 μM [9]. Such biphase behavior of amphiphiles, when rising the concentration, is characteristic for a great number of various compounds and, perhaps, is the consequence of apmphiphilic character of the substances.

DM molecule shape is a truncated cone (a large section square in polar head and not large in hydrophobic part). So these molecules should cause during building into a lipid bilayer a destabilizing effect.

Since DM initiates a rapid cell transformation on the type discocyte-echinocyte and achieved degree of echinocytosis does not change with a time, then DM does not penetrate into an inner monolayer of a membrane. An outer monolayer must be subjected to a considerable stress. However taking into consideration the fact, that integrity of a cell and bilayer preserves in the presence of amphiphilic molecules, one can suppose, that in membrane there are processes, resulting in a rapid redistribution of bilayer lipids between two monolayers, that keeps a stable bilayer configuration. The data on redistribution of spin-la-



Матеріал, захищений авторським правом

ноцит и достигнутая степень эхиноцитоза не изменяется во времени, ДМ не проникает во внутренний монослой мембраны. Наружный монослой должен подвергаться значительному стрессу. Но исходя из того, что целостность клетки и бислоя сохраняется в присутствии амфифильных молекул, можно полагать, что в мембране происходят процессы, приводящие к быстрому перераспределению липидов бислоя между двумя монослоями, которое поддерживает стабильную бислойную конфигурацию. Об этом свидетельствуют данные о перераспределении спин-меченых фосфолипидов под действием хлорпромазина [10] и флюоресцентно-меченых фосфолипидов в присутствии алифатических спиртов [11]. Амфифилы в сублитических концентрациях вызывают освобождение мембранных везикул [9] и потерю мембранного материала [7].

Все это позволяет предположить, что антигемолитическая активность амфифильных соединений может быть обусловлена именно мембранными перестройками, запускаемыми при встраивании амфифилов в бислой.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждениии.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
2. *Дунаевская О.Н., Панталер Е.Р., Шпакова Н.М., Бондаренко В.А.* Некоторые возможности повышения устойчивости эритроцитов к холодовому и гиперосмотическому воздействию при использовании катионных амфифилов // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 1.– С. 21–27.
3. *Дунаевская О.Н., Шпакова Н.М.* Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– 69, № 2.– С. 30–34.
4. *Поздняков В.В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к осмотическому и температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
5. *Шпакова Н.М., Панталер Е.Р., Бондаренко В.А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
6. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.
7. *Maher P., Singer S.J.* Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphatic molecules // Biochemistry.– 1984.– 23.– P. 232–240.
8. *Minetti M., Di Stasi A.M.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– 26, № 25.– P. 8133–8138.
9. *Hagerstrand H, Isomaa D.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interact.– 1991.– 79.– P. 335–347
10. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P.F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim. Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.
11. *Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1992.– 1111, № 1.– P. 35–44.
12. *Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B.* Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta Pharm.– 1992.– 42, № 1.– P. 25–35.


Поступила 21.07.98

belled phospholipids under chlorpromazine effect [10] and fluorescent-labelled phospholipids in the presence of aliphatic alcohols [11] confirm this. Amphiphiles in sublytic concentrations cause a release of membrane vesicles [9] and loss of membrane material [7].

All this allows to suppose, that antihemolytical activity of amphiphilic compounds can be stipulated by the membrane rearrangements, triggered during amphiphile building into a bilayer.

## REFERENCES


1. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Biological membrane structural alterations under cooling conditions.– Kiev: Naukova dumka, 1982.– 255 p.
2. *Dunayevskaya O.N., Pantaler E.R., Shpakova N.M., Bondarenko V.A.* Some possibilities of enhancement of erythrocytes resistance to cold and hyperosmotic effect using cationic amphipates // Probl. of Cryobiology.– 1995.– № 1.– P. 21–27.
3. *Dunayevskaya O.N., Shpakova N.M.* Threefluorperazine protective effect under erythrocytes hyperosmotic shock conditions // Ukr. Biochem. Journ.– 1997.– 69, № 2.– P. 30–34.
4. *Pozdnyakov V.V.* The effect of media composition and osmolarity on erythrocytes resistance to osmotic and temperature shock. Author abstract for PhD (biology) obtaining.– Kharkov, 1989.– 16 p.
5. *Shpakova N.M., Pantaler E.R., Bondarenko V.A.* Chlorpromazine antihaemolitic effect under erythrocytes hyperosmotic and cold shock conditions // Biochemistry.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
6. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.C.* Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.
7. *Maher P. and Singer S.J.* Structural changes in membranes produced by the binding of small amphiphatic molecules // Biochemistry.– 1984.– 23.– P. 232–240.
8. *Minetti M., Di Stasi A.M.M.* Involvement of erythrocyte skeletal proteins in the modulation of membrane fluidity by phenothiazines // Biochemistry.– 1987.– 26, № 25.– P. 8133–8138.
9. *Hagerstrand H, Isomaa D.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interact.– 1991.– 79.– P. 335–347
10. *Rosso J., Zachowski A., Devaux P.F.* Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in the human erythrocyte membrane: relation to shape changes // Biochim Biophys. Acta.– 1988.– 942, № 2.– P. 271–279.
11. *Schwichtenhovel C., Deuticke B., Haest C.W.M.* Alcohols produce reversible and irreversible acceleration of phospholipid flip-flop in the human erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta.– 1992.– 1111, № 1.– P. 35–44.
12. *Svetina S., Vrhovec S., Gros M., Zeks B.* Red blood cell membrane as a possible model system for studying mechanisms of chlorpromazine action // Acta Pharm.– 1992.– 42, № 1.– P. 25–35.


Accepted in 21.07.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 577.217

UDC 57.043: 577.217

# Регуляция активности белков холодового шока

Ю. Е. МИКУЛИНСКИЙ

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

# The Activity of Cold Shock Protein Regulation

Yu. E. MIKULINSKY

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

Описана недавно открытая группа белков холодового шока. Освещены вопросы регуляции активности, возможного происхождения, общности представителей семейства с известными стресс-белками.

Описана нещодавно відкрита група білків холодового шоку. Розглянуто питання регуляції активності, походження і спільності членів групи з відомими стрес-білками.

Recently discovered group of cold shock proteins is described. The questions of activity regulation, possible origin and similarity of family members with known stress-proteins are discussed.

Остановимся на сложном и малопонятном пока механизме активации синтеза белков описываемой группы после холодового шока. Чтобы проанализировать механизм индукции холодовым шоком CspA, был проведен делеционный анализ его гена [11]. Обнаружено, во-первых, что АТ-богатая последовательность (–47 до –38) вверх по ходу от cspA –35 области может действовать как UP-элемент, играющий решающую роль в транскрипции cspA как при 37, так и 15 °С. Во-вторых, необычно длинная 5′-нетранслируемая область мРНК cspA негативно влияет на экспрессию cspA при 37 °С, а также оказывает положительный эффект на стабилизацию мРНК при низкой температуре. Было показано, что состоящий из 14 пар оснований даунстрим бокс (ДБ), расположенный 12-ю парами оснований ниже инициирующего кодона мРНК cspA и комплементарной последовательности, расположенной около декодирующей области 16S rRNA, является необходимым для трансляции мРНК при ростовой лаг-фазе после холодового шока. В этой фазе трансляция мРНК генов, не связанных с холодовым шоком, блокирована, поскольку для образования комплекса инициации трансляции они требуют специфических рибосомальных факторов. Предполагается, что ДБ в холодошоковых мРНК позволяет формировать стабильный инициирующий комплекс при низкой температуре, когда рибосомальные факторы холодового шока отсутствуют.

В [5] отмечено, что "холодовой бокс" существует в 5′-нетранслируемых областях (5′ UTR) всех трех генов (cspA, cspB, csdA) белков холодового шока CspA, CspB, CsdA. Суперпродукция 5′-нетранслируемых областей мРНК не только cspA, но и cspB, csdA снижает репрессию всех трех генов в одно и то же время. И наоборот, когда область "холодового бокса" была удалена из cspA 5′ UTR, ее дерепрес-

Let's consider a complicated and still difficult for understanding mechanism of protein synthesis activation in the described group after a cold shock. To analyze the mechanism of CspA induction by a cold shock, deletion analysis of its gene has been conducted [11].

It was revealed first of all, that AT-rich sequence (–47 to –38) up from CspA –35 region may affect as the UP-element, playing a decisive role in the CspA transcription at 37 and 15 °C. Then, extraordinarily long 5′-nontranslated mRNA cspA region negatively affects the cspA expression at 37 °C, as well as positively affects the mRNA stabilization at low temperature. It has been demonstrated, that downstream box (DB), consisting of 14 pair bases, located by 12 base pairs lower than mRNA cspA initiating codone and complementary sequence, located near the RNA 16S decoding region, is necessary for mRNA translation during growth lag-phase after a cold shock. In this phase mRNA translation of genes, not connected with cold and shock is blocked up, because to form an initiation translation complex they require specific ribosomal factors. It is supposed, that DB in cold and shock mRNA allows to form a stable initiating complex at low temperature when cold shock ribosomal factors are absent.

It has been revealed in [5] that a "cold box" exists in 5′-non-translated regions (5′ UTR) of all three genes (cspA, cspB, csdA) of CspA, CspB, csdA cold shock proteins. Superproduction of 5′-untranslated mRNA regions of not only cspA, but also cspB, csdA decreases repression of all three genes simultaneously. And in the contrary, when a "cold box" region was deleted from the cspA 5′-UTR, its depressive functions were deleted. It has been established, that cspA depression, caused by the 5′-UTR superproduction at the end of acclimation phase, affects a transcription level, but not mRNA stabilization and testifies, that "cold box" region plays a negative role in the cspA



Матеріал, захищений авторським правом

сивные функции не проявлялись. Установлено, что дерепрессия cspA, вызванная суперпродукцией 5′ UTR в конце acclimation фазы, влияет на уровень транскрипции, но не стабилизации мРНК и свидетельствует, что область "холодового бокса" играет негативную роль в транскрипции cspA в адаптированных к холодовому шоку клетках. Роль области "холодового бокса" была подтверждена с помощью штаммов, мутантных по cspA, содержащих ген cspA с делецией по "холодовому боксу", интегрированному в хромосому. Штаммы показали высокий уровень продукции CspA, но не CspB во время экспоненциального роста при низкой температуре.

Определенный уровень взаимозаменяемости белков *Escherichia coli* и феномен негативной регуляции собственной генной активности белком CspA отмечают W. Bae et al. [2]. Когда ген белка CspA, главного белка холодового шока *Escherichia coli*, был разделен с помощью новых позитивно/негативных методов селекции, δ-cspA клетки не показали никаких заметных ростовых дефектов как при 37, так и 15 °C. С помощью двумерного электрофореза был проанализирован общий синтез белков после понижения температуры в штамме δ-cspA. Продукция гомологов CspA – CspB и CspG повысилась, продолжительность их экспрессии была пролонгирована, свидетельствуя, что они оба компенсаторны по функции CspA при отсутствии CspA во время адаптации к холодовому шоку. Интересно, что продукция 5′-нетранслируемой области (5′-UTR) cspA, содержащая 159 оснований, из хромосомного гена cspA cat не репрессируется после холодового шока. Когда независимая система, продуцирующая CspA, была добавлена к штамму δ-cspA, то 5′-UTR продукция для cspA cat гена существенно уменьшилась по сравнению со штаммом δ-cspA. При исследовании экспрессии трансляционно слитых cspA и cspB генов к lacZ в штамме δ-cspA было обнаружено, что cspA более жестко регулируется CspA,чем CspB. Авторы показали, что повышенная экспрессия 5′-UTR cspA mRNA в штамме δ-cspA проявляется главным образом на уровне транскрипции и стабилизирует мРНК. Стабилизация cspA мРНК в штамме δ-cspA была обнаружена для других мРНК, что подтверждает мнение: CspA функционирует как шаперон мРНК, дестабилизирующий их вторичную структуру.

Подобная взаимозаменяемость БХШ отмечена в [7]. Авторы показали, что главный БХШ *Bacillus subtilis* CspB может влиять не только на уровень нескольких индуцируемых холодом белков *B. subtilis*. Экспрессия этого белка в *Escherichia coli* при 37 °C (белки холодового шока *E. coli* отсутствуют) вызывает резкое уменьшение скорости роста клеток и активно влияет на синтез белка, что подтверждается двумерным электрофорезом. Это влияние включает как уменьшение, так и увеличение уровней синтеза специфических белков. Показано сильное влияние БХШ *B. subtilis* на синтез белков *Escherichia coli* и предполагается сходство функций CspA в *E. coli* и CspB в *B. subtilis*.

Аминокислотная последовательность CspA показывает 43%-ю идентичность домену холодового шока Y-box белкового семейства эукариот, которое взаимодействует с РНК и ДНК для регуляции их функций [9]. Подобные данные приведены и в ра-

transcription in adapted to cold shock cells. The role of "cold box" region was confirmed by means of strains, mutant by cspA, containing the cspA gene with deletion by "cold box", integrated in chromosome. Strains demonstrated a high level of CspA production, but not CspB ones during an exponential growth at a low temperature.

A certain interchangeability level of the *Escherichia coli* proteins as well as phenomena of negative regulation of own gene activity by means of Csp A proteins are observed by W. Bae et al. in [2]. When the cspA protein gene, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, was divided by means of new positive/negative selective methods, delta cspA cells did not show any visible growth defects at 37 as well as at 15 °C. A general protein synthesis after a temperature decrease in the delta cspA strain has been analyzed by means of two-dimentional electrophoresis. Production of CspA–CspB and CspG homologues increased, duration of their expression was prolonged, testifying that they both are compensatory concerning CspA function with CspA absence during adaptation to a cold shock. It is interesting, that cspA production by 5 °C-UTR, containing 159 bases of chromosomal cspA cat gene, is not repressed after a cold shock. When an independent system, producing CspA, was added to the delta cspA strain, then the 5*prime*-UTR production for cspA cat gene coniderably decreased in comparison with delta cspA strain. When studying the expression of translationally fused cspA and cspB genes to lacZ in the delta cspA strain it has been revealed, that cspA is more hardly regulated by CspA, than the CspB one. The authors demonstrated, that the 5′-UTR cspA mRNA increased expression in the delta cspA strain manifests mainly at transcription level and stabilizes mRNA. cspA mRNA stabilization in the delta cspA stain has been revealed for many other mRNA, what confirms the notion, that CspA functions as the mRNA chaperon, destabilizing their secondary structure.

A similar CSP interchangeability has been demonstrated [7]. The authors showed, that the CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* might affect not only the level of some proteins of *B. subtilis*, induced by means of cold. This protein expression in *Escherichia coli* at 37 °C (cold shock proteins of *E. coli* are absent) provokes a sharp decrease of a cellular growth rate and actively affects protein synthesis, what is confirmed by means of two-dimentional electrophoresis. This effect includes a decrease, as well as an increase of synthesis levels in specific proteins. A great effect of *B. subtilis* CSP on the synthesis of *E. coli* proteins and similarity of CspA function in *E. coli* and CspB ones in *B. subtilis* was demonstrated.

An amino acid CspA sequence shows the 43%-identity to a cold shock domain of the Y-box eucaryote protein family, interacting with RNA and DNA for their function regulation [9]. Similar data are demonstrated also in the work of Brazilian scientists, who



Матеріал, захищений авторським правом

боте бразильских ученых, изучавших *Schistosoma mansoni* [6]. Они клонировали и охарактеризовали кДНК *Schistosoma mansoni*, кодирующую основной белок, гомологичный человеческому Y-box связывающему белку 1 (YB-1). 1,3-кб *S. mansoni* YB-1, который экспрессируется на разных стадиях жизненного цикла паразита, кодирует протеин размером 217 аминокислот, содержащий ближе к его N-концу связывающую нуклеиновые кислоты последовательность, известную как домен холодового шока (CSD). Этот домен на 64% идентичен холодошоковым доменам других членов семейства Y-box связывающих белков и на 43% – холодошоковому белку CspA *Escherichia coli*. У *S. mansoni* YB-1 холодошоковый домен обладает специфическими структурными характеристиками, которые позволяют образовываться таким димерным формациям, как у холодошокового протеина *Bacillus subtilis* CspB. С-терминальная область *S. mansoni* YB-1 отличается от других Y-box связывающих белков присутствием тандемных повторов Arg и Gly, свидетельствующих о формировании фиброин-подобной бета-сэндвичевой структуры. Эта новая складчатая модель С-конца *S. mansoni* YB-1 может подтвердить особую специфическую функцию этого белка паразита.

Происхождение белков холодового шока рассматривается и в [3]. Отмечается, что домен S1, первоначально выявленный в рибосомальном белке S1, обнаружен у большого количества РНК-ассоциированных белков. С помощью ЯМР была определена структура S1 РНК-связывающего домена полинуклеотидфосфорилазы *E. coli*. Она представляет собой пятиполосные антипараллельные бета-структуры. Структура домена S1 очень сходна с таковой у белков холодового шока, свидетельствуя о том, что оба они произошли от древнего РНК-связывающего белка. Исследования позволили обнаружить домен S1 в белках RNase E, RNase II, NusA, EMB-5 и других.

Graumann P. и Marahiel M. A. обсуждают вопросы конвергентной эволюции РНК-связывающих модулей [8]. Дивергентная модель эволюции, постулируют они, может объяснить, как многие белки, содержащие структурно подобные домены, которые выполняют множество связанных функций, произошли из сравнительно небольшого числа модулей или белковых доменов. Однако она не может объяснить, как эволюционировали белковые домены с подобными, но отличающимися функциями, и подобной, но отличающейся структурой. Примерами этого являются РНК-связывающий белок, содержащий РНК-связывающий домен, и новая белковая группа – белковое семейство доменов холодового шока. Оба белковых домена содержат консервативный РНП участок на сходных однонитчатых поверхностях, связывающих нуклеиновую кислоту. За исключением РНП, имеющих сходные функции, семейства белков не выявляют сходства между собой по топологии и аминокислотным последовательностям. Авторы предлагают считать это интересным образцом конвергентной эволюции на молекулярном уровне. Прежде сообщалось, что бета-исчерченные поверхности негомологичных белков людей, дрожжей и фагов могут взаимодействовать с РНК, свидетельствуя о том, что подобный тип связывания РНК может быть широко распространен.

studied *Schistosoma mansoni* [6]. They cloned and characterized *Schistosoma mansoni* cDNA, encoding the major protein, homologous to the human Y-box binding 1 protein (YB-1). 1.3-kb *S. mansoni* YB-1, expressed at different stages of a parasite life cycle, encodes a protein with the size of 217 amino acids, containing nearer to its end a sequence, binding nucleic acids and known as a cold shock domain (CSD). This domain is idented in 64% to cold and shock domains of another members of Y-box family of binding proteins and in 43% is similar to the cold and shock CspA protein of *Escherichia coli*. In YB-1 *S. mansoni* a cold and shock domain posesses specific structural characteristics, alowing to form such two-dimentional fractions, as in CspB cold and shock protein of *Bacillus subtilis*. C-terminal region of *S. mansoni* YB-1 differed from another Y-box binding proteins by the pesence of the tandem Arg and Gly repetitions, testifying to the formation of fibrine-like beta-sandwich structure. This new plicated model of the C-end of *S. mansoni* YB-1 may confirm a special specific function of this parasite protein.

An origin of cold shock proteins is discussed in [3]. It is observed, that the S1 domain, initially found in the ribosomal S1 protein, has been revealed in a great number RNA-associated proteins. The S1 structure of RNA-binding domain of *E. coli* polynucleotidephosphorilase has been conducted by means of PCR. It is 5-band antiparallel beta-structure. S1 domain structure is similar with one in cold shock proteins, testifying to, that they both come from an ancient RNA-binding protein. Investigations allowed to reveal S1 domain in proteins, RNase E, RNase II, NusA, EMB-5 and others.

Graumann P. and Marahiel M. A. discuss the questions of a convergent evolution of RNA-binding modules [8]. They postulate, that divergent evolutional model may explain, how different proteins, containing structurally similar domains, accomplishing a lot of binded functions, come from comparatively small number of modules or protein domains. However, it can not explain, how protein domains evulutioned with similar functions, but different ones, and similar, but differing structure. RNA-binding protein, containing RNA- binding domain and new protein group – a protein family of cold shock domains are the examples of this. Both protein domains contain RNP section on initial one-thread surfaces, binding nucleic acid. With the exception of RNP, which have similar functions, protein families did not reveal the similarity between them on topology and amino acid sequences. The authors propose to consider, that it is an interesting example of convergent evolution at molecular level. It has been reported earlier, that beta-covered with lines surfaces of non homologous human, yeast and phage proteins may interact with RNA, testifying to, that such a type of the RNA binding may be widely spreaded.



Матеріал, захищений авторським правом

На модели *Listeria monocytogenes* французские ученые [12] изучили стресс-белки, вызываемые различными физико-химическими факторами (*pH* 4, *pH* 10, 0,015% SDS, 0,03% дезоксихолатом натрия и 4%-й этанол), холодовым и тепловым шоком. Более половины белков, нормально синтезируемых клетками листерии, репрессированы в условиях теплового и холодового шока. Синтез нерепрессированных белков повышается. Кроме того, в условиях стресса синтезируются новые белки. Каждый стресс-фактор индуцирует специфический набор белков, характеризующийся определенной молекулярной массой и изоэлектрической точкой. Исследователи не обнаружили универсальных стрессовых белков, хотя некоторые из протеинов индуцировались под действием двух или трех стресс-факторов. Отличался спектр белков теплового и холодового шока и у водорослей *Rhizobium* [4]. Имеются сообщения об универсальности стресс-белков у определенных организмов. Так, в [13] отмечается, что белок теплового шока ClpB, который является молекулярным шапероном, активно синтезируется во время умеренного холодового шока у цианобактерии *Synechococcus sp. strain PCC 7942*. При снижении температуры с 37 до 25 °C синтез этого белка (92 kDa) увеличивается пятикратно.

Подробно этот вопрос рассмотрели исследователи из Гарвардской медицинской школы [10]. Они изучали триггер-фактор (TF) *Escherichia coli*, который является молекулярным шапероном с примечательными характеристиками: имеет пролил-изомеразную активность, ассоциируется с полипептидами рибосом, связывается с GroEL, повышает афинность GroEL к белкам, является промотором деградации ряда полипептидов. Поскольку последний эффект чаще возникает при 20 °C, авторы изучали влияние температуры на TF. В отличие от большинства шаперонов (в том числе GroEL), которые являются белками теплового шока, уровень TF прогрессивно возрастает по мере понижения температуры с 42 до 16 °C и даже при 4 °C синтез данного белка повышается. При уменьшении температуры с 37 до 10 °C или добавлении хлорамфеникола синтез TF индуцируется, что характерно для белков холодового шока. Инкубация клеток *E. coli* при 4 °C снижает их жизнеспособность с экспоненциальной скоростью. Клетки с уменьшенным содержанием TF погибают быстрее, жизнеспособность же клеток с суперэкспрессированным TF выше. Суперпродукция TF защищает от холодового фактора, но уменьшает жизнеспособность при 50 °C, а недостаток триггер-фактора повышает выживаемость при этой температуре. В противоположность этому суперпродукция GroEL/ES или других белков теплового шока, предохраняя при высоких температурах, снижает выживание при 4 °C. Этим может быть объяснен феномен подавления экспрессии белков теплового шока при понижении температуры. Таким образом, делают вывод авторы [10], дифференциальная индукция TF при низких и белков теплового шока при высоких температурах свидетельствует о селективных механизмах защиты от этих противоположных экстремальных факторов.

Наши исследования были посвящены вопросам синтеза белков и нуклеиновых кислот применительно к процессу сохранения криоконсервированных клеток. Было показано, что криоконсервирование и

French scientists [12] studied stress-proteins, induced by different physical and chemical factors (*pH* 4, *pH* 10, 0.03% of sodium dezoxyholate and 4% ethanol, cold and heat shock) on the model of *Listeria* monocytogenes. More than a half of proteins, normally synthesized by listeria cells, have been repressed under the conditions of cold and heat shock. The synthesis of not repressed cells increases. Besides that, new proteins are synthesized under the stress conditions. Each stress factor induces a specific protein collection, characterizing by the definite molecular weight and isoelectric point. The investigators do not found universal stress proteins, though some proteins have been induced under the effect of two or three stress-factors. The spectrum of heat and cold shock differs also in the *Rhizobium* algae [4]. There are the reports about the universality of stress-proteins in definite organisms. So, in [13] is pointed, that ClpB cold shock protein, that is molecular chaperone, actively synthesises during a moderate cold shock in the *Synechococcus sp. strain PCC 7942* cianobacterium. At the temperature decrease from 37 down to 25 °C this protein (92 kDa) synthesis increases in five times.

The investigators from the Harward Medical School discussed this question in details [10]. They studied the *Escherichia coli* trigger factor (TF), that is a molecular chaperone with notable characteristics: it has prolyl-isomerase activity, associates with ribosome polypeptides, binds with GroEL, increases the GroEL affinity to proteins, is a promoter of degradation in series of polypeptide. The authors studied the temperature effect on TF, because the last effect appears often at 20 °C. In contrast to the majority of chaperones (as well as GroEL), which are heat shock proteins, the TF level progressively increases as the temperature decrease from 42 down to 16 °C and even at 4 °C, this protein synthesis increases. The TF synthesis is induced at the temperaure decrease from 37 down to 10 °C or at chloramphenicole adding, that is characteristic to cold shock proteins. *E. coli* cell incubation at 4 °C decreases their viability with the exponential rate. The cells with a decreased TF content die more rapidly, cellular viability with a superexpressed TF is higher. TF superproduction depends on a cold factor, decreases a viability at 50 °C, trigger factor insufficiency increases viability at this temperature. In contrast to this, the GroEL or another cold shock protein superproduction, protecting at high temperatures, decreases viability at 4 °C. This factor explains the phenomenon of supression of cold shock protein expression at temperature decrease. Thus, the authors conclude, that, that differentiative TF induction at low temperatures and cold shock protein one at high temperatures testifies to selective protective mechanisms on this opposite extreme factors [10].

Our investigations were devoted to the questions of protein and nucleic acid synthesis as for to the process of preservation of cryopreserved cells. It has been shown that cryopreservation and lyophilization



Матеріал, захищений авторським правом

лиофилизация активируют синтез стресс-протеинов в клетках *Escherichia coli*. При этом основную роль играет протеин с молекулярной массой 26 kD, который на первых этапах культивирования бактерий после возвращения в условия нормотермии обнаруживается в цитоплазме, а затем и в мембранной фракции. Максимальный синтез этого белка наблюдали после 30 мин культивирования и только следы его обнаруживали через 60 мин. В условиях нормальной температуры синтез данного белка вызывали экспозицией гипертонического раствора 3M NaCl. Синтез стресс-белков под влиянием гипотермии, криоконсервирования и лиофилизации генетически запрограммирован и инициирует стадию репарации нелетальных повреждений. Обнаруженный нами белок 26 kD предлагаем считать представителем белков холодового шока, активирующегося в специфических условиях функционирования клеток после криоконсервирования [1, 14].

activate stress protein synthesis in the *Escherichia coli* cells. Thereat the protein with the molecular weight of 26 kD, that at first stages of bacterium cultivation after the returning to normothermia conditions is revealed in cytoplasm, and then in membrane fraction, plays the main role. The maximum synthesis of this protein was observed in 30 min after cultivation, and only its signs were found in 60 min. Under the conditions of normal temperature this protein synthesis was provoked by the 3M NaCl hypertonic solution exposure. Stress protein synthesis under the effect of hypothermia, cryopreservation and lyophilization was genetically programmed and initiates the reparation stage of non-lethal damages. The 26 kD protein, revealed by us, we propose to consider as the member of cold shock proteins, activating under the specific conditions of cellular functioning after cryopreservation.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Микулинский Ю. Е., Котляров А. О., Цуцаева А. А.* Индукция синтеза белков, подобных белкам теплового шока, у *E. coli* под влиянием холодового воздействия // Криобиология.– 1987.– № 3.– С. 50–51.
2. *Bae W., Jones P. G., Inouye M.* CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression // J. Bacteriol.– 1997.– 179, № 22.– P. 7081–7088.
3. *Bycroft M., Hubbard T. J., Proctor M. et al.* The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold // Cell.– 1997.–88, № 2.– P. 235–242.
4. *Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., Antoun H.* Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia // Appl. Environ. Microbiol.– 1992.– 58, № 9.– P. 2846–2853.
5. *Fang L., Hou Y., Inouye M.* Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the cspA mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.– 1998.– 180, № 1.– P. 90–95.
6. *Franco G. R., Garratt R. C., Tanaka M. et al.* Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein // Gene.– 1997.– 198, № 1–2.– P. 5–16.
7. *Graumann P., Marahiel M. A.* Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtillis*, on protein synthesis in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet.– 1997.– 253, № 6.– P. 745–752.
8. *Graumann P, Marahiel M. A.* A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules // Bioessay.– 1996.– 18, № 4.– P. 309–315.
9. *Jiang W, Fang L., Inouye M.* The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation // J. Bacteriol.– 1996.– 178, № 16.– P. 7081–7088.
10. *Kandror O., Goldberg A. L.* Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of Escherichia coli at low temperatures // Proc. Nath. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94, № 10.– P. 4978–4981.
11. *Mitta M, Fang L, Inouye M.* Deletion analysis of cspA of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction // Mol. Microbiol.– 1997.– 26, № 2.– P. 321–335.
12. *Phan-Thanh L, Gormon T.* Stress proteins in *Listeria* monocytogenes // Electrophoresis.– 1997.– 18, № 8.– P. 1464–1471.
13. *Porankiewicz J., Clarke A. K.* Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus sp. strain PCC 7942* // J. Bacteriol.– 1997.– 179, № 16.– P. 5111–5117.
14. *Tsutsaeva A. A., Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O.* The effect of cryostress on protein synthesis in *E. coli* cells // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 7.– P. 71–82.


Поступила 19.06.98

## REFERENCES


1. *Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O., Tsutsayeva A. A.* Induction of protein synthesis, similar to cold shock proteins, in *E. coli* under the effect of cold action // Kriobiologiya.– 1987.– № 3.– P. 50–51.
2. *Bae W., Jones P. G., Inouye M.* CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression // J. Bacteriol.– 1997.– 179, № 22.– P. 7081–7088.
3. *Bycroft M., Hubbard T. J., Proctor M. et al.* The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold // Cell.– 1997.–88, № 2.– P. 235–242.
4. *Cloutier J., Prevost D., Nadeau P., Antoun H.* Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia // Appl. Environ. Microbiol.– 1992.– 58, № 9.– P. 2846–2853.
5. *Fang L., Hou Y., Inouye M.* Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the cspA mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.– 1998.– 180, № 1.– P. 90–95.
6. *Franco G. R., Garratt R. C., Tanaka M. et al.* Characterization of a *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of the Y-box binding protein // Gene.– 1997.– 198, № 1–2.– P. 5–16.
7. *Graumann P., Marahiel M. A.* Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtillis*, on protein synthesis in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet.– 1997.– 253, № 6.– P. 745–752.
8. *Graumann P, Marahiel M. A.* A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules // Bioessay.– 1996.– 18, № 4.– P. 309–315.
9. *Jiang W, Fang L., Inouye M.* The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation // J. Bacteriol.– 1996.– 178, № 16.– P. 7081–7088.
10. *Kandror O., Goldberg A. L.* Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of Escherichia coli at low temperatures // Proc. Nath. Acad. Sci. USA.– 1997.– 94, № 10.– P. 4978–4981.
11. *Mitta M, Fang L, Inouye M.* Deletion analysis of cspA of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction // Mol. Microbiol.– 1997.– 26, № 2.– P. 321–335.
12. *Phan-Thanh L, Gormon T.* Stress proteins in *Listeria* monocytogenes // Electrophoresis.– 1997.– 18, № 8.– P. 1464–1471.
13. *Porankiewicz J., Clarke A. K.* Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus sp. strain PCC 7942* // J. Bacteriol.– 1997.– 179, № 16.– P. 5111–5117.
14. *Tsutsaeva A. A., Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O.* The effect of cryostress on protein synthesis in *E. coli* cells // Cryo-Lett.– 1993.– 14, № 7.– P. 71–82.


Accepted in 19.06.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 617.713: 615.361.014.41

UDC 617.713: 615.361.014.41

# Динамика активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения

Т. Н. ЮРЧЕНКО, А. П. БЕЛОНОЖКО, Т. М. ШАРЛАЙ

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

# Dynamics of α-GPDG Activity in Cells of Growing and Regenerating Epithelium of Cornea in its Hypothermal Storage Procces

T. N. YURCHENKO, A. P. BELONOZHKO, T. M. SHARLAY

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

Методами количественной гистохимии и количественного фотометрического анализа исследовано изменение активности α-ГФДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в зависимости от сроков ее гипотермического хранения.

Методами кількісної гістохімії і кількісного фотометричного аналізу досліджено зміни активності α-ГФДГ зростаючого і поновлюючого епітелію рогівки в залежності від термінів її гіпотермічного зберігання.

The changes of α-GPDG activity in cells of growing and regenerating epithelium of cornea, depending on the terms of its hypothermal storage were investigated using the methods of a quantitative histochemistry and a quantitative photometrical analysis.

Особенности регенерации клеточной популяции обусловливают развитие комплекса компенсаторно-приспособительных процессов в органах и возможность полного или частичного восстановления биообъектов после повреждения. При исследовании влияния охлаждения следует учитывать филогенетические особенности сложившейся системы гистологических элементов, объединенных общей структурой, функцией и происхождением [1, 2].

Согласно общепринятой классификации по типу регенерации ткани и органы разделяются на статические (стабильные), растущие и обновляющиеся [1, 3].

В роговой оболочке глаза клетки эпителиального слоя относятся к категории растущих, а эндотелиального — обновляющихся.

Поскольку ферментные системы являются зеркалом метаболического статуса клетки, а в покоящихся и пролиферирующих клетках они существенно различны, то можно предположить, что чувствительность анаболических и катаболических ферментных систем будет показателем реактивности клеток как в условиях сохранения ее целостности и межклеточных взаимодействий, так и при действии экстремальных факторов [4]. Цель настоящего исследования — сравнительная оценка влияния гипотермической температуры на некоторые метаболические показатели эпителиальных клеток различного гистогенеза.

Объектом исследования служили роговицы взрослых (возраста 1–1,5 мес.) кроликов. Для изу-

Peculiarities of the regeneration of a cellular population stipulate the complex development of compensatoric and adaptive processes in organs and the possibility of a complete and partial recovery of bioobjects after a damage. When investigating the effect of cooling the phylogenetic peculiarities of the formed system of histological elements, united by common structure, function and origin should be taken into consideration [1, 2].

According to a generally accepted classification by a regeneration type, tissues and organs are divided in static (stable), growing and regenerating ones [1, 3].

In an eye cornea cells of an epithelial layer are related to the category of growing, and an endothelial layer — to the regenerating ones.

Since enzymic systems are the mirror of the cell metabolic status, and in resting and proliferating cells they are significantly different, so one can suppose that the sensibility of anabolic and catabolic enzymic systems will be the index of cell reactivity both under conditions of preservation of its integrity and intracellular interactions and under the effect of extreme factors [4].

The aim of given investigation was a comparative estimation of a hypothermal temperature effect on some metabolic indices of epithelial cells of different histogenesis. Corneas of adult rabbits (aged 1–1.5 months) were the investigation objects. In order to study the dynamics of α-GPDG activity within a prolonged hypothermal storage the object of the investigation (eyeballs) were placed into a humid cham-



Матеріал, захищений авторським правом

чения динамики активности α-ГФДГ при продленном гипотермическом хранении объект исследования (глазные яблоки) помещали во влажную камеру, в которой поддерживалась контролируемая температура 4 °С.

Гистохимические исследования проводили на роговицах после их хранения в составе глазного яблока во влажной камере в течение 3 ч, 1, 2, 4, 6 и 8 сут.

Гистоэнзимологические исследования выполняли на криостатных срезах (температура камеры криостата –20 °С) толщиной 10 мкм. Полученные срезы помещали на предметное стекло и инкубировали с соответствующим субстратом согласно классическим методикам.

Изучение активности α-ГФДГ имеет непосредственное отношение к выяснению характера действия гипоксии в условиях пролонгированной гипотермии объекта, поскольку цитоплазматическая α-глицерофосфатдегидрогеназа (α-ГФДГ) К.Ф.1.1.1.8. принимает участие во втором этапе гликолиза, катализирует окислительно-восстановительные реакции и процессы накопления энергии в клетке. Фермент относится к НАД-зависимым и локализуется на мембранах эндоплазматической сети. Внемитохондриальная НАД-зависимая α-ГФДГ также участвует в челночных реакциях, направленных на перенос электронов в сторону митохондрий.

В гистохимической реакции акцептором электронов служил нитросиний тетразолий (НСТ), образующий водонерастворимый ярко окрашенный продукт реакции — диформазан, осадок которого указывает на локализацию и активность исследуемого фермента.

Для количественной оценки гистохимических реакций производили фотометрирование срезов, находящихся на предметном стекле. Интенсивность реакций учитывалась при помощи телевизионного микроскопа-фотометра-флуориметра.

Пригодность гистохимических реакций для фотометрирования проверяли регистрацией спектров пропускания на объектах с различной плотностью. Характеристики спектра поглощения хромофора подтвердили пригодность для фотометрирования всех реакций с НСТ, продуктом которых является диформазан. По приведенной к максимуму усредненной кривой спектральных характеристик хромофора в районе максимума поглощения была выбрана рабочая длина волны 546 нм, соответствующая зеленой линии спектра испускания ртутной лампы ДРК-120.

При планировании исследований было обращено внимание на определение достаточного количества измерений, обеспечивающего требуемый уровень достоверности результатов ($P > 0{,}95$).

По предварительной оценке коэффициента вариации измеряемых величин был установлен объем фотометрических измерений на единичном объекте (число первичных дат) — 40–50 измерений, где поддерживалась контролируемая температура 4 °С.

ber, where the controlled temperature of 4 °C was maintained.

Histochemical studies were carried out in corneas after their storage as a part of an eyeball in a humid chamber during 3 hrs, 1, 2, 4, 6 and 8 days.

Histochemical studies were accomplished in cryostatic sections (the temperature of cryostate chamber was –20 °C) of 10 μm thickness. The sections obtained were placed on an objective glass and were incubated with a corresponding substrate according to classical methods.

The study of α-GPDG activity has a direct relation to the elucidation of the hypoxia effect character under conditions of a prolonged hypothermia of an object, since a cytoplasmatic α-glycerophosphate dehydrogenase (α-GPDG) K.F.1.1.1.8. participates in the second stage of glycolysis, catalyzes reductive and oxidative reactions and the pocesses of the energy accumulation in a cell. The enzyme is related to NAD-dependent and is localized on the membranes of an endoplasmatic net. An extramitochondrial NAD-dependent α-GPDG also participates in shuttle reactions directed to the trasfer of electrons towards the mitochondria.

In a histochemical reaction a nitroblue tetrasolium (NBT) served as the electron acceptor, forming a water-insoluble brightly stained product of the reaction — diphormazane, whose sediment points to the localization and activity of studied enzyme.

For a quantitative estimation of histochemical reactions one performed the photometric measurement of the sections, placed on an objective glass. The reaction intensity was recorded by means of a television microscope-photometer-fluorimeter.

The suitability of histochemical reactions for the photometric measurement was examined by means of the registration of transmission spectra in the objects with a different density. The characteristics of the chromophore transmission spectrum confirmed the suitability for photometric measurement of all reactions with NBT, whose product is diphormazane. By a reduced to the maximum averaged curve of the chromophore spectral characteristics in the area of the absorption maximum an operating wave-length of 546 nm, corresponding to a green line of the emission spectrum of DRK-120 mercury lamp was chosen.

When planning the investigations one paid attention to the determination of a sufficient number of measurements providing the level, required for true result ($P > 0.95$).

According to a preliminary estimation of the variation coefficient of the measured values, the volume of photometrical measurements in a single object (the primary figure number) — 40–50 measurements was established. In the same way a number of measurements in one series of the experiment (the secondary figure number) — 10 units, i.e. the number of experimental animals in one series of the experiment was determined.



Матеріал, захищений авторським правом

ний. Таким же образом было определено количество измерений в одной серии эксперимента (число вторичных дат) — 10 единиц, т.е. количество экспериментальных животных в одной серии эксперимента.

При оценке влияния гипотермического хранения на активность окислительно-восстановительных ферментов в клетках роговицы изучалось 2 типа клеток переднего и заднего слоев эпителия, или растущего и обновляющегося слоев эпителиальных клеток.

Количество измерений оптической плотности определялось числом серий в эксперименте, количеством животных в каждой серии и изучаемых объектов, числом измерений на единичном объекте.

Полученный большой цифровой массив потребовал статистической обработки с использованием ПЭВМ. Решение этой задачи было реализовано в соответствующем разделе программы "MORFO".

Для количественной оценки действия времени гипотермического хранения на активность окислительно-восстановительных ферментов результаты фотометрических измерений были обработаны методами дисперсионного, корреляционного и регрессионного анализа.

Полученные в результате количественного гистохимического анализа значения концентрации диформазана в клетках роговицы, которые свидетельствуют об удельной активности α-ГФДГ, позволили выявить различия в интенсивности реакции, а следовательно, и в активности фермента как в различных клеточных элементах, так и при различных сроках гипотермического хранения (табл. 1).

**Таблица 1**

**Динамика статистических показателей активности α-ГФДГ**

| Срок хранения | Статистические показатели | Тип эпителиальных клеток | |
|---|---|---|---|
| | | передний | задний |
| 3 ч | $M \pm m$ | 14,2 ± 0,12 | 12,1 ± 0,11 |
| | $V \pm v$ | 33,2 ± 0,60 | 20,4 ± 0,70 |
| | $V \pm v'$ | 4,5 ± 1,00 | 5,2 ± 1,20 |
| 1 сут | $M \pm m$ | 16,6 ± 0,13 | 14,0 ± 0,14 |
| | $V \pm v$ | 30,8 ± 0,60 | 21,2 ± 0,70 |
| | $V \pm v'$ | 5,4 ± 1,20 | 6,7 ± 1,50 |
| 2 сут | $M \pm m$ | 9,3 ± 0,09 | 8,3 ± 0,10 |
| | $V \pm v$ | 37,2 ± 0,70 | 25,9 ± 0,80 |
| | $V \pm v'$ | 6,3 ± 1,40 | 7,2 ± 1,60 |
| 4 сут | $M \pm m$ | 18,8 ± 0,21 | 14,5 ± 0,17 |
| | $V \pm v$ | 43,1 ± 0,80 | 25,4 ± 0,80 |
| | $V \pm v'$ | 8,7 ± 1,90 | 7,9 ± 1,80 |
| 6 сут | $M \pm m$ | 29,3 ± 0,40 | 22,5 ± 0,31 |
| | $V \pm v$ | 51,7 ± 1,00 | 30,4 ± 1,00 |
| | $V \pm v'$ | 8,1 ± 1,80 | 8,8 ± 2,00 |
| 8 сут | $M \pm m$ | 55,3 ± 0,72 | 43,8 ± 0,71 |
| | $V \pm v$ | 49,8 ± 0,90 | 35,2 ± 01,10 |
| | $V \pm v'$ | 8,9 ± 2,00 | 10,1 ± 2,30 |

Динамика активности α-ГФДГ в процессе хранения роговицы носит нелинейный характер. На начальном этапе хранения активность фермента в

When estimating the effect of hypothermal storage on the activity of reductive and oxidative enzymes in cornea cells, 2 types of cells of anterior and posterior layers of epithelium, or growing and regenerating layers of epithelial cells were studied.

The measurement number of an optical density was determined by means of the series number in the experiment, the number of animals in each series and studied objects, the number of measurements in a single object.

Obtained large figure data required a statistical processing using PC. This task solving was realized in a corresponding part of "MORFO" program.

For a quantitative evaluation of the hypothermal storage time effect on the activity of reductive and oxidative enzymes, the results of photometrical measurements were treated using methods of dispersive, correlative and regressive analysis.

Obtained as a result of a quantitative histochemical analysis values of diphormazane concentration in cornea cells, testifying to a specific activity of α-GPDG, permitted to reveal differencies in the reaction intensity and consequently in enzyme activity, both in different cellular elements, and at different terms of hypothermal storage (Table 1).

**Table 1**

**Dynamics of statistical indices of α-GPDG activity**

| Storage term | Statistical indices | Type of epithelial cells | |
|---|---|---|---|
| | | anterior | posterior |
| 3 hrs | $M \pm m$ | 14.2 ± 0.12 | 12.1 ± 0.11 |
| | $V \pm v$ | 33.2 ± 0.60 | 20.4 ± 0.70 |
| | $V \pm v'$ | 4.5 ± 1.00 | 5.2 ± 1.20 |
| 1 day | $M \pm m$ | 16.6 ± 0.13 | 14.0 ± 0.14 |
| | $V \pm v$ | 30.8 ± 0.60 | 21.2 ± 0.70 |
| | $V \pm v'$ | 5.4 ± 1.20 | 6.7 ± 1.50 |
| 2 days | $M \pm m$ | 9.3 ± 0.09 | 8.3 ± 0.10 |
| | $V \pm v$ | 37.2 ± 0.70 | 25.9 ± 0.80 |
| | $V \pm v'$ | 6.3 ± 1.40 | 7.2 ± 1.60 |
| 4 days | $M \pm m$ | 18.8 ± 0.21 | 14.5 ± 0.17 |
| | $V \pm v$ | 43.1 ± 0.80 | 25.4 ± 0.80 |
| | $V \pm v'$ | 8.7 ± 1.90 | 7.9 ± 1.80 |
| 6 days | $M \pm m$ | 29.3 ± 0.40 | 22.5 ± 0.31 |
| | $V \pm v$ | 51.7 ± 1.00 | 30.4 ± 1.00 |
| | $V \pm v'$ | 8.1 ± 1.80 | 8.8 ± 2.00 |
| 8 days | $M \pm m$ | 55.3 ± 0.72 | 43.8 ± 0.71 |
| | $V \pm v$ | 49.8 ± 0.90 | 35.2 ± 01.10 |
| | $V \pm v'$ | 8.9 ± 2.00 | 10.1 ± 2.30 |

The dynamics of α-GPDG activity with the process of cornea storage has a non-linear character. At an initial stage of storage the enzyme activity in cells of anterior and posterior layers of epithelium reaches the values of 14.2 ± 0.12 and 12.1 ± 0.11, correspondingly, that within a day slightly increases (16.6 ± 0.13 and 14.0 ± 0.14). Then a considerable decrease of enzyme activity (9.3 ± 0.09 and 8.3 ± 0.10) is observed, after that it sharply increases, reaching by the 8th day values of 55.3 ± 0.72 in cells of an anterior epithelium, 45.8 ± 0,77 — in cells of a posterior one. Dynamics of α-GPDG activity is presented in Fig. 1.



Матеріал, захищений авторським правом

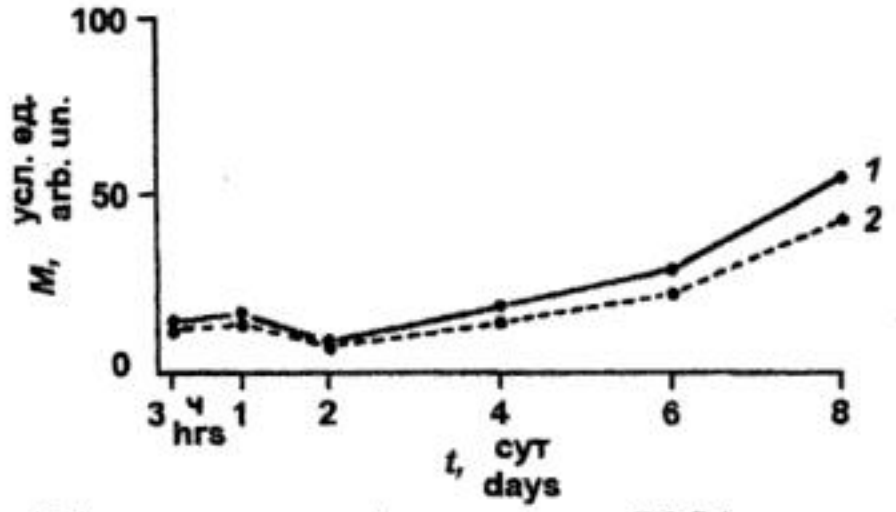



**Рис. 1.** Динамика удельной активности α-ГФДГ роговицы при гипотермическом хранении в клетках эпителия: *1* — переднего; *2* — заднего.

**Fig. 1.** Dynamics of the α-GPDG specific activity of cornea during epithelium hypothermal storage: *1* — anterior epithelium; *2* — posterior one.

клетках переднего и заднего слоев эпителия достигает соответственно величин $14{,}2 \pm 0{,}12$ и $12{,}1 \pm 0{,}11$, которая в течение суток несколько увеличивается ($16{,}6 \pm 0{,}13$ и $14{,}0 \pm 0{,}14$). Затем наблюдается значительное снижение активности фермента ($9{,}3 \pm 0{,}09$ и $8{,}3 \pm 0{,}10$), после чего она резко возрастает, достигая к 8 суткам величин $55{,}3 \pm 0{,}72$ в клетках переднего эпителия, $45.8 \pm 0{,}77$ – заднего. Динамика активности α-ГФДГ представлена на рис. 1.

Следует отметить, что популяция клеток заднего эпителия более однородна (коэффициент вариации $V = 20{,}4 \pm 0{,}7\%$), чем переднего ($V = 33{,}2 \pm 0{,}6\%$), что связано с наличием трех слоев в переднем эпителии. Коэффициенты вариации, являющиеся показателями неоднородности популяции объектов, увеличиваются в процессе хранения роговицы. Коэффициенты вариации вторичных дат (среднее значение удельной активности фермента для одного препарата) примерно одинаковы для клеток переднего и заднего эпителия. В процессе хранения роговицы эти показатели также увеличиваются (табл. 1). Динамика коэффициентов вариации $V$ и $V'$ указывает на увеличение неоднородности объектов в процессе хранения, причем это изменение в большей степени относится к клеткам, чем к препаратам в целом (рис. 2).

Распределение клеток по содержанию в них диформазана носит характер нормального распределения Гаусса–Лапласа (рис. 3).

При помощи однофакторного дисперсионного анализа была дана оценка величины влияния фактора времени хранения роговицы на активность α-ГФДГ в различных клетках. Установлено, что изменение активности α-ГФДГ в клетках переднего эпителия связано со временем в $55{,}8 \pm 0{,}05\%$ случаев, а заднего – в $72{,}4 \pm 0{,}05\%$. Различия в этом показателе связаны, очевидно, с топографическим расположением слоев, контактом влаги передней камеры, в которой происходит накопление продуктов катаболизма. Тем же методом анализа определялось влияние времени хранения на среднюю активность фермента в слое клеток (однофакторный дисперсионный анализ по вторичным датам). Вы-

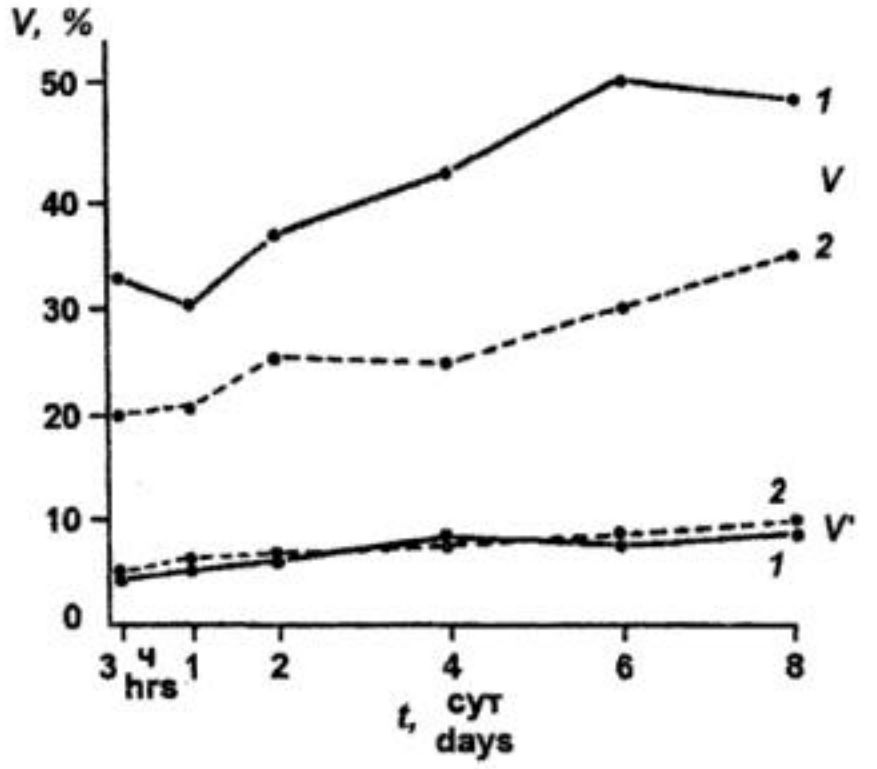



**Рис. 2.** Динамика коэффициентов вариации по первичным ($V$) и вторичным ($V'$) датам активности α-ГФДГ клеток эпителия: *1* — переднего; *2* — заднего.

**Fig. 2.** Dynamics of variation coefficients according to primary ($V$) and secondary ($V'$) dates of α-GPDG activity of epithelium cells: *1* — anterior epithelium; *2* — posterior one.

It should be noted, that the cell population of a posterior epithelium is more homogeneous (the variation coefficient $V = 20.4 \pm 0.7\%$), than an anterior one ($V = 33.2 \pm 0.6\%$), that is connected with the presence of three layers in an anterior epithelium. The variation coefficients, being indices of heterogeneity of objects population, increase during the cornea storage process. The variation coefficients of secondary figures (an average value of a specific activity of enzyme for one preparation) are approximately equal for cells of anterior and posterior epithelium. During the cornea storage process these indices also increase (Table 1). Dynamics of the $V$ and $V'$ variation coefficients points to the increase in heterogeneity of objects in the storage process, moreover in the greater extent this change is related to cells, than to the preparations in the whole (Fig. 2).

Cell distribution according to the diphormazane content in them has the character of Gaussian–Laplace normal distribution (Fig. 3).

Using a monofactor dispersive analysis one gave the estimation of the effect value of the time factor of cornea storage on the α-GPDG activity in different cells. It has been established, that the change of α-GPDG activity in cells of an anterior epithelium is connected with the time in $55.8 \pm 0.05\%$ cases, and for a posterior one – in $72.4 \pm 0.05\%$. Differencies in this index are obviously related to a topographic location of layers, to the moisture contact of an anterior chamber, where the accumulation of katabolism products occurs. By the same method of analysis the effect of storage time on an average activity of enzyme in cell layer (monofactor dispersive analysis according to secondary figures) was detected. It has been revealed that the change of the enzyme average activity in layers of an anterior and posterior epithelium are related to the storage time in $97.9 \pm 0.2$ and $97.2 \pm 0.3\%$ cases, correspondingly.



Матеріал, захищений авторським правом

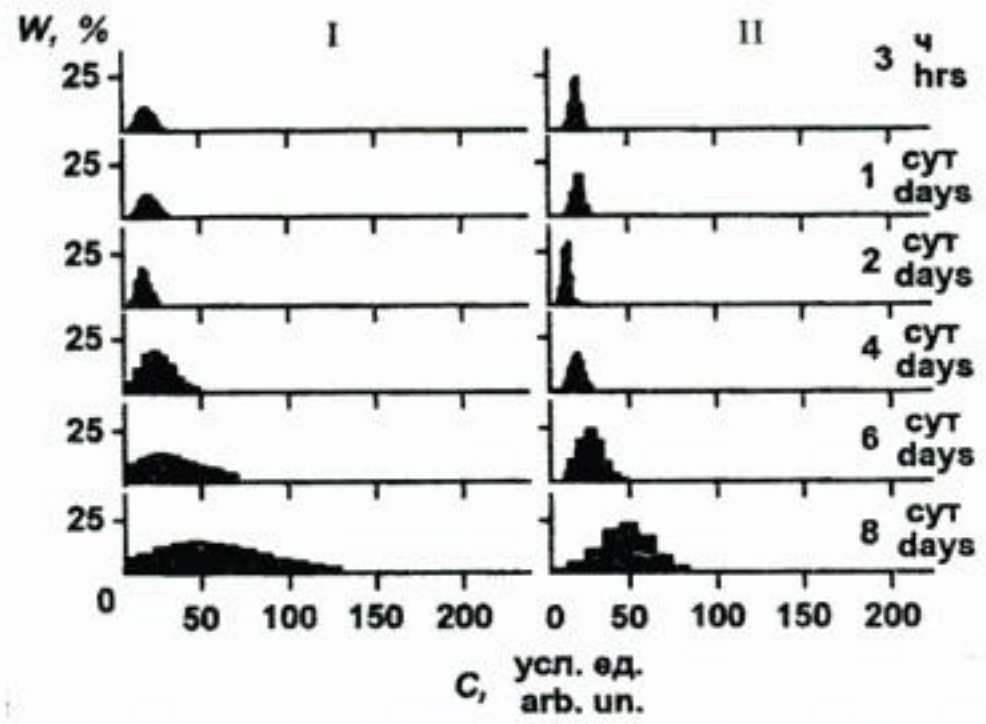



**Рис. 3.** Гистограммы распределения по удельной активности α-ГФДГ клеток эпителия: I — переднего; II — заднего.

**Fig. 3.** Distribution histograms according to a specific activity of α-GPDG of epithelium cells: I — anterior; II — posterior.

явлено, что изменения средней активности фермента в слоях переднего и заднего эпителия связаны со временем хранения соответственно в 97,9 ± 0,2 и 97,2 ± 0,3% случаев.

Как видно из приведенных результатов, время гипотермического хранения оказывает значительно большее влияние на среднюю активность фермента, характеризующую препарат в целом, чем на отдельные его элементы. Это, очевидно, можно объяснить тем, что условия гипотермии влияют прежде всего на совокупность элементов (клеток) и связи между ними, а затем уже непосредственно на элементы.

Следует обратить внимание на наличие связи между активностью фермента в клетках переднего и заднего слоев эпителия. Связь средней силы на начальном этапе хранения по мере увеличения срока хранения приобретает характер сильной (табл. 2). Если рассматривать корреляцию между изменением активности фермента в клетках различных слоев в процессе гипотермического хранения, то выявляется ее функциональный характер ($r = 1{,}00 \pm 0{,}00$). Это дает возможность говорить о наличии тесной связи между функциональным состоянием всех структурных элементов роговицы.

**Таблица 2**

**Изменение корреляционной связи между удельной активностью α-ГФДГ в клетках переднего и заднего слоев эпителия**

| Время хранения | Коэффициент корреляции $R \pm r$ |
|---|---|
| 3 ч | 0,69 ± 0,26 |
| 1 сут | 0,76 ± 0,23 |
| 2 сут | 0,72 ± 0,25 |
| 4 сут | 0,69 ± 0,26 |
| 6 сут | 0,73 ± 0,24 |
| 8 сут | 0,85 ± 0,19 |

Связь между активностью фермента в различных слоях роговицы в процессе ее хранения подтверждается графиком изменения активности α-ГФДГ (см. рис. 1). Дисперсионный анализ регрессионных рядов показал, что существуют различия в динамике активности α-ГФДГ в различных клетках роговицы ($P > 0{,}999$), однако эти различия связаны с превышением одного ряда над другим ($P > 0{,}999$), а не с непараллельностью рядов, т.е. в условиях

As it is seen from the results presented, the time of a hypothermal storage causes the considerably greater effect on an average activity of enzyme, characterizing the preparation in the whole, than on its separate elements. Obviously, that may be explained by the fact, that hypothermia conditions affect first of all the totality of elements (cells) and relations between them, and then directly elements.

The attention should be paid to the presence of the relation between the enzyme activity in cells of anterior and posterior epithelium layers. The relation of an average force at an initial stage of storage, as the storage term arises, gains the character of a strong one (Table 2). If consider the correlation between the change of enzyme activity in cells of different layers in the process of a hypothermal storage, its functional character ($r = 1.00 \pm 0.00$) is revealed. This gives the possibilities to talk on the presence of a tight relation between a functional state of all structural cornea elements.

**Table 2**

**Change of a correlative relation between a specific α-GPDG activity in cells of anterior and posterior layers of epithelium**

| Storage time | Correlation coefficient $R \pm r$ |
|---|---|
| 3 hrs | 0.69 ± 0.26 |
| 1 day | 0.76 ± 0.23 |
| 2 days | 0.72 ± 0.25 |
| 4 days | 0.69 ± 0.26 |
| 6 days | 0.73 ± 0.24 |
| 8 days | 0.85 ± 0.19 |

The relation between the enzyme activity in different cornea layers within the process of its storage is confirmed by the plot of the α-GPDG activity change (see Fig. 1). A dispersion analysis of regressive rows showed, that there were differences in the dynamics of α-GPDG activity in different cells of cornea ($P > 0.999$), but these differences are connected with the excess of one row over another ($P > 0.999$), but not with nonparallelism of rows, i.e. under hypothermia conditions the change of α-GPDG activity in cells of anterior and posterior layers of epithelium occurs in cornea, moreover these changes are connected between each other and differ only by various levels of enzyme activity in different cellular layers.

The study of α-GPDG activity in cells of anterior and posterior layers of cornea epithelium has shown, that there are slight differences in the reaction of growing ans regenerating cells on a hypothermal storage. The enzyme activity in a regenerating epithelium is slightly lower than in a growing one, but the tendency to its change for various storage terms is equal.

The results obtained testify to the fact that the state of reductive and oxidative enzymes in cells of an epithelial origin of rabbit's cornea is in a direct dependency on a temporal factor of a hypothermal storage.

The study of the change of enzyme activity during storage permitted to reveal general regularities in dynamics of a studied index, and, consequently, in a morphofunctional state of objects. The dynamics of enzyme activity is characterized by 3 phases: the



Матеріал, захищений авторським правом

гипотермии в роговице происходит изменение активности α-ГФДГ в клетках переднего и заднего слоев эпителия, причем эти изменения связаны между собой и отличаются лишь различными уровнями активности фермента в различных клеточных слоях.

Изучение активности α-ГФДГ в клетках переднего и заднего слоев эпителия роговицы показало, что имеются незначительные различия в реакции растущих и обновляющихся клеток на гипотермическое хранение. Активность ферментов в обновляющемся эпителии несколько ниже, чем в растущем, однако тенденция к ее изменению для различных сроков хранения одинакова.

Полученные результаты свидетельствуют, что состояние окислительно-восстановительных ферментов в клетках эпителиального происхождения роговицы кролика находится в прямой зависимости от временного фактора гипотермического хранения.

Изучение изменения активности фермента при хранении позволило выявить общие закономерности в динамике исследованного показателя, а следовательно, и в морфофункциональном состоянии объектов. Динамику активности фермента характеризуют 3 фазы: первая – увеличение активности фермента, вторая – снижение показателя ниже уровня исходного значения, третья – увеличение показателя. Наличие трех фаз, характерное для α-ГФДГ, очевидно, связано с его большей устойчивостью к действию повреждающих факторов по сравнению с другими звеньями ферментной системы.

Наличие первой фазы в изменении активности ферментов можно объяснить первым периодом адаптационной реакции, вызванной нарушением генерализованной системы управления "организм–орган". Очевидно, вторая фаза обусловлена структурно-функциональными нарушениями, возникающими в силу действия факторов, вызывающих патологическое состояние объекта, что приводит к нарушению локальной системы управления "ткань–клетка". Это влечет за собой второй этап адаптационной реакции, т.е. третью фазу, после чего следуют дальнейшее нарушение функции и разрушение структур под действием факторов аутолитического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Гистология* (Введение в патологию) / Под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Чебышева.– М.: ГЭОТАР, 1997.– 960 с.
2. *Климов А. А., Графова Г. Я., Хилова Ю. К. и др.* Клеточно-дифферонная организация тканей и проблема заживления ран // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.– 1990.– 98, № 4.– С. 5–23.
3. *Структурные* основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Под ред. Д. С. Саркисова.– М.: Медицина, 1987.– 448 с.
4. *Шубникова Е. А.* Функциональная морфология тканей.– М.: Изд-во МГУ, 1981.– 326 с.


Поступила 12.01.99

first – an increase in the enzyme activity, the second – a decrease in the index lower than the level of an initial value, the third – an increase in the index. The presence of three phases, that is typical for α-GPDG, obviously, is connected to its high resistance to the effect of damaging factors in comparison with other links of an enzymatic system.

The presence of the first phase in the change of the enzymes activity may be explained by the first period of an adaptational reaction, caused by the disorder of the "organism–organ" generalized control system. Obviously, the second phase is stipulated by structural and functional disorders, occuring due to the effect of factors, evoking a pathological state of an object, that results in the disorder of the "tissue–cell" local control system. This involves the second stage of an adaptational reaction, i.e. the 3rd phase, after that further function impairment and the structure destruction under the effect of factors of an autolytic process follow.

## REFERENCES


1. *Histology* (Introduction in pathology) / Ed. by E. G. Ulumbekov, Yu. A. Chebyshev.– M.: GEOTAR, 1997.– 960 p.
2. *Klimov A. A., Grafova G. Ya., Khilova Yu. K. et al.* Cellular and differone organization of tissues and the wound healing problem // Anatomy, histology and embryology archive.– 1990.– 98, № 4.– P. 5–23.
3. *Structural* bases of adaptation and compensation of impaired functions / Ed. by D. S. Sarkisov.– M.: Meditsina, 1987.– 448 p.
4. *Shubnikova E. A.* Functional morphology of tissues.– M.: Moscow State University edition, 1981.– 326 p.


Accepted in 12.01.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 576.314.63.57.017.3

UDC 57.043: 576.314.63.57.017.3

# О гипометаболическом влиянии фракции эпителия кишечника зимнеспящего суслика *C. undulatus* на консервирование эмбрионов млекопитающих

В. И. ЗАГНОЙКО

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

# On Hypometabolic Effect of Intestine Epithelium Fraction of *C. undulatus* Hibernating Ground-Squirrel on Mammalian Embryos Cryopreservation

V. I. ZAGNOYKO

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

Изучено влияние фракции эпителия кишечника (1–10 кД) зимнеспящего суслика *C. undulatus* на длительность консервации эмбрионов мышей. Показано удлинение сроков консервации эмбрионов (на 1 сут) после действия фракции, выделенной из зимнеспящего суслика. Сделан вывод о гипометаболическом воздействии фракции полипептидов (1–10 кД) гибернирующего суслика на сроки хранения эмбрионов млекопитающих.

Вивчено вплив фракції епітелія кишечника (1–10 кД) зимовосплячого ховраха *C. undulatus* на тривалість консервації ембріонів мишей. Показано подовження строків консервації ембріонів (на 1 добу) після дії фракції, яка виділена із зимовосплячого ховраха. Зроблено висновок про гіпометаболічний вплив фракції поліпептидів (1–10 кД) гібернуючого ховраха на строки зберігання ембріонів ссавців.

The effect of the intestine epithelium fraction (1–10 kD) of *C. undulatus* hibernating ground-squirrel on the preservation duration of murine embryos was studied. The prolongation of terms of embryo preservation (by 1 day) after the fraction effect, isolated from the intestine epithelium of a hibernating ground-squirrel was demonstrated. The conclusion was made on a hypometabolic effect of polypeptide fraction (1–10 kD) of a hibernating ground-squirrel on the storage terms of mammalian embryos.

В [2] был предложен способ хранения эмбрионов млекопитающих при 5 °С в среде Дюльбекко, содержащей сывороточный альбумин и протектор глицерин или диметилсульфоксид (ДМСО). Недостатками этого способа являются низкая сохранность эмбрионов (44%) и непродолжительность хранения (1 сут), а также необходимость использования токсических химических протекторов.

Согласно другому методу [1], эмбрионы экспонируют при 5 °С в среде Дюльбекко, содержащей эмбриональную сыворотку плодов коров и протектор — моноэтиловый эфир глицерина. Этот метод обеспечивает сохранность эмбрионов только в течение 2-х суток.

Целью работы было изучение влияния фракции 1–10 кД, выделенной из эпителия кишечника зимнеспящего суслика, на сроки хранения эмбрионов млекопитающих.

Фракции выделяли из ткани тонкого кишечника зимнеспящего суслика *C. undulatus* по известной методике [3]: ацетоновый гемогенат ткани центрифугировали в течение 30 мин при 3 000*g*, осадок лиофилизировали в 1 М уксусной кислоты и центрифугировали 1 ч при 4 000*g*. Центрифугат подвергали последовательно ультрафильтрации через фильтры –4 (Эстония) и М-2 (Amicon, USA). Получали фракцию молекулярной массы 1–10 кД.

In [2] the mammalian embryo storage way at 5 °C in Dulbecco media, containing serum albumin and glycerol protectant or dimethyl sulfoxide (DMSO) was proposed. This method disadvantages are a low integrity of embryos (44%) and a short period of storage (1 day), as well as the necessity to use toxical chemical protectants.

According to another method [1], embryos are exposed at 5 °C in Dulbecco medium, containing an embryonic serum of cow fetuses and the protectant — glycerol monoethyl ether. This method provides the embryo integrity only within 2 days.

The aim of the work was to study the effect of 1–10 kD fraction, isolated from the intestine epithelium of hibernating groung-squirrel, on the storage terms of mammalian embryos.

Fractions were isolated from the tissue of a small intestine of *C. undulatus* hibernating ground-squirrel according to known methods [3]: the tissue acetone homogenate was centrifuged within 30 min at 3 000*g*, the sediment was lyophilized in 1 M of an acetic acid and centrifuged during 1 hr at 4 000*g*. The centrifugate was consequently subjected to the ultrafiltration through the filters –4 (Estonia) and M-2 (Amicon, USA). The fraction of 1–10 kD molecular mass was obtained. After ultrafiltration the material was



Матеріал, захищений авторським правом

После ультрафильтрации материал лиофилизировали и хранили в герметичных ампулах при –20 °С.

Эмбрионы мышей на стадии морулы вымывали при комнатной температуре средой Дюльбекко, содержащей 10%-ю эмбриональную сыворотку коров. На этой же среде готовили фракцию эпителия (ФЭ) тонкого кишечника зимнеспящего суслика с добавлением эмбриональной сыворотки.

Эмбрионы (40) разделяли на две группы по 20 эмбрионов в каждой, помещали в стеклянные ампулы, содержащие 0,5 мл среды Дюльбекко и 10% эмбриональной сыворотки. Ампулы с эмбрионами первой опытной группы охлаждали ступенчато от комнатной температуры (20 °С) до 5 °С, понижая температуру на 5 °С, и выдерживали при данной температуре в течение 5 мин. Аналогично охлаждали 0,5 мл фракции (1–10 кД), выделенной из эпителия тонкого кишечника зимнеспящего суслика.

Водородный показатель (*pH*) ФЭ был в пределах pH среды Дюльбекко с добавкой 10%-й эмбриональной сыворотки. ФЭ по каплям добавляли в соотношении 1:1 к охлажденным эмбрионам. Конечная концентрация ФЭ составляла 0,12 г/л. После герметизации ампулы хранили при 5 °С в течение 24, 48 и 72 ч. К эмбрионам второй (контрольной) группы добавляли при комнатной температуре среду Дюльбекко, содержащую 10%-ю эмбриональную сыворотку, ступенчато охлаждали от комнатной температуры до 5 °С, понижая температуру на 5 °С и выдерживая ее в течение 5 мин. Охлажденные эмбрионы ступенчато отогревали на водяной бане, повышая температуру на 5 °С каждые 5 мин, затем при комнатной температуре их переносили в культуральную среду Виттена, где культивировали в течение 24 ч до выхода в бластоцисту. Сохранность эмбрионов контрольной группы составила 97,8%.

Эмбрионы опытной группы после хранения в герметически закрытых ампулах ступенчато отогревали в водяной бане, повышая температуру на 5 °С и выдерживая при каждой по 5 мин. Ампулы вскрывали стерильно и отмывали от трехступенчатого ФЭ, добавляли к одной капле исходного раствора 10 капель среды Дюльбекко с эмбриональной сывороткой через каждые 3 мин. После этого эмбрионы опытной группы выдерживали 10 мин в

lyophilized and stored in a hermetic ampoules at –20 °C.

Mice embryos at the morula stage were washed at room temperature by means of Dulbecco medium, containing a 10% cow embryonic serum. In the same media one prepared the fraction of epithelium (FE) of a small intestine of hibernating ground-squirrel with an embryonic serum addition.

The embryos (40) were divided in two groups with 20 embryos in each, placed in glass ampoules, containing 0.5 ml of Dulbecco medium and a 10% embryonic medium. The ampoules with the embryos of the first experimental group were step by step cooled from room temperature (20 °C) down to 5 °C, by decreasing the temperature by 5 °C, and were held at given temperature within 5 min. 0.5 ml of fraction (1–10 kD), isolated from small intestine epithelium of hibernating ground-squirrel was cooled by a similar way. FE *pH* was in the rates of the Dulbecco medium *pH* with the addition of a 10% embryonic serum. FE was drop by drop added in the 1:1 ratio to cooled embryos. FE final concentration made 0.12 g/l. After their sealing the ampoules were stored at the temperature at 5 °C during 24, 48 and 72 hrs. To the embryos of the second (control) group, one added at room temperature the Dulbecco medium, containing a 10% embryonic serum, step by step cooled from room temperature down to 5 °C, decreasing the temperature by 5 °C and held it during 5 min. Cooled embryos were step by step thawed at a water bath, by increasing the temperature in 5 °C each 5 min, then at a room temperature they were transferred in Vitten cultural medium, where they were cultured during 24 hrs till the release into a blastocyst. The integrity of embryos of a control group made 97,8%.

Embryos of an experimental group after storage in sealed ampoules were step by step thawed in a water bath increasing the temperature by 5 °C and held at each one by 5 min. Ampoules were opened up under sterile conditions and washed from three-step FE, one added to one drop of an initial solution 10 drops of Dulbecco medium with an embryonic serum in each 3 min. After that the embryos of an experimental group were held 10 min in a cultural medium and culturing in Vitten medium in the atmosphere of a triple gas (5% $CO_2$, 90% $N_2$ and 5% $O_2$) at 37 °C within 24 hrs till release into a blastocyst was accom-

**Таблица 1**

**Сохранность эмбрионов мышей после различных сроков хранения их в среде, содержащей фракцию (1–10 кД) из тонкой кишки суслика *C. undulatus* ($n = 20$)**

| Длительность хранения, ч | Сохранность эмбрионов, % | |
|---|---|---|
| | Предложенный метод | Известный способ [1] |
| 24 | 97,8 ± 1,2 | 89,8 ± 1,12 |
| 48 | 96,9 ± 1,0 | 90,5 ± 2,18 |
| 72 | 94,5 ± 2,5 | 52,2 ± 1,86 |

**Table 1**

**Integrity of mice embryos after different terms of their storage in the medium, containing the fraction (1–10 kD) from a small intestine of *C. undulatus* ground-squirrel ($n = 20$).**

| Storage duration, hrs | Embryo integrity, % | |
|---|---|---|
| | The method proposed | Known way [1] |
| 24 | 97.8 ± 1.2 | 89.8 ± 1.12 |
| 48 | 96.9 ± 1.0 | 90.5 ± 2.18 |
| 72 | 94.5 ± 2.5 | 52.2 ± 1.86 |



Матеріал, захищений авторським правом

культуральной среде и проводили культивирование в среде Виттена в атмосфере тройного газа (5% $CO_2$, 90% $N_2$ и 5% $O_2$) при 37 °С в течение 24 ч до выхода в бластоцисту. Эмбрионы опытной группы развивались подобно эмбрионам контрольной группы.

Из табл. 1 следует, что предложенный способ позволяет хранить эмбрионы на 1 сут дольше без снижения их сохранности.

Из табл. 2 видно, что наилучшие результаты достигаются после хранения эмбрионов в течение 3-х суток при использовании ФЭ в концентрации 0,12–0,20 г/л среды.

**Таблица 2**

**Влияние концентрации ФЭ на развитие эмбрионов в культуре после различных сроков хранения ($n = 20$)**

| Концентрация ФЭ, г/л | Сохранность эмбрионов, %, после хранения, ч | | |
|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 |
| 0,00 | 42,5 ± 3,4 | 37,4 ± 2,1 | 25,7 ± 2,9 |
| 0,09 | 63,7 ± 1,5 | 57,3 ± 2,4 | 55,4 ± 1,9 |
| 0,12 | 97,8 ± 1,2 | 96,9 ± 1,0 | 94,5 ± 2,5 |
| 0,16 | 85,2 ± 3,2 | 80,1 ± 1,1 | 75,1 ± 1,6 |
| 0,20 | 83,1 ± 2,1 | 75,4 ± 2,0 | 63,7 ± 0,8 |
| 0,25 | 75,5 ± 0,2 | 70,7 ± 1,7 | 60,1 ± 0,9 |

Результаты изучения сохранности эмбрионов в зависимости от того, что среда хранения их содержала ФЭ с различной молекулярной массой, представлены в табл. 3. Наиболее высокую сохранность эмбрионов обеспечивает ФЭ молекулярной массы 1–10 кД даже после 3-х суток хранения их в культуральной среде.

**Таблица 3**

**Сохранность эмбрионов в зависимости от молекулярной массы ФЭ ($n = 20$)**

| Концентрация ФЭ, г/л | Сохранность эмбрионов, %, после хранения, ч | | |
|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 |
| 0,5 | 80,0 ± 0,9 | 74,3 ± 0,6 | 70,2 ± 1,1 |
| 1–10 | 97,8 ± 1,2 | 96,9 ± 1,0 | 94,5 ± 2,5 |
| 15 | 78,01 ± 1,2 | 70,7 ± 0,8 | 67,7 ± 1,5 |
| 20 | 70,0 ± 1,3 | 67,5 ± 0,7 | 63,8 ± 0,9 |

В дальнейшей серии экспериментов изучалось влияние тех же условий опыта на сохранность эмбрионов, за исключением того, что в среде хранения использовали ФЭ сусликов *C. undulatus* не в период спячки, а в период бодрствования.

Из табл. 4 видно, что при использовании в среде ФЭ, полученной у сусликов в период бодрствования, сохранность эмбрионов резко снижается на 3-и сутки хранения.

Этот факт, по-видимому, свидетельствует о том, что фракция эпителия тонкого кишечника, в которой содержатся полипептиды с молеку-

**Таблица 4**

**Сохранность эмбрионов мышей в зависимости от использования ФЭ сусликов, находящихся в периоде бодрствования ($n = 20$)**

| Время хранения, ч | Сохранность эмбрионов, % |
|---|---|
| 24 | 45,4 ± 2,7 |
| 48 | 40,7 ± 1,4 |
| 72 | 27,5 ± 1,7 |

plished. Embryos of an experimental group developed like the embryos of the control one.

It proceeds from the Table 1 that the method proposed permits to store the embryos by 1 day longer without a decrease in their integrity.

It is seen from the Table 2 that the best results are reached after the embryo storage within 3 days when using FE in the medium 0.12–0.20 g/l concentration.

**Table 2**

**Effect of FE concentration on embryo development in the culture after different storage terms ($n = 20$)**

| FE concentration, g/l | Embryo integrity, %, after storage, hrs | | |
|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 |
| 0.00 | 42.5 ± 3.4 | 37.4 ± 2.1 | 25.7 ± 2.9 |
| 0.09 | 63.7 ± 1.5 | 57.3 ± 2.4 | 55.4 ± 1.9 |
| 0.12 | 97.8 ± 1.2 | 96.9 ± 1.0 | 94.5 ± 2.5 |
| 0.16 | 85.2 ± 3.2 | 80.1 ± 1.1 | 75.1 ± 1.6 |
| 0.20 | 83.1 ± 2.1 | 75.4 ± 2.0 | 63.7 ± 0.8 |
| 0.25 | 75.5 ± 0.2 | 70.7 ± 1.7 | 60.1 ± 0.9 |

The study results of embryo integrity depending on the fact, that the medium of their storage contained FE with a different molecular mass, are presented in Table 3. The highest embryo integrity is provided by FE of 1–10 kD molecular mass even after 3 days of their storage in a cultural medium.

**Table 3**

**Embryo integrity depending on FE molecular mass ($n = 20$)**

| FE concentration, g/l | Embryo integrity, %, after storage, hrs | | |
|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 |
| 0.5 | 80.0 ± 0.9 | 74.3 ± 0.6 | 70.2 ± 1.1 |
| 1–10 | 97.8 ± 1.2 | 96.9 ± 1.0 | 94.5 ± 2.5 |
| 15 | 78.01 ± 1.2 | 70.7 ± 0.8 | 67.7 ± 1.5 |
| 20 | 70.0 ± 1.3 | 67.5 ± 0.7 | 63.8 ± 0.9 |

The effect of the same experiment conditions on embryo integrity, except of the fact that in the storage medium one used FE of *C. undulatus* ground-squirrel not in the hibernation period, but in an active period was studed in further experiment series.

It is seen from the Table 4, that when using in the medium FE, obtained in ground-squirrel in an active period the embryo integrity sharply decreases on the 3rd storage day.

This fact apparently testifies to the fact that the small intestine epithelium fraction, containing polypeptides with a molecular mass of 1–10 kD is present in *C. undulatus* ground-squirrel in the a greater extent in hibernation period. In this moment they are the most efficient in respect to hypometabolic effect on mammalian embryos and consequently cause a favorable effect on the prolongation of their preservation terms.

**Table 4**

**Mice embryo integrity depending on usage of ground-squirrel FE, being in an active period ($n = 20$)**

| Storage time, hrs | Embryo integrity, % |
|---|---|
| 24 | 45.4 ± 2.7 |
| 48 | 40.7 ± 1.4 |
| 72 | 27.5 ± 1.7 |



Матеріал, захищений авторським правом

лярной массой 1–10 кД, присутствует у сусликов *C. undulatus* в наибольшей мере в период спячки, и в этот момент они наиболее эффективны в отношении гипометаболического влияния на эмбрионы млекопитающих и, следовательно, оказывают благоприятное воздействие на удлинение сроков их консервации.

Таким образом, полученные данные указывают, что фракция 1–10 кД, содержащаяся во фракции эпителия тонкого кишечника зимнеспящего суслика, оказывает благоприятное воздействие на удлинение сроков консервации эмбрионов млекопитающих.

Работа выполнена согласно ведомственной тематике, утвержденной Президиумом НАН Украины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Пат. 16856*. Украина. МПК[5] А 01/02. Способ консервирования эмбрионов млекопитающих / В. И. Грищенко, Н. А. Лучко, Ю. В. Калугин, С. В. Кощий, Л. А. Ханина.– Опубл. 29.08.97. Бюл. № 4.
2. *Moore N. W., Bilton R. T.* The storage of fustilized shup ova at 5 °C // Aust. J. Biol. Sci.– 1973.– 26.– P. 1421–1423.
3. *Swan H., Shatte C. L.* Hypometabolic brain peptide from vertebrates capable of torpor // Science.– 1977.– 195.– P. 84–85.

Поступила 23.06.98

Thus, the data obtained point to the fact that 1–10 kD fraction being the part of the small intestine epithelium fraction of hibernating ground-squirrel causes a favorable effect on the prolongation of the mammalian embryo preservation terms.

The work is accomplished according to a disciplinary theme, approved by the Presidium of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

## REFERENCES

1. *Patent 16855*. Ukraine. MPK[5] A 01/02. Mammalian embryo preservation way / V. I. Grischenko, N. A. Luchko, Yu. V. Kalugin, S. V. Koschij, L. A. Khanina.– Published 29.08.97. Bul. № 4 (in Russian).
2. *Moore N. W., Bilton R. T.* The storage of fustilized shup ova at 5 °C // Aust. J. Biol. Sci.– 1973.– 26.– P. 1421–1423.
3. *Swan H., Shatte C. L.* Hypometabolic brain peptide from vertebrates capable of torpor // Science.– 1977.– 195.– P. 84–85.

Accepted in 23.06.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 577.335

UDC 57.043: 577.335

# Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов

О. А. НАРДИД

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

# The Effect of Freezing on Structural and Functional Properties of Some Hemoproteins

O. A. NARDID

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

Исследовано влияние быстрого замораживания-отогрева на структурное состояние и ферментативную активность гемопротеинов — цитохром-С-оксидазы из сердца крупного рогатого скота и цитохрома Р-450 из печени кроликов. Показано, что исследованный режим криовоздействия приводит к конформационным изменениям гемопротеинов, затрагивающим как область активного центра, так и полипептидную цепь. В то же время каталитическая активность белков снижается незначительно. Предполагается, что обнаруженные изменения конформации не являются лимитирующими относительно функции исследованных гемопротеинов.

Досліджено вплив швидкого заморожування-відігрівання на структурний стан і ферментативну активність гемопротеїнів — цитохром-С-оксидази із серця великої рогатої худоби і цитохрому Р-450 із печінки кролів. Показано, що досліджений режим кріовпливу приводить до конформаційних змін гемопротеїнів, які торкаються як ділянки активного центра, так і поліпептидного ланцюга. При цьому каталітична активність білків знижується незначно. Передбачається, що виявлені зміни конформації не є лімітуючими відносно функції досліджених гемопротеїнів.

The effect of rapid freeze-thawing on structural state and enzymatic activity of hemoproteins — cytochrome-C-oxidase obtained from a cattle heart and cytochrome P-450 from rabbits' liver was studied. It has been demonstrated that the cryoeffect regimen studied results in conformational changes of hemoproteins, affecting both the are of an active center and polypeptide chain. At the same time catalytic activity of proteins changes slightly. It is supposed that the changes found are no limiting ones in respect of the function of studied hemoproteins.

Глубокое охлаждение для длительного хранения различных биологических объектов [1, 2, 8] с целью последующего использования их в клинической практике требует информации о структурно-функциональном состоянии белков при низкотемпературном воздействии. Особенно это относится к белкам ферментного типа, так как именно они во многом определяют уровень метаболизма и зачастую жизнеспособность реконсервированного материала. Известно [4, 5], что понижение температуры до значений, при которых начинается затвердевание растворителя, приводит к отрицательным воздействиям на структурно-функциональное состояние белков. К такого рода воздействиям могут быть отнесены термотропные изменения диэлектрических свойств окружения белковых молекул, разрушение структурированной сольватной оболочки белка, изменение характера взаимодействия молекул растворителя с белковой макромолекулой. В связи с вышеизложенным создание условий, обеспечивающих сохранение функциональной активности белков при возвращении к физиологическим температурам, весьма актуально.

Цитохром-С-оксидазу получали из сердца крупного рогатого скота по методу Кинга и др. [7]. Высокоочищенную форму LM2 цитохрома Р-450

A deep cooling for a prolonged storage of different biological objects [1, 2, 8] with the aim of their further application in clinical practice requires an information on structural and functional state of proteins at low temperature effect. In particular, this concerns the proteins of enzymatic type, because they are in a great extent determine the level of metabolism and often the viability of represerved material. It is known [4, 5], that a decrease in a temperature down to the values, at which the solvent soludification starts, results in negative effects on structural and functional state of proteins. Thermotropic changes of dielectric properties of protein molecules environment, destruction of structured solvate protein covering, the change in the interaction character between the molecules of solvent and protein macromolecule can be referred to such effects. Taking into consideration all mentioned above the creation of conditions providing the preservation of functional activity of proteins when reverting to physiological temperatures is very actual.

Cytochrome-C-oxidase was obtained from a cattle heart by means of King's method [7]. Highly purified form LM2 of P-450 cytochrome was isolated from liver microsomes of rabbits, preliminarily induced by sodium phenobarbital according to the method of Huagen and Coon [6]. Bilayer proteoliposomes, con-



Матеріал, захищений авторським правом

выделяли из микросом печени предварительно индуцированных фенобарбиталом натрия кроликов по методу Хаугена и Куна [6]. Бислойные протеолипосомы, состоящие из яичного фосфатидилхолина и цитохромоксидазы или цитохрома Р-450, формировали методом диализа с холатом натрия при 4 °С. В экспериментах использовали яичный фосфатидилхолин производства концерна "Биолек" (Харьков).

Быстрое замораживание образцов осуществляли погружением в жидкий азот (–196 °С), отогрев — на водяной бане при 40 °С до достижения образцом комнатной температуры. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Pye Unicam SP-8000 (Англия). Флуоресцентные измерения с автоматической коррекцией спектров выполняли на спектрофлуориметре Hitachi F-4010 (Япония) при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм. При слаборазрешенных спектрах флуоресценции использовали накопление в течение 2 с. Положение максимумов спектров определяли как точку обращения в ноль их первой производной. Все спектральные измерения выполняли при комнатной температуре.

Для изучения влияния низких температур на структурное и функциональное состояние белков использовали их быстрое замораживание и последующий быстрый отогрев. Такие режимы являются щадящими, так как в этом случае сокращается время пребывания белков в образующихся при замораживании воды растворах с повышенным содержанием неэлектролитов. В твердом состоянии образуется мелкокристаллическая структура, а также уменьшается влияние рекристаллизационных процессов. Но даже при этих условиях было обнаружено необратимое воздействие замораживания и отогрева на конформацию биополимеров. Так, быстрое замораживание и последующий отогрев приводили к уширению спектра поглощения встроенной в лецитиновые липосомы цитохромоксидазы в области полосы Соре. Анализ первых производных спектров поглощения показал, что уширение происходит за счет смещения в длинноволновую область минимума первой производной (рис. 1). Поскольку спектр поглощения цитохромоксидазы в области Соре обусловлен поглощением двух гемов, можно высказать предположение, что изменение конформации фермента происходит в области гема *a* и связано с увеличением его доступности растворителю.

В результате замораживания и отогрева мембрановстроенного цитохрома Р-450 его спектры поглощения в области Соре претерпевают коротковолновый сдвиг (рис. 2). Это отражает изменение микроокружения активного центра, которое тоже может быть вызвано увеличением доступности гема цитохрома Р-450 растворителю [3].

Низкотемпературное воздействие на протеолипосомы, содержащие цитохром Р-450, приводит к

sisting of an egg phosphatidyl choline and cytochrome oxidase or P-450 cytochrome, were formed by the method of dialysis with sodium cholate at 4 °C. In the experiments an egg phosphatidyl choline produced by "Biolek" concern (Kharkov) was used.

A rapid freezing of samples were done by means of submerging into a liquid nitrogen (–196 °C), thawing — on a water bath at 40 °C up to a room temperature approaching. Absorption spectra were recorded by means of Unicam SP-8000 (England) spectrophotometer. Fluorescent measurments with an automatic correction of spectra were performed using spectrofluorimeter Hitachi F-4010 (Japan) at excitation wave lengths 280 and 296 nm. When using spectra with a slight fluorescence resolution an accumulation within 2 sec was done. The position of spectra maximums was determined as the point when their first derivative was zero. All spectral measurements were performed at a room temperature.

To investigate the effect of low temperatures on structural and functional state of proteins a rapid freezing and following rapid thawing were used. Such regimens are mild, because in this case the time of protein staying in the solutions with an increased content of electrolytes and non-electrolytes, those are formed during water freezing solid, reduces. In a solid state fine crystalline structure is formed, as well as the effect of recrystalline processes reduces. However even under these conditions an irreversible effect of freezing and thawing on the conformation of biopolymers was revealed. So, a rapid freezing and following thawing resulted in a widening of absorption spectrum of a cytochrome oxidase built into lecitin liposomes in Sorret band area. The analysis of the first derivatives of absorption spectra demonstrated, that the widening occurred due to a shift into a long wave area of the first derivative minimum (Fig. 1). Since the absorption spectrum of cytochrome oxidase in the Sorret area is stipulated by the absorption of two gemes, one can suppose, that the change in the enzyme conformation takes place in *a* geme region and related to an increase in its accessibility to a solvent.

In the result of freezing and thwaing of a membrane-built-in cytochrome P-450 its absorption spectra in Sorret area undergo a short-wave shift (Fig. 2). This reflects the change of microenvironment of an active center, that also can be caused by an increase in the accessibility of the P-450 cytochrome geme to a solvent [3].

Low temperature effect on proteoliposomes, containing P-450 cytochrome, leads to a long-wave shift in the spectrum of an own protein fluorescence with a simultaneous reduction in the contribution of thyrosine component. The changes observed can be substantiated by conformational rearrangements of P-450 cytochrome structure, caused by freeze-thawing and resulting to a suppression of fluorescence of thyrosine rests.



Матеріал, захищений авторським правом

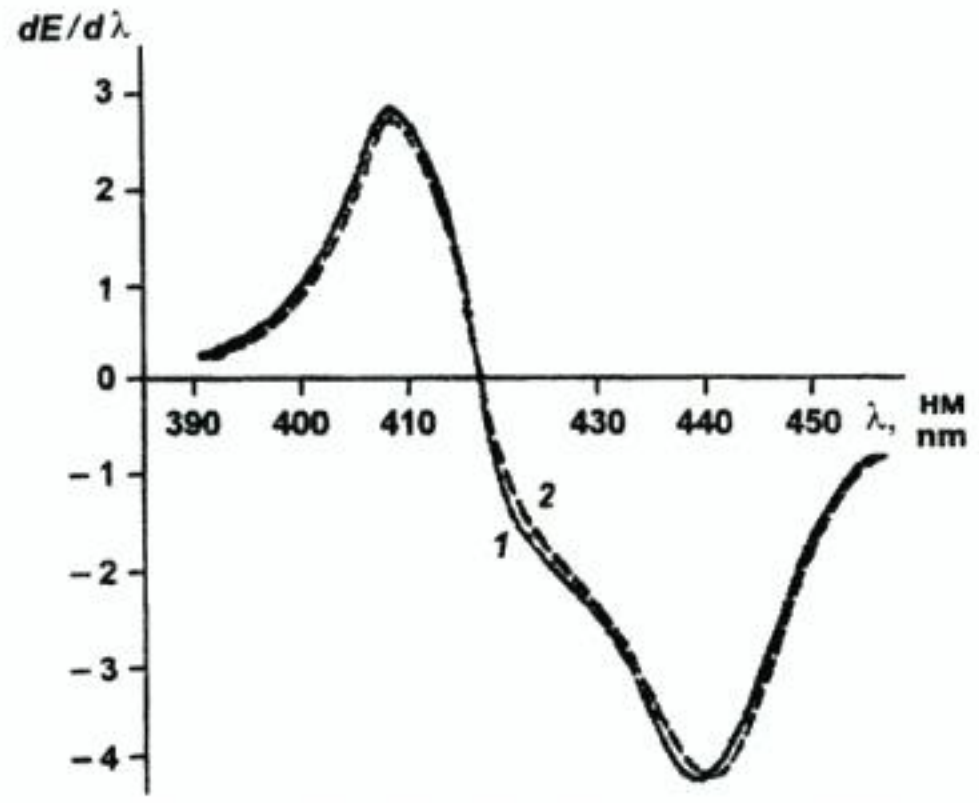



**Рис. 1.** Влияние замораживания на первые производные спектров поглощения цитохром-С-оксидазы, встроенной в липосомы: *1* — контроль; *2* — после замораживания-отогрева.

**Fig. 1.** Freezing effect on the first derivatives of absorption spectra of cytochrome-C-oxidase, built-in liposomes: *1* — control; *2* — after freezing-thawing.

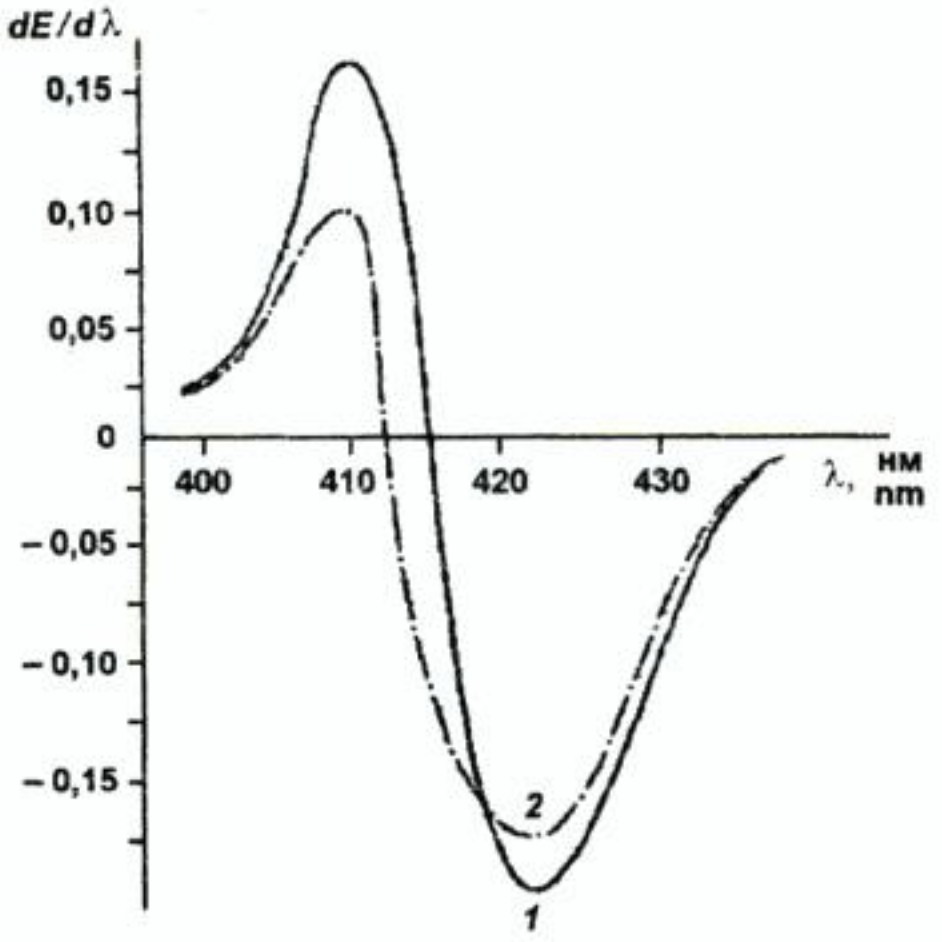



**Рис. 2.** Влияние замораживания-отогрева на первые производные спектров поглощения цитохрома Р-450, встроенного в липосомы: *1* — контроль; *2* — после замораживания-отогрева.

**Fig. 2.** Freezing effect on the first derivatives of absorption spectra of cytochrome P-450, built-in liposomes: *1* — control; *2* — after freezing-thawing.

длинноволновому сдвигу спектра собственной флуоресценции белка с одновременным уменьшением вклада тирозинового компонента. Наблюдаемые изменения могут быть обусловлены конформационными перестройками структуры цитохрома Р-450, вызванными замораживанием-отогревом и приводящими к тушению флуоресценции тирозиновых остатков.

Для получения дополнительной информации о характере конформационных изменений цитохрома Р-450 исследовали тушение флуоресценции белка нейтральным динамическим тушителем. Оказалось, что доступность акриламиду мембранно-связанного цитохрома Р-450 после замораживания и последующего отогрева возрастает, что может быть вызвано частичным разворачиванием белковой молекулы или повышением ее флуктуационной подвижности. Учитывая, что для мембранно-связанного белка второй фактор играет значительно меньшую роль, мы предполагаем, что более вероятной причиной повышения доступности люминофоров цитохрома Р-450 тушителю в результате воздействия низких температур являются конформационные изменения, заключающиеся в некотором разрыхлении белка.

Результаты анализа активности исследуемых белков после быстрого замораживания-отогрева показали (рис. 3): несмотря на изменения конформации биомакромолекул, затрагивающие также окружение активного центра, функциональная активность белков при возвращении к физиологическим условиям изменяется незначительно.

Таким образом, полученные результаты позволяют прийти к заключению, что даже щадящие режимы низкотемпературного воздействия вызывают конформационные изменения гемопротеинов. При этом активность белков изменяется незначительно, несмотря на то, что структурные перестройки за-

To obtain an additional information on the character of conformational changes in P-450 cytochrome, we investigated the suppression of protein fluorescence by a neutral dynamic suppressor. The accessibility of membrane-bound P-450 cytochrome to acryl amide after freezing and following thaiwng occurred to be an increased one, that can be caused by a partial swinging-out of protein molecule or an increase in its fluctuational mobility. Taking into account, that for membrane-bound protein the second factor plays less important role, we suppose, that the most probable reason of an increase of accessibility of luminophores of P-450 cytochrome to a suppressor in the result of low temperature effect are conformational changes, consisting in a certain protein loosening.

The results of an analysis of the activity of investigated proteins after a rapid freeze-thawing showed (Fig. 3): in spite of the changes in conformation of biomacromolecules, affecting also the environment of an active center, the protein funcitonal acticity when coming back to physiological conditions changes slightly. Thus the results obtained allow to conclude, that even mild regimens of low temperature effect, cause conformational changes in hemoproteins.

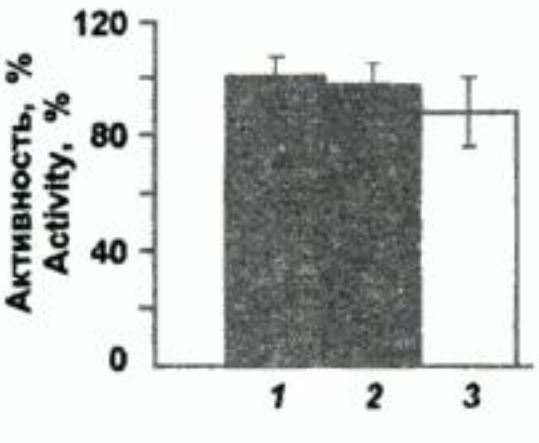



**Рис. 3.** Влияние замораживания на ферментативную активность гемопротеинов: *1* — контроль; *2* — цитохром-С-оксидаза; *3* — цитохром Р-450.

**Fig. 3.** Freezing effect on enzymatic activity of hemoproteins: *1* — control; *2* — cytochrome-C-oxidase; *3* — cytochrome P-450.



Матеріал, захищений авторським правом

трагивают, кроме периферических полипептидных цепей, также и область активного центра. По-видимому, обнаруженные нарушения конформации не являются лимитирующими относительно функции исследованных белков, по крайней мере, не приводят к необратимым изменениям их функциональной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины.

Thereat catalytic activity of proteins slightly change, in spite of the fact, that structural rearrangements affect not only peripheric polypeptide chains, but also the area of an active center. Obviously, the conformation disorders found are not limiting in respect to the function of the proteins studied, at least do not lead to irreversible changes of their functional activity.

This work was accomplished with a financial support of State Foudation of Fundamental Studies of the Ukraine.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М., Грищенко В. И.* Криобиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– С. 432.
2. *Гучок В. М., Воротилин А. М., Луговой В. И., Шраго М. И.* Лечебная эффективность эритроцитов, криоконсервированных под защитой препарата "пропандиосахароль" // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 4.– С. 44–47.
3. *Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.– Киев: Наук. думка, 1981.– 208 с.
4. *Луговой В. И.* Первичные механизмы криоповреждения ферментов // Актуальные проблемы криобиологии.– Киев: Наук. думка, 1981.– С. 15–41.
5. *Douzou P.* Cryobiohemistry: an introduction.– London–New York–San Francisco: Academic Press, 1977.
6. *Haugen D. A., Coon M. J.* Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphtoflavone-inducible microsomal cytochrome P-450 // J. Biol. Chemistry.– 1976.– 251, № 24.– P. 7929–7939.
7. *Kuboyama M., Jong F.C., King T.E.* Studies on cytochrome oxidase // J. Biol. Chem.– 1978.– 247, № 20.– P. 1278–1283.
8. *Zhoug-Xing Zhang, Yuan-Ji Xu, Yuen Chen et al.* Cryopreservation of Human Bone Marrow after Purging T-Cells // Cryobiology.– 1994.– 31, № 5.– P. 478–482.

Поступила 09.02.99

## REFERENCES

1. *Belous A. M., Grischenko V. I.* Cryobiology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1994.– P. 432.
2. *Guchok V. M., Vorotilin A. M., Lugovoy V. I., Shrago M. I.* Therapeutic efficiency of erythrocytes, cryopreserved under the protection of "propanediolsaccharol" preparation // Probl. of Cryobiology.– 1994.– № 4.– P. 44–47.
3. *Demchenko A. P.* UV spectrophotometry and structure of proteins. - Kiev: Nauk. Dumka, 1981.– 208 p.
4. *Lugovoy V. I.* Primary mechanisms of cryodamages of enzymes // Current problems of cryobiology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1981.– P. 15–41.
5. *Douzou P.* Cryobiohemistry: an introduction.– London–New York–San Francisco: Academic Press, 1977.
6. *Haugen D. A., Coon M. J.* Properties of electrophoretically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphtoflavone-inducible microsomal cytochrome P-450 // J. Biol. Chemistry.– 1976.– 251, № 24.– P. 7929–7939.
7. *Kuboyama M., Jong F.C., King T.E.* Studies on cytochrome oxidase // J. Biol. Chem.– 1978.– 247, № 20.– P. 1278–1283.
8. *Zhoug-Xing Zhang, Yuan-Ji Xu, Yuen Chen et al.* Cryopreservation of Human Bone Marrow after Purging T-Cells // Cryobiology.– 1994.– 31, № 5.– P. 478–482.

Accepted in 09.02.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.013.85+611.36.018: 57.043

UDC 611.013.85+611.36.018: 57.043

# Влияние водно-солевого экстракта плаценты человека на сохранность изолированных гепатоцитов в условиях гипотермии

Л. П. КРАВЧЕНКО, О. А. СЕМЕНЧЕНКО, А. Ю. СЕМЕНЧЕНКО, А. М. БЕЛОУС
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# The Effect of Aqueous and Saline Human Placenta Extraction Product on the Integrity of Isolated Hepatocytes Under the Hypothermia Conditions

L. P. KRAVCHENKO, O. A. SEMENCHENKO, A.Yu. SEMENCHENKO, A. M. BELOUS
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Для выяснения активности водно-солевого экстракта плаценты человека использована модель гипотермического хранения гепатоцитов крыс. Показано, что суммарный водно-солевой экстракт плаценты как нативный, так и консервированный способствует пролонгированию сроков хранения гепатоцитов при 4 °С. Положительный эффект препарата выявлен при изучении степени интактности клеток печени после разных сроков хранения при исключении витального красителя и при оценке перекисных процессов липидов, которые интенсифицируются в мембранах при холодовом хранении клеток.

Для з'ясування активності водно-сольового екстракту плаценти людини використана модель гіпотермічного зберігання гепатоцитів щурів. Показано, що сумарний водно-сольовий екстракт плаценти як нативний, так і консервований сприяє пролонгуванню термінів зберігання гепатоцитів при 4 °С. Позитивний ефект препарату виявлено при вивченні ступеня інтактності клітин печінки після різних строків зберігання при вилученні вітального барвника і при оцінці перекисних процесів ліпідів, які інтенсифікуються у мембранах при холодовому зберіганні клітин.

The model of hypothermal storage of rat hepatocytes has been used for elucidation of aqueous and saline human placenta extraction product activity. It has been demonstrated, that total aqueous and saline placenta extraction, both native and cryopreserved, promotes to the prolongation of hepatocyte storage terms at 4 °C. Positive preparation effect has been revealed when studying the level of liver cell integrity after different storage terms with the exclusion of a vital dye and estimation peroxidative lipid processes, intensificating in membranes during a cold storage of cells.

В настоящее время плацента человека является предметом пристального изучения, поскольку биологически активные компоненты могут быть использованы при создании новых лекарственных препаратов. Адекватной моделью исследования для изучения влияния лекарственных средств на биологические объекты может быть модель гипотермического хранения изолированных гепатоцитов. Длительное хранение клеток печени при 4 °С (до 6 сут) создает условия медленного "биохимического строения" гепатоцитов, которые можно корректировать введением лекарственных препаратов различного действия [2]. Данная модель позволяет значительно сократить количество опытных животных [7].

Цель данной работы — изучение влияния водно-солевого экстракта плаценты человека на интенсивность перекисных процессов в мембранах изолированных гепатоцитов (ИГ) и их жизнеспособность в условиях длительного гипотермического хранения.

Изолированные гепатоциты выделяли из печени беспородных белых крыс неферментативным методом [3]. Суспензию клеток хранили в специальных бюксах в бытовом холодильнике 5 суток. Суммарный экстракт плаценты человека (СЭП) получали гомогенизацией ткани в фосфатно-солевом буфере (*pH* 7,4) с последующим центрифугированием. С

Human placenta now is the subject of an attentive study, because biologically active components can be used when creating new medical preparations. The model of hypothermal storage of isolated hepatocytes may be an adequate investigation model for studying the effect of medical means on biological objects. A long storage of liver cells at 4 °C (up to 6 days) creates conditions of slow hepatocyte "biochemical ageing", which can be corrected by the injection of medical preparations of a different effect [2]. The given model also allows to considerably decrease a number of experimental animals [7].

The aim of the given work is to study the effect of aqueous and saline human placenta extraction product on the intensity of peroxidative processes in the membranes of isolated hepatocytes (IH) and their viability under the conditions of a long-term hypothermal storage.

Isolated hepatocytes were isolated from the liver of breedless white rats by means of non-enzymic method [3]. Cellular suspension was stored in special buxes of refrigerator during 5 days. Total human placenta extraction product (TPEP) was obtained by means of tissue homogenization in a phosphate and saline buffer (*pH* 7.4) with a further centrifugation. TPEP has been fractioned by means of preparative chromatography and 7 peptide fractions (PFPE), corresponding to peak maxima in the chromatogram were obtained. Samples were stored during three weeks in



Матеріал, захищений авторським правом

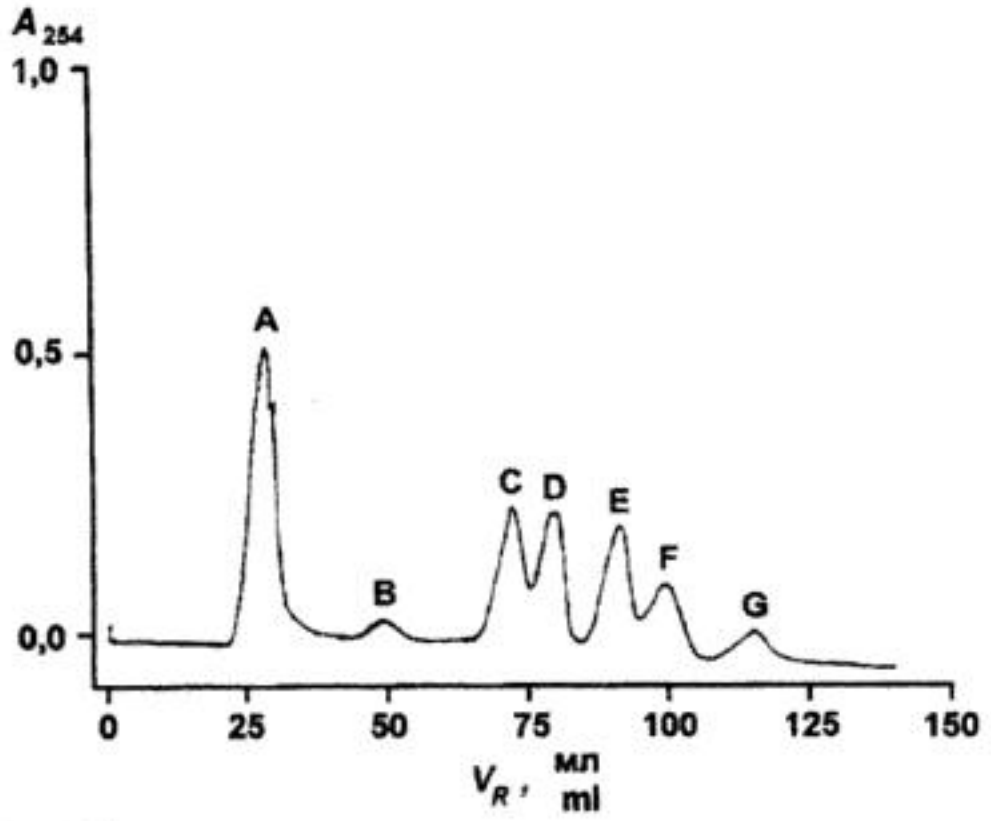



**Рис. 1.** Хроматограмма пептидов водно-солевого экстракта плаценты.

**Fig. 1.** Peptide chromatogramm of an aqueous and saline solution of placenta extraction.

помощью препаративной хроматографии СЭП фракционировали и получали 7 пептидных фракций (ПФЭП), соответствовавших максимумам пиков на хроматограмме (рис. 1). Образцы хранили в течение трех недель в морозильной камере при –12 °С. Влияние СЭП и ПФЭП на жизнеспособность клеток и перекисные процессы в их мембранах изучали в трех концентрациях, мкл/мл суспензии: 1 – 50; 2 – 100; 3 – 150. Содержание белка в миллилитре СЭП было 2,5 мг. Концентрация клеток печени в суспензии – $2\times10^6$/мл. Жизнеспособность оценивали с помощью окрашивания клеток трипановым синим [5]. Уровень МДА в гепатоцитах определяли на этапах холодового хранения (30 мин, 24, 48, 72, 96 и 120 ч) в начальной, спонтанной и аскорбат-инициированной реакциях согласно методу [6].

Известно, что первичным ответом клеток на неблагоприятные условия среды инкубации является нарушение её гомеостаза [1]. Гипотермическое хранение ИГ в натрий- или калийсодержащих консервирующих растворах приводит к раннему резкому набуханию клеток [4]. Поэтому в данных экспериментальных условиях консервирующей средой использовали сахарозосодержащий раствор (ССР), который длительное время предотвращает осмотическое набухание клеток.

При изучении влияния каждой пептидной фракции и суммарного экстракта плаценты на жизнеспособность ИГ при холодовом хранении были получены следующие результаты (рис. 2). Добавление в консервирующую среду свежеприготовленных ПФЭП (A, B, C, D, E, F и G) не влияло на проницаемость клеток печени для витального красителя после всех этапов холодового хранения по сравнению с основной средой. Установлено, что ССР, равно как и с добавками ПФЭП, сохраняет жизнеспособность ИГ после 3-х суток на уровне 70 ± 5%. После этого отмечалось резкое нарастание количества прокрашенных клеток, которое не зависело от концентрации изученных добавок. Через 5 сут хранения суспензии ИГ в указанных растворах при температуре 4 °С жизнеспособность клеток падала до 20 ± 5%. Результаты свидетельствуют

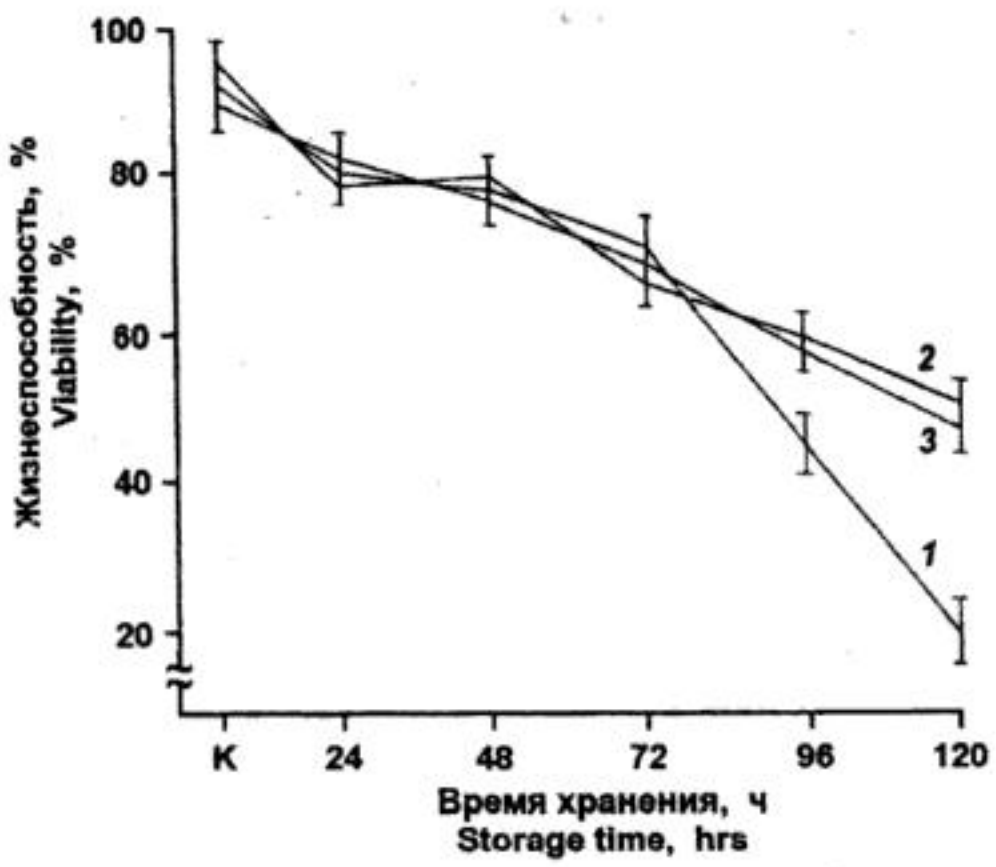



**Рис. 2.** Жизнеспособность изолированных гепатоцитов на этапах холодового хранения: *1* — сахарозо-солевая среда; *2* — сахарозо-солевая среда + суммарный экстракт плаценты; *3* — сахарозо-солевая среда + криоконсервированный экстракт плаценты.

**Fig. 2.** Viability of isolated hepatocytes at the stages of cold storage: *1* — sucrose and saline medium; *2* — sucrose and saline medium + total placenta extraction product; *3* — sucrose and saline medium + cryopreserved placenta extraction product.

the refrigerator at –12 °C. The effect of TPEP and PFPE on a cellular viability and peroxidative processes in their membranes has been studied in three concentrations, μl per ml of suspension: 1 – 50; 2 – 100 and 3 – 150. Protein content in the milliliter of TPE was 2.5 mg. Concentration of liver cells in suspension was $2\times10^6$/ml. Viability was estimated by means of cell staining by trypane blue [5]. The MDA level in hepatocytes was determined at the stages of a cold storage (30 min, 24, 48, 72, 96 and 120 hrs) in an initial, spontaneous and ascorbate-initiated reactions according to the method [6].

It is known, that homeostasis damage is an initial cell response to unfavourable conditions of the incubation medium. Hypothermal storage of IH in the sodium- and potassium containing preserving solutions leads to an early sharp cellular swelling [4]. So, sucrose-containing solution (SCS), preventing cellular osmotic swelling for a long time was used under the given experimental conditions of preserving medium.

When studying the effect of each peptide fraction and total placenta extraction product on the viability of IG at a cold storage the following results have been obtained (Fig. 2). Addition of freshly prepared PFPE (A, B, C, D, E, F and G) into preserving medium did not affect liver cellular permeability for a vital staining after all stages of cold storage in comparison with a major medium.

It has been established, that SCS as well as ones with the PFPE additions preserves IH viability after 3 days at the 70 ± 5% level. Then a sharp increase (growth) of a number of stained cells, did not depend on the concentration of studied additives was observed. In 5 days of IH suspension storage in mentioned solutions at the temperature of 4 °C, cellular viability decreased down to 20 ± 5%. The results testify, that PFPE does not cause a membranestabilizing effect on IH under the conditions of hypothermal storage.



Матеріал, захищений авторським правом

о том, что ПФЭП не оказывают мембранстабилизирующего действия на ИГ в условиях гипотермического хранения.

Введение в сахарозосодержащий раствор СЭП способствует сохранению жизнеспособности ИГ на уровне 50% после 5 сут холодового хранения. Это характерно только для максимальной концентрации изученного препарата. Аналогичное влияние на сохранение жизнеспособности ИГ при длительном холодовом хранении оказывал и криоконсервированный СЭП. В данном случае имеет место стабилизирующее действие препарата СЭП на устойчивость плазматических мембран клеток печени, которое проявляется в более длительные сроки холодового хранения гепатоцитов при 4 °С.

Для выяснения механизма стабилизирующего действия СЭП в отношении сохранности плазматической мембраны ИГ было изучено МДА-образование в клетках в этих экспериментальных условиях (таблица).

Необходимо отметить, что свежевыделенные ИГ, имеющие высокий уровень жизнеспособности (до 95%), характеризуются устойчивой противоокислительной системой, поскольку накопления МДА в спонтанной и аскорбат-зависимой реакциях не наблюдалось. Введение в среду суспендирования свежевыделенных ИГ СЭП не влияло на уровень МДА-образования во всех определяемых реакциях, что свидетельствует об отсутствии какого-либо повреждающего эффекта изучаемого препарата в отношении изолированных гепатоцитов и их мембран.

После 24-часового хранения суспензии ИГ при 4 °С установлено, что в клетках, которые находились в ССР, МДА-образование увеличивается только в аскорбат-зависимой реакции, в то время как в начальной и спонтанной реакциях содержание МДА остается практически на контрольном уровне. Введение в среду СЭП в концентрациях 1 и 2 способствует достоверному снижению нарастания аскорбат-зависимого уровня МДА. Минимальная концентрация изучаемого препарата подобного действия не оказывала. Хранение гепатоцитов 48 ч при 4 °С в ССР приводит к усилению образования МДА в спонтанной и аскорбат-зависимой реакциях. Этот факт вполне объясним, поскольку через 48 ч холодового хранения клеток печени внутренних ресурсов для подавления развивающихся процессов ПОЛ недостаточно [1]. Введение в среду хранения гепатоцитов СЭП способствует подавлению интенсификации процессов ПОЛ после 48 ч пребывания клеток печени в условиях холодовой гипоксии. Это может свидетельствовать о том, что СЭП в своем составе содержит вещества, обладающие антиоксидантными свойствами.

После следующих суток хранения ИГ в ССР с добавлением СЭП показатели МДА-образования

**Влияние водно-солевого свежеприготовленного СЭП на уровень образования МДА в ИГ в условиях гипотермического хранения ($n = 7$)**

**The effect of an aqueous and saline freshly-prepared TPEP on the level of MDA formation in IH under the conditions of hypothermal storage ($n = 7$)**

| Сроки хранения при 0 °С, ч<br>Terms of storage at 0 °С, hrs | | Уровень МДА, нмоль/млн клеток<br>MDA level, nMol/mln of cells | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ССР<br>SCS | ССР + СЭП$_3$<br>SCS + SPE$_3$ | ССР + СЭП$_2$<br>SCS+SPE$_2$ | ССР + СЭП$_1$<br>SCS+SPE$_1$ |
| 0,5 | H I | 0,361 ± 0,031 | 0,329 ± 0,029 | 0,323 ± 0,028 | 0,363 ± 0,036 |
| | C S | 0,364 ± 0,038 | 0,340 ± 0,031 | 0,345 ± 0,032 | 0,362 ± 0,035 |
| | A A | 0,392 ± 0,025 | 0,360 ± 0,040 | 0,377 ± 0,025 | 0,325 ± 0,032 |
| 24 | H I | 0,375 ± 0,037 | 0,340 ± 0,034 | 0,353 ± 0,035 | 0,363 ± 0,030 |
| | C S | 0,398 ± 0,040 | 0,347 ± 0,037 | 0,350 ± 0,032 | 0,387 ± 0,040 |
| | A A | 0,472 ± 0,042 | 0,390 ± 0,028 | 0,397 ± 0,033 | 0,435 ± 0,039 |
| | $p$ | | < 0,05 | < 0,05 | |
| 48 | H I | 0,458 ± 0,042 | 0,400 ± 0,035 | 0,464 ± 0,020 | 0,455 ± 0,043 |
| | C S | 0,471 ± 0,040 | 0,420 ± 0,038 | 0,440 ± 0,038 | 0,450 ± 0,040 |
| | A A | 0,606 ± 0,050 | 0,520 ± 0,042 | 0,530 ± 0,050 | 0,590 ± 0,050 |
| | $p$ | | < 0,05 | < 0,05 | |
| 72 | H I | 0,452 ± 0,038 | 0,400 ± 0,032 | 0,464 ± 0,042 | 0,455 ± 0,043 |
| | C S | 0,490 ± 0,041 | 0,430 ± 0,028 | 0,490 ± 0,040 | 0,507 ± 0,038 |
| | A A | 0,650 ± 0,050 | 0,521 ± 0,041 | 0,600 ± 0,051 | 0,633 ± 0,047 |
| | $p$ | | < 0,05 | | |
| 120 | H I | 0,631 ± 0,042 | 0,500 ± 0,041 | 0,540 ± 0,038 | 0,657 ± 0,060 |
| | C S | 0,757 ± 0,038 | 0,597 ± 0,051 | 0,620 ± 0,053 | 0,831 ± 0,057 |
| | A A | 1,872 ± 0,200 | 0,995 ± 0,100 | 1,530 ± 0,198 | 1,840 ± 0,153 |
| | $p$ | | < 0,05 | | |

**Примечание:** Н — начальный уровень МДА; С — спонтанный уровень МДА; А — аскорбат-зависимый уровень МДА-образования; значение $p$ дано в сравнении с контролем.

**Note:** I — the initial MDA level; S — spontaneous MDA level; A — ascorbate-dependent MDA-formation level; $p$ — in comparison with the control.

SPE injection in sucrose-containing solution promotes to the preservation of IH viability at the 50% level in 5 days of cold storage. It is characteristic only for the maximum concentration of studied preparation. Cryopreserved SPE caused an analogous effect on the preservation of IH viability at a long-term cold storage. A stabilizing effect of SPE preparation on the stability of human liver plasmatic membranes, manifesting in more prolonged terms of hepatocyte cold storage at 4 °C occurs in the given case.

The MDA-formation of cells under these experimental conditions was studied to reveal the mechanism of TPEP stabilizing effect concerning the integrity of IH plasmatic membrane (Table).

It is necessary to note, that freshly isolated hepatocytes with a high viability level (up to 95%), are characterized by a stable antioxidative system, because the MDA accumulation in spontaneous and ascorbate-dependent reactions was not observed.

The injection of SPE freshly-isolated hepatocytes in a suspending medium did not affect the MDA-formation level in all determined reactions, testifying to the absence of any damaging effect of studied preparation concerning isolated hepatocytes and their membranes.

In 24 hrs of IH suspension storage at 4 °C it has been established, that in cells, being in SCS, the MDA-formation increases only in the ascorbate-dependent reaction, meanwhile both at an initial and spontaneous reactions the MDA content remains actually at a control level. TPEP injection in 1, 2 concentrations into the medium promotes to a significant decrease of the growth of the MDA ascorbate-depen-



Матеріал, захищений авторським правом

меняются. Максимальная концентрация добавки препарата способствует подавлению накопления вторичного продукта ПОЛ как в спонтанной, так и в аскорбат-зависимой реакции, чего не наблюдалось при использовании средней концентрации препарата.

Подобный концентрационный эффект СЭП получен и после 5-суточного хранения ИГ при 4 °С, однако степень ингибирования образования МДА, определяемая в аскорбат-зависимой реакции, значительно снижается по сравнению с предыдущими этапами хранения. По-видимому, максимальной концентрации СЭП становится недостаточно для подавления процессов ПОЛ, регистрируемых после 5-суточного холодового хранения ИГ. Аналогичное влияние СЭП на МДА-образование в мембранах ИГ в условиях околонулевых температур наблюдается при использовании криоконсервированного препарата. Это свидетельствует о том, что хранение СЭП при –12 °С не изменяет его противоокислительных свойств.

Таким образом, введение СЭП в среду длительного холодового хранения изолированных клеток печени способствует значительному пролонгированию сроков сохранности ИГ.

Положительный эффект препарата выявлен при изучении интактности клеток при исключении витального красителя и при оценке перекисных процессов липидов после разных сроков хранения в условиях холодовой гипоксии. Полученные данные указывают на наличие у СЭП антиокислительных свойств. Одной из причин отсутствия положительного эффекта при использовании индивидуальных пептидных фракций может быть снижение их концентрации в образце после разделения. Вероятно, стабилизирующий эффект может проявляться только при совместном действии двух, трех и более фракций.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Биленко М. В.* Ишемическое и реперфузионное повреждение органов.– М.: Медицина, 1986.– 368 с.
2. *Кравченко Л. П., Шанина И. В., Белоус А. М.* Эффективность силибора при гипотермическом хранении изолированных гепатоцитов // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 3.– С. 41–44.
3. *Кравченко Л. П., Белоус А. М., Шанина И. В.* Влияние гипотермии на некоторые биохимические параметры изолированных гепатоцитов // Укр. биохим. журн.– 1994.– 66, № 4.– С. 108–113.
4. *Кравченко Л. П., Белоус А. М., Шанина И. В.* Длительное холодовое хранение клеток печени *in vivo* и *in vitro* // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 2.– С. 39–41.
5. *Blaauboer B., Boobis A., Castel J. et al.* The practical applicability of hepatocytes culture in routine testing // ALTA.– 1994.– 22.– P. 231–241.
6. Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and it is clinical significance / In: Yagi K. et al. Lipid peroxides in biology and medicine.– N.Y.: Acad. Press, 1982.– P. 223–242.
7. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– 13.– P. 29–83.


Поступила 25.01.99

dent level. Minimum concentration of studied preparation does not show a similar effect. Hepatocyte storage during 48 hrs at 4 °C in SCS leads to the MDA strengtheninginaspontaneousandascorbate-dependent reactions. This fact is quite explained, because in 48 hrs of liver cell cold storage inner resources to suppress LPO developing processes are insufficient [1]. The SPE injection in a hepatocyte medium promotes to the intensification of LPO process suppression in 48 hrs of liver cell stay under the conditions of cold hypoxia. This may testify, that SPE comprises substances, possessing antioxidative characteristics.

After the next day of IH storage in SCS with the SPE addition the MDA-formation indices change. Maximum concentration of preparation addition promotes to the suppression of the accumulation of LPO secondary products both in an spontaneous and ascorbate-dependent reactions, that was not observed when using an average preparation concentration.

Detailed TPEP concentrational effect has been obtained also after a day IH storage at 4 °C, but the extent of the MDA formation inhibiting, determined in an ascorbate-dependent reaction, considerably decreases in comparison with previous storage stages. Apparently, the maximum TPEP concentration is not enough to suppress LPO processes, being recorded in 5 days of IH cold storage.

An analogous TPEP effect on the MDA-formation in IH membranes under the conditions of above zero temperatures is observed when using cryopreserved preparation. This fact testifies, that the SPE storage at –12 °C did not change its antioxidative characteristics.

Thus, the TPEP injection in the medium of a prolonged cold storage of liver isolated hepatocytes promotes to a considerable term prolongation, IH preservation.

A positive preparation effect has been observed when studying cellular integrity on the exclusion of a vital dye and when estimating lipid peroxidative processes after various storage terms under the conditions of a cold hypoxia. Obtained data point to the presence of antioxidative characteristics in the SPE. A decrease of the concentration of individual peptide fractions in a sample may be one of the causes of the positive effect when ones using. Probably, a stabilizing effect may be manifested only in a joint action of two, three or more isolated fractions.

## REFERENCES


1. *Bilenko L. P.* Ischemic and reperfusive organ damage.– M.: Meditsina, 1986.– 368 p.
2. *Kravchenko L. P., Shanina I. V., Belous A. M.* The silibor efficiency under the hypothermal storage of isolated hepatocytes // Problemy kriobiologii.– 1996.– № 3.– P. 41–44.
3. *Kravchenko L. P., Belous A. M., Shanina I. V.* The hypothermia effect on some biochemical parameters of isolated hepatocytes // Ukr. Biohim. Zhurn.– 1994.– 66, № 4.– P. 108–113.
4. *Kravchenko L. P., Belous A. M., Shanina I. V.* Prolonged cold storage of liver cells *in vivo* and *in vitro* // Problemy Kriobiologii.– 1998.– № 2.– P. 39–41.
5. *Blaauboer B., Boobis A., Castel J. et al.* The practical applicability of hepatocytes culture in routine testing // ALTA.– 1994.– 22.– P. 231–241.
6. *Yagi K.* Assay for serum lipid peroxide level and it is clinical significance / In: Yagi K. et al. Lipid peroxides in biology and medicine.– N.Y.: Acad. Press, 1982.– P. 223–242.
7. *Seglen P.* Preparation of isolated rat liver cells // Meth. Cell Biol.– 1976.– 13.– P. 29–83.


Accepted in 25.01.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 57.086.132: 579

UDC 57.043: 57.086.132: 579

# Динамика репаративных процессов в бактериях *Escherichia coli* после лиофилизации

А. А. ЦУЦАЕВА, И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, А. Л. ДАРЧЕНКО
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# The Dynamics of Reparative Processes in the *Escherichia Coli* Bacteria after Lyophilization

A. A. TSUTSAYEVA, I. P. VYSEKANTSEV, A. L. DARCHENKO
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Экспериментально показано, что в процессе лиофилизации в бактериях возникают нелетальные повреждения, которые после регидратации приводят к задержке пролиферации клеток, снижению в течение 25–30 мин активности синтеза РНК и белка. В последующий период активность синтеза РНК и белка возрастает и значительно превышает исходный уровень. Обратимое ингибирование процессов транскрипции и трансляции приводит к нарушению репаративных процессов и к гибели части бактерий.

Експериментально показано, що під час ліофілізації в бактеріях виникають нелетальні пошкодження, які після регідратації призводять до затримки проліферації клітин, зменшення на протязі 25–30 хв активності синтезу РНК і білка. Потім активність синтезу РНК і білка зростає і значно перевищує вихідний рівень. Оборотне інгібування процесів транскрипції і трансляції викликає порушення репаративних процесів і загибель частини бактерій.

It has been experimentally proved, that in lyophilization process in bacteria non-lethal damages, leading to the delay of cell proliferation after rehydration, a decrease in the activity of synthesis of RNA and protein during 25–30 min, appeared. In the following period the activity of the synthesis of RNA and protein increases and considerably exceeds an initial level. Reversible inhibiting of the processes of transcription and translation results in the damage of reparative processes and death of the part of bacteria.

Установлено, что в биологических объектах после выхода из состояния глубокого холодового анабиоза развиваются нелетальные повреждения, приводящие к обратимым изменениям морфофункциональных свойств, активности процессов биоэнергетики, биосинтеза нуклеиновых кислот и белков [2, 5, 10]. После регидратации лиофилизированных объектов также отмечаются различные обратимые изменения морфофункциональных свойств [11]. Одним из наиболее информативных показателей активности репаративных процессов после различных стрессорных воздействий является уровень биосинтетических процессов [1, 3]. Цель данной работы — изучение пролиферативной активности и процессов биосинтеза нуклеиновых кислот и белков в клетках *E. coli B* после вывода их из состояния ангидробиоза.

Объектом исследования служили бактерии *E. coli B* (штамм получен из Российской коллекции промышленных микроорганизмов, ГНИИ генетика, Москва). Бактерии выращивали в глюкозо-минеральной среде М9 [8] при 37 °С с аэрацией до начала стационарной фазы роста. Затем бактерии осаждали центрифугированием и ресуспендировали до концентрации $10^9$ клеток/мл в защитной среде (среда М9 с добавлением 10% сахарозы и 1% желатина), полученную суспензию по 1 мл вносили в пенициллиновые флаконы.

Бактерии лиофилизировали на установке УЗВ-2 (производство СКТБсОП ИПКиК НАН Украины, Харьков). Образцы замораживали до –30 °С со скоростью 2 °С/мин. Сублимацию проводили при ос-

It has been established, that non-lethal damages, resulting in reversible changes of morphofunctional properties, activity of bioenergetics processes, biosynthesis of nucleic acids and proteins develop in biological objects after the leaving the state of a deep cold anabiosis [2, 5, 10].

Various reversible changes of morphofunctional properties are observed also after the rehydration of lyophilized objects [11]. The level of biosynthetic processes is one of the most informative indices of reparative process activity after different stress effects [1, 3]. The aim of the given work is to study proliferative activity and processes of nucleic acids and protein biosynthesis in the *Escherichia coli B* cells after their release from an unhydrobiosis state.

The *E. coli B* bacteria were the objects under study (the strain was obtained from the Russian collection of industrial microorganisms, Genetics Institute, Moscow). Bacteria were grown in the M9 glucose and mineral medium [8] at 37 °C with the aeration before the beginning of a stationary growth phase. Then bacteria were precipitated by centrifugation and resuspended up to the concentration of $10^9$ cells/ml in the protecting medium (the M9 medium with the addition of 10% of sucrose and 1% of gelatin), the obtained suspension was added by 1 ml into penicillin bottles. Bacteria were lyofilized by means of the USW-2 (produced by a Special Designing Technological Bureau at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov). Samples were frozen down to –30 °C with the rate of 2 °C/min.



Матеріал, захищений авторським правом

таточном давлении в камере $(1,3–1,8)\cdot10^{-2}$ Па. Конечная температура сушки составляла 17–20 °С. Образцы высушивали до остаточной влажности 1,5–3%. Хранили образцы герметично упакованными при 4 °С в течение 2–3 сут. Регидратацию производили путем добавления до начального объема стерильной дистиллированной воды.

Количество жизнеспособных бактерий определяли чашечным методом Коха [9] по количеству макроколоний, сформировавшихся на мясопептонном агаре [6], а их пролиферативную активность — по количеству жизнеспособных клеток на 1 мл бактериальной культуры в процессе ее культивирования.

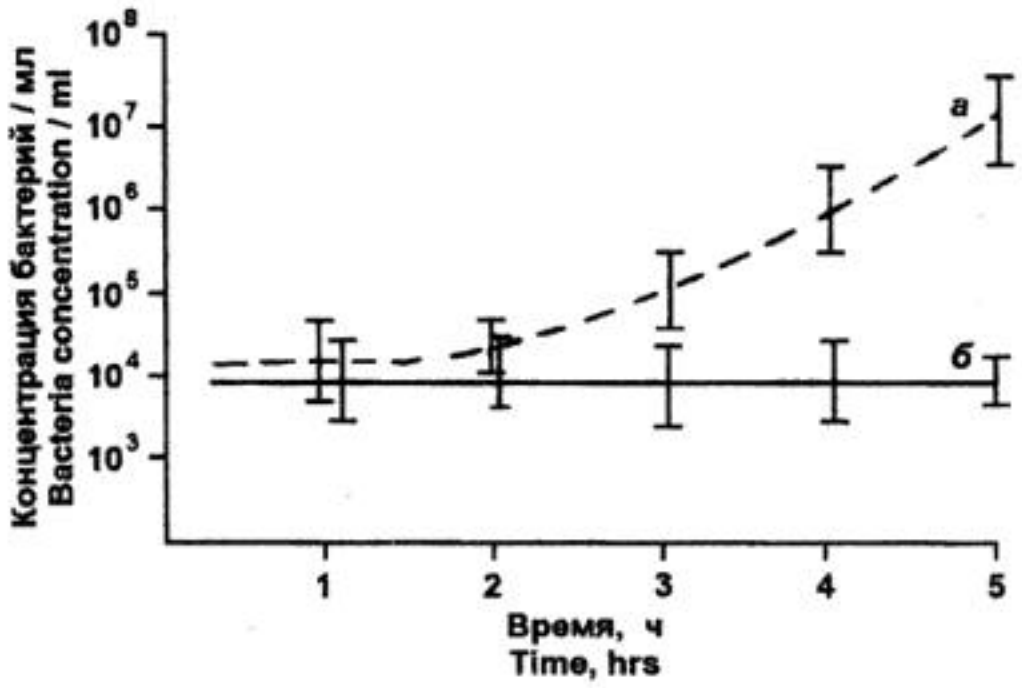
Активность биосинтетических процессов изучали по включению меченых предшественников. Бактерии после регидратации осаждали центрифугированием, переводили в среду М9 и инкубировали с аэрацией при 37 °С. В процессе инкубирования отбирали пробы объемом 1 мл, выдерживали их 5 мин с $^{3}$H-уридином (2,5 мкКи/мл), $^{14}$C-лейцином (10 мкКи/мл), $^{3}$H-тимидином (10 мкКи/мл). Включение радиоактивных меток останавливали добавлением 10%-й трихлоруксусной кислоты. Количество включенных меченых предшественников определяли на миллипоровых фильтрах [4]. Активность фильтров измеряли счетчиком "Beckman SL 7800".

Обратимое ингибирование биосинтеза РНК и белка проводили по методу [2] рифампицином, актиномицином Д и хлорамфениколом, которые использовали в концентрациях, не вызывающих гибели бактерий в контрольных образцах.

Полученные результаты обрабатывали статистически по общепринятым методам [7]; достоверность расчетов 95%.

Было установлено, что после лиофилизации в описанном режиме сохранялись жизнеспособными 45–48% бактерий. При культивировании регидратированных бактерий в среде М9 в течение 5 ч деление бактериальных клеток не происходило. В то же время при пересеве бактерий из контрольных образцов lag-фаза равнялась 1,5 ч. Затем начиналось деление клеток и бактериальная культура входила в логарифмическую фазу роста (рисунок).

Активность биосинтеза ДНК в бактериях после лиофилизации достоверно не отличалась от контрольных значений (табл. 1). Синтез РНК в бактериях после лиофилизации снижался в течение




Начальные этапы роста периодической культуры *E. coli B* до (*а*) и после (*б*) лиофилизации.

Initial stages of the increasing of the periodical culture of *E. coli* before (*a*) and after (,) of lyophilization.

Sublimation was conducted with a residual pressure in a chamber $(1.3–1.8)\times10^{-2}$ Pa. Final drying temperature was 17–20 °C. Samples were dried up to a residual humidity 1.5–3%. Hermetically packed samples were stored at 4 °C during 2–3 days. Rehydration was conducted by means of adding up to an initial volume of a sterile distilled water.

The number of viable bacteria was estimated by means of Koch plate method [9] by the macrocolony number, formed on the beef-extract agar [6], their proliferative activity was determined by the number of viable cells per 1 ml of bacterial culture during its cultivation.

Activity of biosynthetic processes was studied by the including of labelled precursors. After the rehydration bacteria were precipitated by centrifugation, transferred into the M 9 medium and incubated by means the aeration at 37 °C. During the incubation samples with the volume of 1 ml were selected, kept during 5 min with $^{3}$H-uridine (2.5 μKi), $^{14}$C-leucine (10 μKi), $^{3}$-thymidine (10 μKi). The inclusion of radioactive labels was stopped with the addition of 10% trichloracetic acid. The number of included labelled precursors was estimated by millipore filters [4]. Filter activity was measured by means of "Beckman SL 7800" counter.

A reversible RNA and protein biosynthesis inhibiting has been conducted according to the method [2] using rifampycin, D actinomycin and chloramphenicol in the concentrations, not causing the bacteria death in the control samples.

The obtained data were statistically processed by generally accepted methods [7], a statistical significance of calculations made 95%.

It has been established, that after lyophilization in the described regimen 45–48% of bacteria were viable. When cultivating rehydrated bacteria in the M9 medium during 5 hrs bacterial cell fission did not occur. At the same time when reinoculating bacteria from control samples, the lag-phase was 1.5. Then cell division began and bacterial culture entered a logarythmic growth phase (Figure).

The DNA biosynthesis activity in bacteria after lyophilization statistically did not differ from the control values (Table 1). The RNA synthesis in bacteria after lyophilization decreased during 25 min after rehydration. From the 30th min the activity of $^{14}$C-uridin including sharply increased, reaching the maximum by 60th–90th min, that in 17.99–16.3 times higher than control values. Then the $^{14}$C-uridin activity decreased, but by the 300 min (time of observation) remained statistically higher than control values. Protein synthesis in bacteria decreased in comparison with an initial level during 30 min after rehydration. The activity of $^{14}$C-leucin inclusion increased by the 60th min, reaching the maximum values between the 120 and 210 min, that in 7.72–6.29 times higher than the control ones. Then the number of included $^{14}$C-leucin decreased, but was higher than the control values during all period of observation.

After lyophilization the susceptibilty to antibiotics-inhibitors of protein and DNA biosynthesis changes in some bacteria. A reversible inhibition of



Матеріал, захищений авторським правом

25 мин после регидратации. С 30-й минуты активность включения $^{14}$C-уридина резко возрастала, достигая максимума к 60–90-й минуте, что в 17,99–16,3 раза выше контрольных значений. Затем активность включения $^{14}$C-уридина снижалась, но до 300-й минуты (время наблюдения) оставалась достоверно выше контрольных значений. Синтез белка в бактериях снижался по сравнению с исходным уровнем в течение 30 мин после регидратации. К 60-й минуте активность включения $^{14}$C-лейцина возрастала, достигая максимальных значений между 120-й и 210-й минутами, что в 7,72–6,29 раза выше контроля. Затем количество включенного $^{14}$C-лейцина снижалось, но было выше контрольных значений в течение всего периода наблюдения.

После лиофилизации у части бактерий изменялась чувствительность к антибиотикам-ингибиторам биосинтеза РНК и белка. Обратимое ингибирование биосинтеза РНК и белка, не вызывавшее гибели бактерий в контроле, приводило к дополнительной гибели лиофилизированных бактерий во время культивирования их после регидратации. Так, ингибирование синтеза РНК рифампицином достоверно снижало количество жизнеспособных клеток в течение 90 мин после регидратации, актиномицином Д – в течение 60 мин (табл. 2). При ингибировании биосинтеза белка хлорамфениколом дополнительная гибель бактерий происходила в течение 30 мин после регидратации. После указанных временных интервалов устойчивость лиофилизированных бактерий к ингибиторам биосинтетических процессов восстанавливалась.

**Таблица 1** **Table 1**

**Включение меченых предшественников в ДНК, РНК, белок бактерий *E. coli B* после лиофилизации**

**The inclusion of labelled precursors in the DNA, RNA, protein of *E. coli B* bacteria after lyophilization**

| Время после регидратации, мин<br>The time after rehydration, min | Количество включенных предшественников (импульсы/$10^9$ клеток), % от контроля<br>The number of included precursors (impulses/$10^9$ cells), % of a control | | |
|---|---|---|---|
| | $^3$H-тимидин* / $^3$H-thymidine | $^{14}$C-уридин** / $^{14}$C-uridine | $^{14}$C-лейцин** / $^{14}$C-leucine |
| 20 | 92 ± 4 | 42 ± 4 | 53 ± 3 |
| 25 | 98 ± 6 | 79,6 ± 4 | 62 ± 4 |
| 30 | 102 ± 3 | 210 ± 12 | 85 ± 6 |
| 60 | 106 ± 4 | 1799 ± 170 | 287 ± 24 |
| 90 | 108 ± 5 | 1630 ± 250 | 487 ± 31 |
| 120 | 110 ± 6 | 1279 ± 180 | 772 ± 40 |
| 180 | 104 ± 4 | 212 ± 42 | 725 ± 32 |
| 210 | 104 ± 6 | 189 ± 36 | 629 ± 28 |
| 240 | 105 ± 4 | 176 ± 32 | 370 ± 30 |
| 270 | 106 ± 4 | 194 ± 41 | 246 ± 24 |
| 300 | 108 | 211 ± 32 | 176 ± 21 |

**Примечания**: * — $p > 0,05$; ** — $p < 0,05$.

**Notes**: * — $p > 0,05$; ** — $p < 0,05$.

RNA and protein biosynthesis, did not cause the bacteria death in a control, resulted in a complementary death of lyophilized bacteria during their cultivation after rehydration. Thus, the RNA synthesis inhibition by rifampycin statistically decreased a number of viable cells during 90 min after rehydration, by actinomycin D – during 60 min (Table 2). When protein

**Таблица 2** **Table 2**

**Влияние обратимого ингибирования биосинтеза РНК, белка на жизнеспособность бактерий *E. coli B* после лиофилизации**

**The effect of a reversible inhibition of RNA, protein biosynthesis on the viability of *E.coli B* bacteria after lyophilization**

| Время культивирования после регидратации, мин<br>Cultivating time after rehydration, min | Количество жизнеспособных бактерий/мл во время культивирования без ингибиторов<br>The number of viable bacteria/ml at cultivation without inhibitors | Количество жизнеспособных бактерий/мл после воздействия<br>The number of viable bacteria/ml after the effect | | |
|---|---|---|---|---|
| | | рефампицином<br>by refampycin | актиномицином Д<br>by actinomycin D | хлорамфениколом<br>by chloramphenicol |
| Контроль после лиофилизации<br>Control after lyophilization | $(1,42 \pm 0,4)\cdot10^9$ | — | — | — |
| 20 | $(1,54 \pm 0,3)\cdot10^9$; $p_1 > 0,05$ | $(2,84 \pm 0,3)\cdot10^6$; $p_2 < 0,05$ | $(9,94 \pm 0,3)\cdot10^6$; $p_2 < 0,05$ | $(5,68 \pm 0,4)\cdot10^7$; $p_2 < 0,05$ |
| 30 | $(1,40 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_1 > 0,05$ | $(4,26 \pm 0,5)\cdot10^6$; $p_2 < 0,05$ | $(5,25 \pm 0,4)\cdot10^7$; $p_2 < 0,05$ | $(1,17 \pm 0,3)\cdot10^9$; $p_2 < 0,05$ |
| 60 | $(1,44 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_1 > 0,05$ | $(4,97 \pm 0,4)\cdot10^7$; $p_2 < 0,05$ | $(7,38 \pm 0,5)\cdot10^8$; $p_2 < 0,05$ | $(1,39 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ |
| 90 | $(1,49 \pm 0,5)\cdot10^9$; $p_1 > 0,05$ | $(5,90 \pm 0,5)\cdot10^8$; $p_2 < 0,05$ | $(1,41 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ | $(1,40 \pm 0,3)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ |
| 120 | $(1,47 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_1 > 0,05$ | $(1,38 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ | $(1,40 \pm 0,5)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ | $(1,41 \pm 0,4)\cdot10^9$; $p_2 > 0,05$ |

**Примечания**: $p_1$ — уровень доверительной вероятности между средними значениями в контроле после регидратации и в процессе культивирования; $p_2$ — уровень доверительной вероятности между средними значениями в контрольных образцах и в образцах, подвергавшихся воздействию ингибиторов.

**Notes**: $p_1$ — the level of confidence probability between average values in the control after rehydration and during cultivating; $p_2$ — the level of confidence probability between average values in the control values and in samples, subjected to the inhibitor effect.



Матеріал, захищений авторським правом

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в процессе лиофилизации, как и при криоконсервировании [10], в сохранивших жизнеспособность бактериях образуются нелетальные повреждения. Учитывая результаты наших экспериментов по криоконсервированию микроорганизмов [5, 10] и их чувствительность к физико-химическим процессам, сопровождающим лиофилизацию [12], можно считать, что ведущую роль в повреждении микробных клеток во время криоконсервирования и лиофилизации играет повышение концентрации солей. Более выражен этот повреждающий фактор при лиофилизации, следствием чего является большее количество нелетальных повреждений. У лиофилизированных бактерий пролиферация не происходила в течение 5 ч, а после криоконсервирования бактерий этого же штамма она начиналась через 3 ч после отогрева [5]. Более продолжительным и выраженным по сравнению с криоконсервированием [10] был период снижения биосинтетических процессов. Это свидетельствует о существенном повреждении при лиофилизации структур, обеспечивающих процессы транскрипции и трансляции. Репарация этих структур происходит в течение 25–30 мин, после чего активность биосинтеза РНК и белка значительно превышает контрольные значения. По-видимому, как и после криоконсервирования [10], для репарации нелетальных повреждений, возникших при лиофилизации, необходимы белки, в норме в бактериальных клетках отсутствующие или синтезируемые в количествах, недостаточных для репарации повреждений. Обратимое ингибирование процессов транскрипции и трансляции антибиотиками приводит к нарушению синтеза этих белков, в результате чего часть бактерий погибает.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Бекер М. Е., Дамберг А. И., Рапопорт А. И.* Анабиоз микроорганизмов.– Рига: Зинатне, 1981.– 247 с.
2. *Высеканцев И. П., Микулинский Ю. Е., Степанюк Л. В.* Роль процессов трансляции и транскрипции в репарации повреждений криоконсервированных бактерий *E. coli* // Влияние охлаждения на биологические объекты.– Харьков, 1990.– С. 19–21.
3. *Калакуцкий Л. В., Сидякина Т. М.* Анабиоз и консервация микроорганизмов // Криобиология.– 1988.– № 4.– С. 3–9.
4. *Кеннел Д.* Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК и белка // Методы исследования нуклеиновых кислот.– М.: Мир, 1970.– С. 138–144.
5. *Криобиология* и биотехнология / Под ред. А. А. Цуцаевой и др.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
6. *Лабинская А. С.* Микробиология с техникой микробиологических исследований.– М.: Медицина, 1978.– 344 с.
7. *Лапин Г. Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1980.– 239 с.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике.– М.: Мир, 1976.– 436 с.
9. *Практикум* по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.– 307 с.
10. *Холодовой* стресс и биологическое системы / Под ред. А. А. Цуцаевой и др.– Киев: Наук. думка, 1991.– 176 с.
11. *Heckly R. J., Quay J.* A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations // Cryobiology.– 1981.– 18, № 6.– P. 592–597.
12. *Zwetkow Z. D.* Vakuumgefriertrockung.– Leipzig: Veb Fachbuchverlag, 1985.– 345 s.


Поступила 27.10.98

biosynthesis inhibiting by chloramphenicol a complementary bacteria death occurred during 30 min after rehydration. Stability of lyophilized bacteria to biosynthetic process inhibitors recovered after the mentioned time intervals.

Obtained experimental data testify, that during lyophilization, as well as cryopreservation [10], nonlethal damages are formed in the bacteria with a kept viability. Taking into consideration the results of our experiments on the microorganism cryopreservation [5, 10] and their sensitivity to physical and chemical processes, accompaning lyophilization, one may considered, that an increase of saline concentration plays a leading role in the damage of microorganism cells during cryopreservation and lyophilization, and so a great number of non-lethal damages is the result of it. Proliferation in lyophilized bacteria did not occur during 5 hrs, but after this strain bacteria cryopreservation it started in 3 hrs after thawing [5]. The period of biosynthetic process decrease was more prolonged and manifested in comparison with cryopreservation [10]. This fact testifies to a considerable damage of structures at lyophilization, providing transcriptional and translational processes. The reparation of these structures occurs within 25–30 min, then the RNA and protein biosynthesis activity considerably exceeds control values. Probably, as for cryopreservation [10], the proteins, that are absent in the norm in bacterial cells or being synthesized in the number, insufficient for reparation of damages, are necessary to repair nonlethal damages, appear at lyophilization. A reversible inhibition of transcriptional and translational processes by antibiotics results in the damage of these protein synthesis and some bacteria die in the result of this fact.

## REFERENCES


1. *Beker M. E., Damberg A. I., Rapoport A. I.* Microorganism anabiosis.– Riga: Zinatne, 1981.– 247 p.
2. *Vysekantsev I. P., Mikulinsky Yu. E., Stepanyuk L. V.* The role of translational and transcriptional processes in the reparation of damages in the *E. coli* cryopreserved bacteria // The effect of cooling on biological objects.– Kharkov, 1990.– P. 19–21.
3. *Kalakutsky L. V., Sidyakina T. M.* Microorganism's anabiosis and preservation // Kriobiologiya.– 1988.– № 4.– P. 3–9.
4. *Kennel D.* The usage of filters for the separation of radioactive RNA, DNA and protein // The methods of nucleic acid investigation.– M.: Mir, 1970.– P. 138–144.
5. *Cryobiology* and Biotechnology / Ed. by A. A. Tsutsayeva et al.– Kiev: Nauk. Dumka, 1987.– 216 p.
6. *Labinskaya A.S.* Microbiology with the method of microbiological investigations.– M.: Meditsyna, 1978.– 344 p.
7. *Lapin G.F.* Biometry.– M.: Vys. shkola, 1980.– 239 p.
8. *Miller J.* Experiments in the molecular genetics.– M.: Mir, 1976.– 436 p.
9. *Practical* course on micribiology / Ed. by N. S. Yegorov.– M.: Moscow University, 1976.– 307 p.
10. *A cold* stress and biological systems / Ed. by A. A. Tsutsayeva et. al.– Kiev: Nauk. dumka, 1991.– 176 p.
11. *Heckly R. J., Quay J.* A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations // Cryobiology.– 1981.– 18, № 6.– P. 592–597.
12. *Zwetkow Z. D.* Vakuumgefriertrockung.– Leipzig: Veb Fachbuchverlag, 1985.– 345 s.


Accepted in 27.10.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 541.117

UDC 57.043: 541.117

# Исследование акустической эмиссии в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола при охлаждении–нагреве

А. В. ЗИНЧЕНКО, В. Д. ЗИНЧЕНКО

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

# Investigation of an Acoustic Emission in Glycerol and 1,2-Propanediol Aqueous Solutions under Cooling and Heating

A. V. ZINCHENKO, V. D. ZINCHENKO

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

Исследована генерация акустической эмиссии (АЭ) в системах вода–глицерин и вода–1,2-пропандиол при охлаждении со скоростью около 100 и нагреве около 70 °С/мин в диапазоне температур 0 ÷ –196 °С. Уменьшение интенсивности АЭ в растворах по сравнению с чистым льдом объясняется существованием прослоек аморфного вещества между кристаллами льда, способствующих взаимному скольжению кристаллов и снижению термомеханических напряжений.

Досліджена генерація акустичної емісії (АЕ) в системах вода–гліцерин і вода–1,2-пропандіол при охолодженні з швидкістю біля 100 і нагріванні біля 70 °С/хв в діапазоні температур 0 ÷ –196 °С. Зменшення інтенсивності АЕ в розчинах порівняно з чистим льодом пояснюється існуванням прошарків аморфної речовини між кристалами льоду, які сприяють взаємному ковзанню кристалів і зниженню термомеханічних напружень.

A generation of an acoustic emission (AE) in water–glycerol and water–1,2-propanediol systems under cooling with the rate about 100 and heating about 70 °C/min in the temperature range of 0 ÷ –196 °C was investigated. A decrease in AE intensity in the solutions in comparison with a pure ice is explained by the existance of amorphous substance layers between ice crystals, contributing to a mutual sliding of crystals and decrease in thermomechanical tensions.

Термомеханические напряжения в биологических объектах в процессе их криоконсервирования могут быть одной из причин криоповреждения. Действие термомеханических напряжений при замораживании приводит к деформации и разрушению замороженного материала, что наблюдалось визуально по образованию трещин в растворах криозащитных веществ [1]. Очевидно, растрескивание твердофазной матрицы является причиной разрушения вмороженных в нее клеток.

Согласно полученным результатам о влиянии циклического изменения температуры на замороженную суспензию эритроцитов именно термомеханическими напряжениями матрицы может быть объяснено криоповреждение эритроцитов при температуре ниже температуры стеклования криозащитного раствора [5].

Индикатором зарождения и развития трещин при механическом разрушении материала может служить АЭ [4]. Известно также, что фазовые переходы сопровождаются акустической эмиссией. Например, интенсивная АЭ регистрируется при кристаллизации веществ из раствора или расплава [3]. Следовательно, на основании регистрации АЭ можно судить о термомеханических напряжениях, возникающих при росте кристаллов или растрескивании твердофазной матрицы при замораживании раствора.

Цель настоящей работы — исследование некоторых закономерностей развития АЭ в водных растворах глицерина и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) при их охлаждении и нагреве в диапазоне температур 0 ÷ –196 °С. Для приготовления образцов использовали глицерин отечественного производства марки "ХЧ", 1,2-ПД фирмы "Merck" (purum) и бидистиллат.

Thermomechanical tensions in biological objects during the process of their cryopreservation can be one of the cryodamage cause. The effect of thermomechanical tensions during freezing results in a deformation and destruction of frozen material, that was visually observed according to the crack formation in solutions of cryoprotective substances [1]. It is evident, that the cracking of a solid-phase matrix is the cause of the destruction of frozen-in cells.

According to the results obtained about the effect of the temperature cyclic change on a frozen suspension of erythrocytes, a cryodamage of erythrocytes at the temperature lower than the temperature of cryoprotective solution vitrification can be explained just thermomechanical tensions of a matrix [5].

AE can serve as an indicator of a crack formation and development during material mechanical destruction [4]. It is of common knowlege, that phase transitions are accompanied by an acoustic emission. For example, an intensive AE is recorded during crystallisation of substances from a solution or a melting [3]. Consequently, on the base of AE recording one can judge on thermomechanical tensions, appearing at a growth of crystals or cracking of a solid-phase matrix during solution freezing.

The aim of the given work is the investigation of some reguliarities of AE development in glycerol and 1,2-propanediol (1,2-PD) aqueous solutions during their cooling and heating in the temperature range of 0 ÷ –196 °C. Home produced glycerol of "CP" label, 1,2-PD of "Merck" firm (purum) and bidistillate were used for the samples preparation.

AE recording was accomplished using a specially designed device. The principle of AE recording is



Матеріал, захищений авторським правом

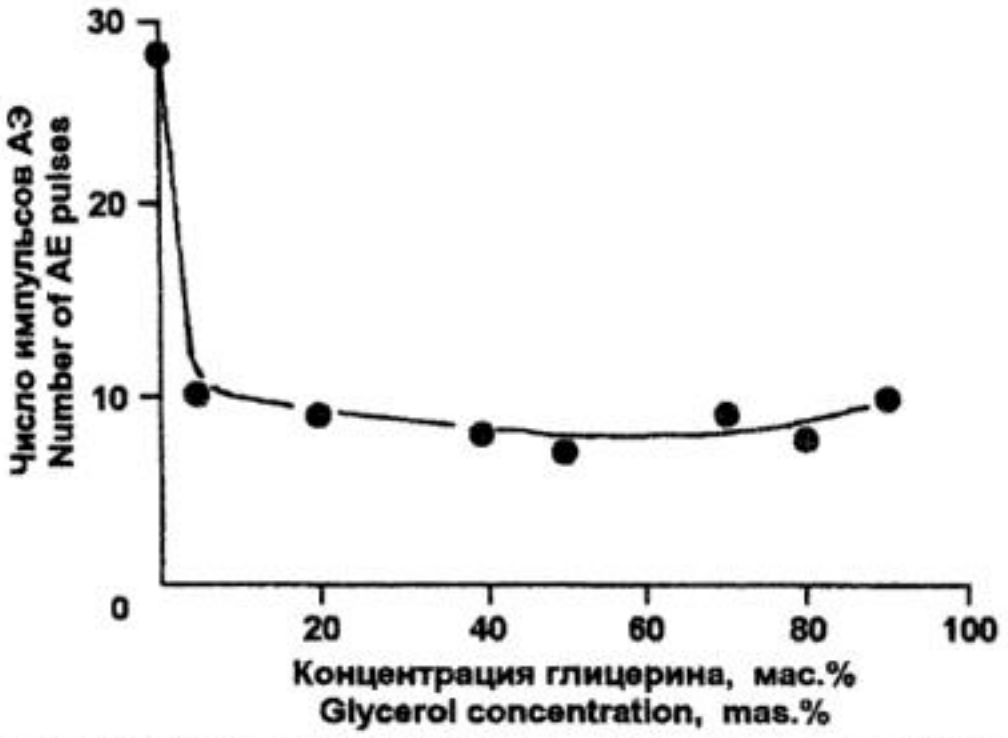



**Рис. 1.** Зависимость числа импульсов АЭ, зарегистрированных при охлаждении в системе вода–глицерин, от концентрации.

**Fig. 1.** Dependency of a number of AE pulses, being recorded during cooling in water–glycerol system, on a concentration.

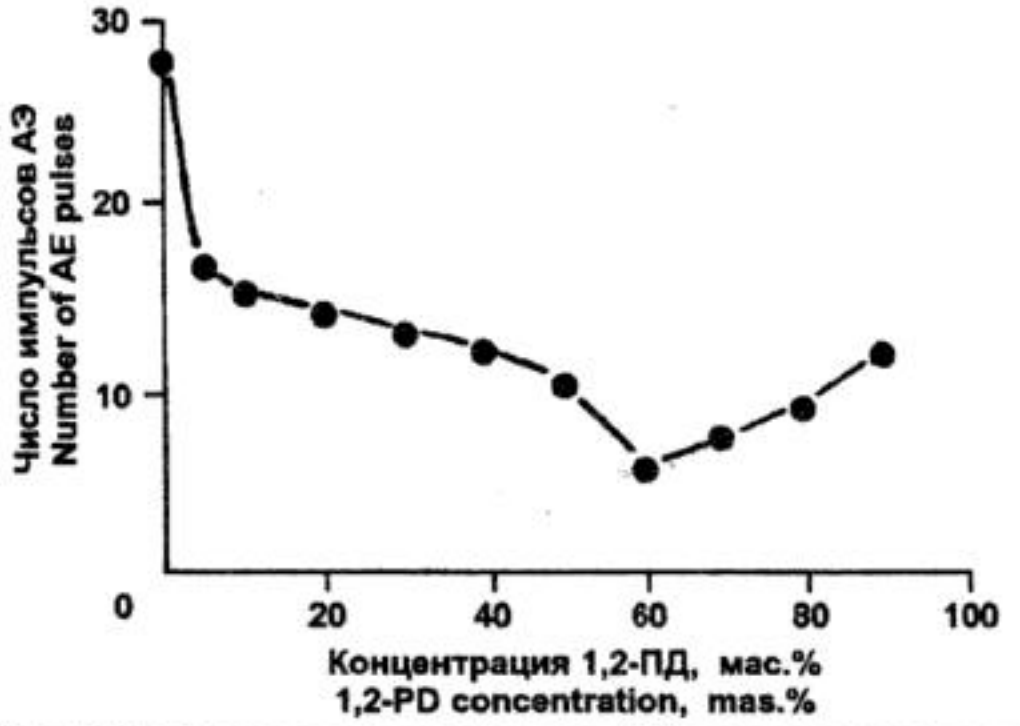



**Рис. 2.** Зависимость числа импульсов АЭ, зарегистрированных при охлаждении в системе вода–1,2-ПД, от концентрации.

**Fig. 2.** Dependency of a number of AE pulses, being recorded during cooling in water–1,2-propanediol system, on a concentration.

Регистрацию АЭ проводили при помощи специально разработанной установки. Принцип регистрации АЭ основан на использовании пьезоэлектрического преобразователя из титаната бария, акустические колебания к которому передаются через звукопровод из нержавеющей стали. Благодаря использованию звукопровода пьезоэлектрический преобразователь расположен вне охлаждаемого пространства и находится в течение всего эксперимента при постоянной температуре.

Электрические сигналы от пьезоэлектрического преобразователя усиливаются и подаются для визуального наблюдения на Y-вход осциллографа и для регистрации на счетчик импульсов.

Мерой интенсивности АЭ служит количество импульсов, регистрируемых частотомером ЧЗ-32. Регистрируемый диапазон частот АЭ лежит в пределах 10 Гц – 1 МГц. Масса образца исследуемой жидкости составляет 500 мг, средняя скорость охлаждения образца при погружении в жидкий азот 100 °С/мин, средняя скорость нагрева 70 °С/мин. Во всех случаях генерация АЭ при нагреве замороженных растворов была слабее, чем при охлаждении.

На рис. 1 и 2 показаны зависимости числа импульсов АЭ, зарегистрированных счетчиком, от состава системы вода–глицерин и вода–1,2-ПД при охлаждении от 0 до –196 °С. Каждая точка на рис. 1 и 2 представляет собой результат усреднения не менее, чем 7 экспериментов. Несмотря на то, что генерация АЭ связана с процессами, которые носят случайный характер, была обнаружена достаточно высокая воспроизводимость числа импульсов АЭ в серии из нескольких экспериментов. При использовании одного и того же образца разброс числа импульсов АЭ укладывался в пределы 10%, если только условия охлаждения и нагрева образца в серии экспериментов были одинаковыми.

В области концентраций неэлектролита 0–2% количество импульсов АЭ резко уменьшается с ростом концентрации глицерина или 1,2-ПД. В области средних концентраций интенсивность АЭ слабо зависит от концентрации в системе вода–глицерин. В системе вода–1,2-ПД наблюдается минимум интенсивности АЭ при концентрации 60% 1,2-ПД и дальше ее слабый рост.

Известно, что в водных растворах глицерина и 1,2-ПД в области малых концентраций неэлектро-

based on the usage of a piezoelectric converter from a barium titanate, where acoustic oscillations are transmitted through an acoustic line of a stainless steel. Due to the usage of an acoustic line, a piezoelectric converter is located out of the space being cooled and is under a constant temperature within all experiment.

Electric signals from a piezoelectric converter are amplyfied and applied for a visual observation to the Y-input of an oscillograph and for the recording to a pulse counter.

A number of pulses, being recorded by the ChZ-32 frequency meter, serves as the AE intensity measure. Recorded range of AE frequencies is in the range of 10 Hz–1 MHz. The mass of an investigated liquid sample makes 500 mg, an average cooling rate during immersion into a liquid nitrogen is 100 °C/min, an average heating rate is 70 °C/min. In all cases AE generation during the heating of frozen solutions was more weak than within cooling.

The dependencies of AE pulse number, recorded by means of a counter, on the composition of water-glycerol and water-1,2 PD system during cooling from 0 to –196 °C are shown in the Fig. 1 and 2. Each point in the Fig. 1 and 2 represents the result of an averaging not less than 7 experiments. In spite of the fact, that AE generation is related to the processes having an accidental character, a quite high reproducibility of AE pulse number in the series of some experiments was revealed. Using the same sample the dispersion in AE pulse number is in the limits of 10%, if only the conditions of the sample cooling and heating in the series of the experiments were equal.

In the region of 0–2% concentrations of a non-electrolyte a number of AE pulses sharply decreases with a growth of glycerol or 1,2-PD concentration. In the region of average concentrations AE intensity slightly depends on the concentration in water-glycerol system. In the water–1,2-PD system a minimum of AE intensity under 60% concentration of 1,2-PD and then its slight growth are observed.

It is of common knowlege, that in glycerol and 1,2-PD aqueous solutions in the region of a non-electrolyte small concentrations under cooling, ice crystals, being surrounded by an amorphous non-crystallizing solution are formed [2]. Issuing from this the following mechanism of a sharp fall in AE intensity in the field of 0–2% concentrations of a non-electrolyte



Матеріал, захищений авторським правом

лита при охлаждении образуются кристаллы льда, окруженные аморфным некристаллизующимся раствором [2]. Исходя из этого, можно представить следующий механизм резкого падения интенсивности АЭ в области концентраций 0–2% неэлектролита по сравнению с чистой водой. При охлаждении между образующимися кристаллами льда возникают прослойки из незамороженной жидкости, которые способствуют взаимному скольжению кристаллов, компенсируя таким образом сдвиговые напряжения в охлаждаемом материале.

При концентрации менее 2% глицерина или 1,2-ПД размеры аморфных прослоек малы и эффективность их в обеспечении скольжения кристаллов невелика. При концентрациях свыше 2% неэлектролита аморфные прослойки имеют уже достаточно большие размеры и взаимная подвижность кристаллов ограничивается вязкостными свойствами окружающего их аморфного вещества.

Более сильное падение интенсивности АЭ в растворах 1,2-ПД по сравнению с глицерином можно объяснить, по нашему мнению, неодинаковой склонностью обеих систем к стеклованию. Известно, что 1,2-ПД является "рекордсменом" в ряду обычно употребляемых криозащитных веществ по стеклообразующей способности. При охлаждении водных растворов 1,2-ПД с реально достижимыми скоростями кристаллы льда образуются только при концентрациях менее 60% 1,2-ПД. Растворы более высоких концентраций 1,2-ПД стеклуются без каких-либо признаков кристаллической фазы [2]. Чистый 1,2-ПД никогда не удавалось закристаллизовать и форма его кристаллов в литературе не известна.

Как видно из рис. 2, минимум АЭ приходится на концентрацию именно 60% 1,2-ПД, выше которой раствор уже не кристаллизуется. Следовательно, возникновение АЭ в растворах данных концентраций может быть объяснено растрескиванием аморфной стеклообразной матрицы, которое протекает менее интенсивно, чем в случае, когда в образце присутствуют кристаллы льда. Однако при кристаллизации льда образование стеклообразных фаз в криозащитном растворе снижает термомеханические напряжения и уменьшает растрескивание материала, как описано выше. Это явление представляет собой помимо известных еще один механизм защитного действия стеклующихся криопротекторов при криоконсервировании биологических объектов.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Вода* и водные растворы при температурах ниже 0 °С / Под ред. Ф. Франкса.– Киев: Наук. думка, 1985.– 387 с.
2. *Зинченко А. В.* Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур –150 °С – 0 °С: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.– Харьков, 1983.– 22 с.
3. *Петченко А. М.* Исследование релаксационных процессов в CsI акустическим методом // Укр. физический журн.– 1990.– 35, № 12.– С. 1833–1837.
4. *Чишко К. А.* Излучение звука при развитии осесимметрической трещины в изотропной упругой среде // Акустический журн.– 1990.– 36.– С. 541–547.
5. *Vorotilin A. M., Zinchenko A. V., Moiseyev V. A.* Cell cryoinjury at the state of thawing // Cryo-Lett.– 1991.– 12.– P. 77–86.


Поступила 12.01.99

in comparison with a pure water can be considered. The layers from a non-frozen liquid, contributing to crystal mutual sliding, compensating by this way shift tensions in a material under cooling, appear between forming ice crystals during cooling.

Under glycerol or 1,2-PD concentration lesser than 2% the dimensions of amorphous layers are small and their efficiency in providing crystal sliding is not high. Under concentrations higher than 2% of non-electrolyte, amorphous layers already have quite large dimensions and mutual crystal mobility is limited by viscous properties of surrounding them amorphous substance.

A more strong fall in AE intensity in 1,2-PD solutions in comparison with glycerol can be explained, according to our opinion, by a non-equal tendensy of both systems to the vitrification. It is known, that 1,2-PD is the "record-holder" in the series of usually applied cryoprotective substances by a glass-forming capacity. Under cooling of 1,2-PD aqueous solutions with actually reached rates, ice crystals are formed only at the concentrations less than 60% of 1,2-PD. The solutions of higher concentrations of 1,2-PD vitrify without any signs of a crystalline phase [2]. One did not ever manage to record a pure 1,2-PD and its crystals' form is not known in the literature.

As it is seen from the Fig. 2, AE minimum falls at the concentration just of 60% of 1,2-PD, higher which the solution is not already crystallized. Consequently, AE appearence in the solutions of the given concentrations might be explained by cracking of an amorphous glass-like matrix, that proceeds less intensive, than in the case, when in the sample the ice crystals present. But during the ice crystallization the formation of glass-like phases in a cryoprotective solution reduces thermomechanical tensions and decreases the material cracking, that is described above. This phenomenon represents by itself except knowing, one more mechanism of a protective effect of vitrifying cryoprotectants during biological object cryopreservation.

## REFERENCES


1. *Water* and aqueous solutions under the temperatures lower than 0 °C / Ed. by F. Franks.– Kiev: Naukova dumka, 1985.– 387 p.
2. *Zinchenko A. V.* Investigation of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polyatomic alcohols in –150 °C – 0 °C temperature range: Author's abstract of thesis for the PhD (physics and mathematics) obtaining.– Kharkov, 1983.– 22 p.
3. *Petchenko A. M.* Study of relaxing processes in CsI using acoustic method // Ukr. Physical Journ.– 1990.– 35, № 12.– P. 1833–1837.
4. *Chishko K. A.* Sound radiation during axially symmetric crack development in an isotropic elastic medium // Acoustic Journ.– 1990.– 36.– P. 541–547.
5. *Vorotilin A. M., Zinchenko A. V., Moiseyev V. A.* Cell cryoinjury at the state of thawing // Cryo-Lett.– 1991.– 12.– P. 77–86.


Accepted in 12.01.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 547.426.2: 57.043

UDC 547.426.2: 57.043

# Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина

С. В. КОЩИЙ, В. И. ЛУГОВОЙ, А. М. КОМПАНИЕЦ, А. В. НИКОЛЕНКО
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# Cryoprotectants of Glycerol Alkoxy-Substituted Compound Series

S. V. KOSCHIY, V. I. LUGOVOY, A. M. KOMPANIYETS, A. V. NIKOLENKO
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

На основании ранее проведенных исследований, а также литературных данных представлен сравнительный анализ влияния постепенно изменяющейся структуры в ряду алкоксизамещенных глицерина на биологический эффект. Показано, что независимо от типа биологической системы и условий криоконсервирования в данном ряду соединений наблюдается общий характер изменений токсичности и криопротекторной эффективности.

На підставі раніше проведених досліджень, а також літературних даних пропонується порівняльний аналіз впливу структури, що поступово змінюється, в ряду алкоксипохідних гліцерину на біологічний ефект. Показано, що незалежно від типу біологічної системи та умов кріоконсервування в даному ряді сполук спостерігається загальний характер зміни токсичності і кріопротекторної ефективності.

Basing on the earlier conducted investigations, as well as literature data, a comparative analysis of the influence of a gradually changing structure in the series of glycerol alkoxy-substituted substances on biological effect is presented. It has been shown, that irrespective of the type of biological system and conditions of cryopreservation in the given series of compounds, a common character of toxicity and cryoprotective efficiency change is observed.

Глицерин, наряду с высокими показателями криозащитных свойств, имеет ряд недостатков [17]. Наличие в его молекуле 3-х гидроксильных групп и возможность частичной или полной их замены другими группами позволяют исследовать влияние постепенно изменяющейся структуры соединения на эффект криозащиты.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины открыты новые производные глицерина: 1-монометиловый эфир глицерина (1-ММЭГ) для клеток крови, костного мозга и перевиваемых клеточных культур [20]; 1-моноэтиловый эфир глицерина для эмбрионов млекопитающих [21]; этоксигидроксипроизводные глицерина с различной степенью полимеризации этиленоксида для ядросодержащих клеток крови и клеточных культур [3, 22]. В [27] отмечены высокие криозащитные свойства 1-ММЭГ для одноядерных клеток крови. Химическая модификация глицерина заключалась во введении в молекулу простых эфирных групп, преобразуя его: а) в алкиловые — (моно-, ди-, три-); б) этоксигидроксипроизводные; в) внутренние; г) собственные. Ниже приведены структурные формулы производных глицерина:

а) $CH_2 - OR_1$ (R: –H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$)
|
$CH - OR_2$
|
$CH_2 - OR_3$

Glycerol, along with high indices of cryoprotective properties, has some disadvantages [17]. The presence of three hydroxyl groups in its molecule and the possibility of a partial or complete substitution by other groups permit to investigate the effect of a gradually changing structure of a compound on the cryopreservation effect.

In the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine one has found such new glycerol derivatives as: 1-monomethyl ether of glycerol (1-MMEG) for blood cells, bone marrow and recultured cellular cultures [20]; 1-monoethyl ether of glycerol for mammalian embryos [21]; ethoxy-hydroxy-derivatives of glycerol with a different degree of ethylene oxide polymerization for nuclei-containig blood cells and cellular cultures [3, 22]. In [27] one noted high cryoprotective properties of 1-MMEG for mononuclear blood cells. Glycerol chemical modification consisted in the introduction into a molecule simple ethereal groups, by transforming it into: a) alkyl — (mono-, di-, tri-); b) ethoxy hydroxy — derivatives; c) internal; d) own ones. Structural formules of glycerol derivatives are presented below:

a) $CH_2 - OR_1$ (R: –H, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_3H_7$)
|
$CH - OR_2$
|
$CH_2 - OR_3$



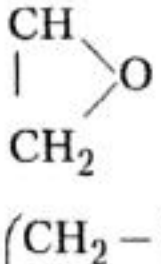
Матеріал, захищений авторським правом

б) $CH_2 - ROH$ (R: $-OCH_2CH_2$)

$CH - ROH$

$CH_2 -- ROH$

в) $CH_2 - OR$ (R: $-H, -C_nH_{2n+1}$)



г) $\left(\begin{array}{l} CH_2 - OH \\ | \\ CH - OH \\ | \\ CH_2 \text{——} \end{array}\right)_n - O$

Моноалкиловые эфиры глицерина предельных спиртов (группа а) обнаружены в маслах овощей, тканях морских животных, наивысшая концентрация — в костном мозге животных [24]. Эфиры, выделенные из масел печени акул, сопоставимы с пенициллином по антимикробному действию. В [23] приводятся результаты изучения соотношения между структурой веществ, токсичностью и central depressant action на животных в ряду α-замещенных эфиров глицерина. Некоторые из них применяются в пищевой промышленности как растворители вкусовых веществ [14]. Моноалкиловые эфиры глицерина не гидролизуются, практически не имеют запаха, стабильны при хранении и физиологически безвредны.

Низшие диалкиловые эфиры глицерина (диметиловые, диэтиловые) не имеют природных аналогов. Однако они находят применение как исходные продукты в органическом синтезе, в фармацевтической промышленности [14]. Вышеназванные эфиры растворимы в воде и являются хорошими растворителями для органических продуктов. Высшие ди- и триалкиловые эфиры обладают ограниченной растворимостью в воде [24].

Другим способом модификации глицерина по превращению в алкоксизамещенные является введение в его молекулу этоксигрупп (вещества группы б). Данные литературы свидетельствуют, что оксиэтилирование различных классов химических веществ до определенной молекулярной массы снижает их токсичность [14] и улучшает криозащитные свойства [1]. Продукты оксиэтилирования глицерина нашли применение в криобиологии [1], в фармации для получения эмульгаторов, в химической технологии [24], но их состав, молекулярно-массовое распределение изучены недостаточно [11].

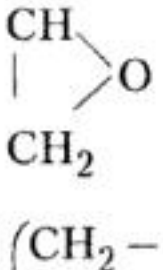
Внутренние эфиры глицерина (группа в), содержащие эпоксидное кольцо, нестабильны при хранении, весьма реакционноспособны, токсичны,

b) $CH_2 - ROH$ (R: $-OCH_2CH_2$)

$CH - ROH$

$CH_2 - ROH$

c) $CH_2 - OR$ (R: $-H, -C_nH_{2n+1}$)



d) $\left(\begin{array}{l} CH_2 - OH \\ | \\ CH - OH \\ | \\ CH_2 \text{——} \end{array}\right)_n - O$

Glycerol monoalkyl ethers of limited alcohols (group a) were found in vegetables' oils, in marine animals' tissues, the highest concentration — in animals' bone marrow [24]. The ethers, isolated from the oils of sharks' liver are comparable with a penecillin by an antimicrobic effect. In [23] the study results of the ratio between the structure of substances, toxicity and a central depressant action in animals in the series of glycerol α-substituted ethers are cited. Some of them are applied in food industry as the solvents of flavouring substances [14]. Monoalkyl ethers of glycerol do not hydrolyze, practically have no odour, are stable during the storage and physiologically harmless.

The inferior dialkyl ethers of glycerol (dimethyl, diethyl ones) have no natural analogues. But they are applied as initial products in organic synthesis, pharmaceutical industry [14]. The mentioned above ethers are water-soluble and are good solvents for organic products. The superior di- and trialkyl ethers possess a limited solubility in a water [24].

Another way of glycerol modification when transforming into alkoxy substituted compounds ones is the introduction of ethoxy-groups into its molecule (group b substances). The literature data testify, that the oxyethylation of different classes of chemical substances up to a certain molecular mass decreases their toxicity [14] and improves cryoprotective properties [1]. The products of glycerol oxyethylation are applied in cryobiology [1], in pharmacy for emulsifying agents obtaining, in chemical technology [24], but their composition, molecular and mass distribution are insufficiently studied [11].

Glycerol inner ethers (group c), containing an epoxy ring, are not stable during storage, are highly capable to react, toxical, at a repeated contact cause an inflammation of a cutaneous integument [14].

Glycerol own ethers (group d) — polyglycerols of different polymerization degree (n), are used as biologically soft surface-active substances, like an immobile phase for gas-liquid chromatography [2]. Poly-



Матеріал, захищений авторським правом

при повторном контакте вызывают воспаление кожного покрова [14].

Собственные эфиры глицерина (группа г) — полиглицерины различной степени полимеризации ($n$) — используют в виде биологически мягких поверхностно-активных веществ как неподвижную фазу для газожидкостной хроматографии [2]. Полиглицерин — промышленный продукт — представляет собой сложную смесь гомологов по молекулярной массе и изомеров по структуре. В воде полиглицерины практически не растворяются, за исключением диглицерина.

Другие возможные производные глицерина, содержащие галогены, ароматические и карбоксильные группы, не рассматривались, так как не удовлетворяли общие требования, предъявляемые к криопротекторам [17]. С учетом имеющегося литературного материала по свойствам и применению алкоксипроизводных глицерина в медицине, фармакологии, пищевой и химической промышленности для испытаний на различных биологических объектах были отобраны следующие производные глицерина: низшие моно- и диалкиловые эфиры, этоксигидроксисоединения, диглицерин и глицидол.

Описания методов получения эфиров глицерина приведены: 1-монометилового (1-ММЭГ), 1-моноэтилового (1-МЭЭГ), 1-монопропилового (1-МПЭГ), 1,3-диметилового (1,3-ДМЭГ), 1,2- и 1,3-диэтиловых (1,2- и 1,3-ДЭЭГ) эфиров глицерина — в [19], 1-моноэтоксиглицерина (1-МЭГ) и 1,3-диэтоксиглицерина (1,3-ДЭГ) — в [26]; 1,1-диэтоксиглицерина (1,1-ДЭГ) — в [4]. 1,2-диметиловый эфир глицерина (1,2-ДМЭГ), глицидол, диглицерин — промышленные продукты, очищенные фракционной перегонкой в вакууме. Для идентификации полученных веществ сравнивались показатели преломления $n_d^{20}$ и плотности $d_4^{20}$ с литературными данными. Чистоту веществ контролировали методом газожидкостной хроматографии; 1,1,1-триэтоксиглицерин (1,1,1-ТЭГ) был выделен фракционной перегонкой продукта оксиэтилирования глицерина (ОЭГ) $n = 3$, полученного по методу [9]. Для доказательства структуры и степени чистоты веществ был использован метод гель-проникающей хроматографии (ГПХ) [10]. Продукт ОЭГ со средней степенью полимеризации $n = 5$ получен по методу [9]. Состав, молекулярно-массовое распределение ОЭГ определяли с помощью ГПХ [11]. В таблице приведены структурные формулы с важнейшими физико-химическими константами исследуемых алкоксизамещенных глицерина, данные о степени токсичности этих веществ по среднесмертельным дозам (ЛД-50) (некоторые из них представлены в [19]).

Все рассмотренные вещества по степени токсичности относятся к классу малотоксичных, показатель токсичности ЛД-50 изменяется незначительно. Наличие эпоксидного кольца и наращивание числа и размера алкильных радикалов в молекуле

glycerol, an industrial product, is a complex mixture of homologs according to a molecular mass and isomers in a structure. Polyglycerols are not practically dissolved in water, excepting diglycerol.

Other possible glycerol derivatives, containing halogens, aromatic and carboxylic groups were not considered, because they did not satisfy common requirements, maked regarding the cryoprotectants [17]. Taking into account the available literature material on properties and application of glycerol alkoxy derivatives in medicine, pharmacology, food and chemical industry for testing in different biological objects the following glycerol derivatives were selected: inferior mono- and dialkyl ethers, ethoxy hydroxy-compounds, diglycerol and glycedol.

The descriptions of the methods for obtaining such glycerol ethersare shown: 1-monomethyl (1-MMEG), 1-monoethyl (1-MEEG), 1-monopropyl (1-MPEG), 1,3-dimethyl (1,3-DMEG), 1,2- and 1,2-diethyl (1,2- and 1,3-DEEG) glycerol ethers are given in [19]; 1-monoethoxyglycerol (1-MEG) and 1,3-diethoxyglycerol (1,3-DEG) — in [26], 1,1-diethoxyglycerol (1,1-DEG) in [4], 1,2 dimethyl glycerol ether (1,2-DMEG), glycidol, diglycerol are industrial products, purified by means of a fractional distillation in a vacuum. To identify obtained substances, the refraction $n_d^{20}$ and density $d_4^{20}$ indices were compared with the literature data. Substance purity was controlled by means of the method of gas and liquid chromatography; 1,1,1-triethoxyglycerol (1,1,1-TEG) was separated by means of fractional distillation of the glycerol oxyethylation product (GOP), $n = 3$, obtained by the method [9]. To prove a purity structure and degree of substances, the method of gel-penetrating chromatography (GPC) [10] was used. GOP product with an average polymerization degree $n = 5$ was obtained by means of the method [9]. A content, molecular and mass redistribution of GOP was measured by means of GPC [11]. Structural formulae with important physical and chemical constants of studied glycerol alkoxy substituted substances, data about the toxicity degree of these substances according to average lethal doses (LD-50) are demonstrated in the Table. (some of them are given in the [19]).

All described substances by the toxicity degree are related to a slightly toxic class, the LD-50 toxicity index changes insignificantly. The presence of an epoxy ring and the augmentation of number and size of alkyl radicals in a glycerol molecule results in an increase of a toxicity index. When introducing ethoxy groups by means of an individual synthesis or glycerol oxyethylation, the products with a less manifested toxicity in comparison with glycerol, were obtained.

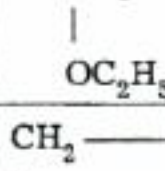
A wide usage of glycerol in cryobiology, a careful investigation of physical and chemical parameters of glycerol derivatives and their aqueous solutions [10], as well as the influence of a structural factor in a molecule on a cryoprotective effect conditioned a great attention of researchers from the Institute for



Матеріал, захищений авторським правом

**Важнейшие константы алкоксизамещенных глицерина**

**The most important constants of alkoxy substituted of glycerol**

| Название вещества<br>Name of substance | Структурная формула<br>Structural formula | Мол. масса<br>Mol. mass | $T_{кип}$, °C/мм рт.ст.<br>$T_{boil}$, °C/mm of mercury coloumn | $d_4^{20}$, г/см$^3$<br>$d_4^{20}$, g/cm$^3$ | $n_d^{20}$ | ЛД-50, мм/кг<br>LD-50, mm/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Глицерин<br>Glycerol | $CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2OH$ | 92 | 290/760 | 1,2613 | 1,4740 | 75,0 |
| 1-ММЭГ<br>1-MMEG | $CH_2(OCH_3)-CH(OH)-CH_2OH$ | 106 | 92–93/5 | 1,1169 | 1,4444 | 84,0 |
| 2-ММЭГ<br>2-MMEG | $CH_2(OH)-CH(OCH_3)-CH_2OH$ | 106 | 109–110/4 | 1,1311 | 1,4480 | 77,9 |
| 1-МЭЭГ<br>1-MEEG | $CH_2(OC_2H_5)-CH(OH)-CH_2OH$ | 120 | 87–88/4 | 1,0644 | 1,4422 | 68,3 |
| 1-МПЭГ<br>1-MPEG | $CH_2(OC_3H_7)-CH(OH)-CH_2OH$ | 134 | 97–98/5 | 1,0255 | 1,4422 | 41,9 |
| 1,3-ДМЭГ<br>1,3-DMEG | $CH_2(OCH_3)-CH(OH)-CH_2(OCH_3)$ | 120 | 92/40 | 1,0080 | 1,4200 | 74,2 |
| 1,2-ДМЭГ<br>1,2-DMEG | $CH_2(OCH_3)-CH(OCH_3)-CH_2OH$ | 120 | 105/45 | 1,0199 | 1,4206 | 18,3 |
| 1,3-ДЭЭГ<br>1,3-DEEG | $CH_2(OC_2H_5)-CH(OH)-CH_2(OC_2H_5)$ | 148 | 108/60 | 0,9510 | 1,4210 | 48,0 |
| 1,2-ДЭЭГ<br>1,2-DEEG | $CH_2(OC_2H_5)-CH(OC_2H_5)-CH_2OH$ | 148 | 114/60 | 0,9512 | 1,4212 | 24,3 |
| 1-МЭГ<br>1-MEG | $CH_2(OCH_2CH_2OH)-CH(OH)-CH_2OH$ | 136 | 149–150/3 | 1,2055 | 1,4720 | 86,8 |
| 1,3-ДЭГ<br>1,3-DEG | $[CH_2(OCH_2CH_2OH)]_2-CH(OH)$ | 180 | 159–160/1,5 | 1,1717*** | 1,4640*** | 46,1 |
| 1,1-ДЭГ<br>1,1-DEG | $CH_2[(OCH_2CH_2)_2OH]-CH(OH)-CH_2OH$ | 180 | 155–156/0,4 | 1,1916 | 1,4734 | 82,2 |
| 1,1,1-ТЭГ<br>1,1,1-TEG | $CH_2[(OCH_2CH_2)_3OH]-CH(OH)-CH_2OH$ | 224 | 190–195/4 | 1,1684 | 1,4724 | 85,7 |
| ОЭГ $n=5$<br>OEG $n=5$ | Глицерин + 5·$OCH_2CH_2$<br>Glycerol + 5·$OCH_2CH_2$ | 305* | — | 1,1782 | 1,4700 | 40,0 |
| Глицидол<br>Glycidol |  | 74 | 34/4 | 1,1143 | 1,4334 | 9,6 |
| Диглицерин<br>Diglycerol | $O[CH_2-CH(OH)-CH_2OH]_2$ | 166 | 160–170/0.6 | 1,3215 | 1,4806 | 3,02** |

**Примечания**: * — среднечисловая молекулярная масса по данным жидкостной хроматографии; ** — ЛД-50 смеси, содержащей 30% диглицерина и 70% глицерина; *** — температура плавления вещества 39 °С, в таблице приведены данные при 40 °С.

**Notes**: * — an average molecular mass according to a liquid chromatography; ** — LD-50 of the mixture containing 30% of diglycerol and 70% of glycerol; *** — the temperature of substance melting is 39 °C, in the Table data given at 40 °C.



Матеріал, захищений авторським правом

глицерина приводят к увеличению показателя токсичности. При введении этоксигрупп индивидуальным синтезом либо оксиэтилированием глицерина получили продукты с менее выраженной токсичностью по сравнению с глицерином.

Широкое использование глицерина в криобиологии, тщательное исследование физико-химических параметров производных глицерина и их водных растворов [10], влияния структурного фактора в молекуле на криозащитный эффект обусловили пристальное внимание исследователей ИПКиК НАН Украины к изучению криозащитных свойств его алкоксизамещенных при низкотемпературном консервировании биологических объектов. При этом немалое место отводилось исследованию цитотоксического действия веществ на этапе эквилибрации.

Наиболее полно было изучено влияние алкоксизамещенных глицерина на цитотоксичность и криопротекторную активность при замораживании тромбоцитов человека [8, 13, 21]. Было установлено, что характер взаимодействия и степень влияния алкиловых эфиров глицерина на морфофункциональную полноценность тромбоцитов определяются структурой изучаемых соединений, а также их концентрацией в растворе. Информативными показателями *in vitro*, характеризующими морфофункциональную полноценность тромбоцитов, являются сохранность реакции на гипотонический шок — показателя, коррелирующего с приживаемостью *in vivo* [25], а также ретракции и способности к АДФ-индуцированной агрегации — показателей, характеризующих гемостатическую активность тромбоцитов [18]. Из 7 изученных алкиловых эфиров глицерина наименее выраженное влияние на специфические функции тромбоцитов в исследуемом диапазоне концентраций (2,5-7,5%-е конечные концентрации) оказывают глицерин и 1-ММЭГ. Такие показатели, как общее количество клеток и ретрактильная активность находились на достаточно высоком уровне (15–60 мин). Наблюдалось достоверное снижение степени реакции на гипотонический шок и агрегации с увеличением концентраций веществ от 5 до 7,5%, при этом время экспозиции не было значимым. С увеличением числа и длины алкильных радикалов цитотоксичность веществ возрастала и наиболее выраженное подавляющее действие на специфические функции тромбоцитов оказывали растворы, содержащие 2,5-7,5%-е конечные концентрации веществ: 1,2- и 1,3-ДМЭГ, 1,2- и 1,3-ДЭЭГ. При этом существенное значение имело расположение радикалов: более токсическими оказались вещества с местом расположения радикалов в положении 1, 2. Использование 5-7,5%-х концентраций этих веществ в растворе вызывало необратимое подавление специфических функций тромбоцитов. При исследовании криопротекторных свойств алкиловых эфиров глицерина в отношении тромбоцитов наблюдалась та

Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine to study cryoprotective properties of its alkoxy substituted compounds at low-temperature preservation of biological objects. Thereat an investigation of a cytotoxic effect of substances at the stage of equilibration takes an important place.

The studying of glycerol alkoxy-substituted compounds effect on cytotoxicity and cryoprotectant activity during human platelets freezing was the most complete [8, 13, 21]. When investigating the cytotoxicity of alkyl ethers of glycerol it was established that the character and effect extent of these substances on morphological integrity of paltelets was determined by the structure of the compounds under study, as well as their concentration in the solution. Informative indices *in vitro*, characterizing morphofunctional integrity of platelets are the integrity of the reaction on hypotonic shock — the index, correlating with *in vivo* engraftment [25], as well as retraction and ability to ADP-induced aggregation — the indices, characterizing hemostatic activity of platelets [18]. Glycerol and 1-MMEG of 7 investigated alkyl ethers cause the less manifested effect on specific functions of platelets in the studied range of concentrations (2.5–7.5% final concentrations). Such indices as general cell number and retractile activity were at quite a high level (15–60 min). Significantly reliable decrease of the reaction degree on hypotonic shock and aggregation with an increase in the concentration of substances from 5 to 7.5% was observed, in this case the exposure time was insignificant. With the increase of the number and length of alkyl radicals the cytotoxicity of substances increases and the solutions, containing 2.5–7.5% final concentrations of the substances: 1,2- and 1,3-DMEG, 1,2- and 1,3-DEEG caused the most manifested suppressing effect on specific functions of platelets. Here the location of radicals was of the most significant value: more toxical occurred to be the substances with the radicals location in 1, 2 position. Application of 5–7.5% concentrations of these substances in the solution caused irreversible suppression of specific functions of platelets. When investigating cryoprotective properties of glycerol alkyl ethers in respect to platelets the same regularity as for cytotoxicity was found. We can recommend as perspective cryoprotectants of investigated glycerol alkoxy substituted ones for platelets the following ones: 1-MMEG and oxyethylated glycerol with an average degree of polymerization $n = 5$. Human platelet freezing with 5% concentration of MMEG allows to preserve main specific functions of platelets at quite a high level.

It is known, that when studying the character of cryoprotectant interaction with cells, cellular cultures, characterized by a high sensitivity to the effect of various factors of chemical and physical origin are an ideal test system. The results on the investigation of the effect of 1-MMEG, 1,3-DMEG, 1,2-DMEG,



Матеріал, захищений авторським правом

же закономерность, что и с цитотоксичностью. Как перспективные криопротекторы для тромбоцитов из исследуемых алкоксизамещенных глицерина можно рекомендовать 1-ММЭГ и оксиэтилированный глицерин со средней степенью полимеризации $n = 5$. Замораживание тромбоцитов человека с 5%-й концентрацией 1-ММЭГ позволяет сохранять основные специфические функции тромбоцитов на достаточно высоком уровне.

Известно, что при взаимодействии криопротектора с клетками идеальной тест-системой являются клеточные культуры, которые характеризуются высокой чувствительностью к действию разнообразных факторов химической и физической природы. В [5] представлены результаты по изучению действия 1-ММЭГ, 1,3-ДМЭГ, 1,2-ДМЭГ, 1,3-ДЭГ на морфофункциональные свойства перевиваемой ткани почки теленка. В [6] отмечается высокая криопротекторная активность перевиваемой культуры не только у 1-ММЭГ, но и у 1,3-ДЭГ. Наиболее высокий процент сохранных клеток при консервировании 2-суточной перевиваемой почки овцы получен с 5%-й концентрацией ОЭГ $n = 3$ [22]. Предложенный метод позволяет после размораживания получить до 92% восстановленных клеток.

Большое внимание исследованию криопротекторной активности алкоксизамещенных глицерина уделено при разработке методов консервирования репродуктивных клеток [12,15,16, 21]. Действие глицерина и его модифицированных молекул оценивалось по интегральным показателям жизнеспособности спермиев человека: характеру и продолжительности движения в средах, содержащих испытуемые растворы до и после замораживания. Цитотоксичность веществ определялась в динамике при инкубации клеток в испытываемой среде в течение 6 ч [15]. Результаты проведенных исследований показали, что наиболее выраженным токсическим действием обладают 1-МПЭГ и диалкиловые эфиры глицерина. Подвижность спермиев после их инкубации с этоксипроизводными 1-МЭГ, 1,1-ДЭГ, 1,1,1-ТЭГ снижалась монотонно и незначительно. Из полученных данных по изучению криозащитных свойств указанного биологического объекта следует, что для реализации криопротекторной эффективности соединений необходимы различные концентрации веществ (для 1-ММЭГ – 5%, для 1-МЭЭГ – 2,5% и для глицерина – 2,5% [15]; выживаемость при этом составляла для глицерина и 1-ММЭГ около 74%, для 1-МЭЭГ 34%). В [16] отмечаются длительная (в течение многих часов) переживаемость спермиев человека в средах с ОЭГ низкой степени полимеризации ($n = 2, 3$), а также достаточно высокая выживаемость после криоконсервирования спермиев под защитой этих соединений.

При тестировании простых эфиров глицерина на гипотермическое хранение (5 °С) двухклеточных эмбрионов мышей в среде Дюльбекко, содер-

1,3DEG on morphofunctional properties of recultured calf kidney are presented in [5]. After estimation of cryoprotective activity of these substances the authors [6] noted a high cryoprotective activity of recultured medium not only in 1-MMEG, but in 1,3-DEG. The most high percentage of preserved cells during preservation of 2 days recultured sheep kidney was obtained with 5% concentration of OEG $n = 3$ [22]. Proposed method permits after thawing to reach 92% of recovered cells.

During the development of cryopreservation methods of reproductive cells a great attention was paid to the study of the activity of glyceol alkoxy-substituted compounds in [12, 15, 16, 22]. The glycerol effect and its modified molecules were evaluated on integral indices of human spermatozoa vaibility: the character and duration of motility in the media, containing studied solutions before and after freezing. Cytotoxicity of the substances was defined by the dynamics during incubation of cells in tested medium within 6 hrs [15]. The results of the investigations showed that 1-MPEG and dialkyl ethers of glycerol possess the most manifested toxic effect. The motility of spermatozoa after their incubation with ethoxy-derivatives 1-MEG, 1,1-DEG, 1,1,1-TEG decreased monotonously and insignificantly. The data obtained by authors on the study of cryoprotective properties with mentioned biological object show, that to realize cryoprotective efficiency of compounds different concentration of substances (for MMEG – 5%, for 1-MEEG – 2.5% and for glycerol – 2.5%) [15] are necessary, in this case the viability made about 74% for glycerol and 1-MMEG, and 34% for 1-MEEG). Long-term (within many hours) human spermatozoa survival was found [16] in media with OEG of low polymerization degree ($n = 2, 3$) and the viability after cryopreservation of spermatozoa under the protection of these compounds was at quite a high level.

When testing common ethers of glycerol on hypothermic storage (5 °C) two-cells' mice embryos in Dulbecco medium, containing serum albumin and cryoprotective agent, 1-MMEG [3] occurred to be the most effective.

Thus presented comparative results of the study of the effect of glycerol alkoxy-substituted compounds on different biological objects demonstrated, that in spite of specific peculiarities of biological objects and their cryopreservation conditions in given series of compounds a common character of changes of cryoprotective activity is observed. With an increase in the number and size of alkyl radicals in the mentioned series an acute cytotoxicity rised and thereat cryoprotective activity reduces. To the most perspective cryoprotectants we can reffer monoalkyl erthers of glycerol (methyl, ethyl) and ethoxy-hydroxy-derivatives of glycerol (1-MEG, 1,1-DEG, 1,3-DEG, OEG $n = 3$, OEG $n = 5$).



Матеріал, захищений авторським правом

жащей сывороточный альбумин и криозащитный агент, наиболее эффективным оказался 1-МЭЭГ [3].

Таким образом, представленные сравнительные результаты изучения действия алкоксизамещенных глицерина на различные биологические объекты показали, что, несмотря на их специфические особенности и условия криоконсервирования, в данном ряду соединений наблюдается общий характер изменения криопротекторной эффективности. С увеличением числа и размера алкильных радикалов в рассмотренном ряду соединений нарастает острая цитотоксичность и при этом снижается криопротекторная активность. К наиболее перспективным криопротекторам следует отнести низшие моноалкиловые эфиры глицерина (метиловый, этиловый) и этоксигидроксипроизводные глицерина: индивидуальные и продукты оксиэтилирования глицерина (1-МЭГ, 1,1-ДЭГ, 1,3-ДЭГ, ОЭГ $n = 3$, ОЭГ $n = 5$).

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Актуальные* проблемы криобиологии / Под общ. ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981.– 608 с.
2. *Аллабердиев Х., Кованько Ю.* Полиглицерин — термостойкая неподвижная фаза для препаративной газожидкостной хроматографии // Журн. прикладной химии.– 1987.– № 6.– С. 1327–1331.
3. *Белоус А.М., Шраго М.И., Пушкарь Н.С.* Криоконсерванты.– Киев: Наук. думка, 1979.– 198 с.
4. *Бронштейн В.Л., Бидный С.Ю., Кулешова Л.Л., Кощий С.В.* Диаграмма состояния бинарной системы 1,1-ди-(β′-гидроксиэтокси)-2,3-пропандиол–вода // Криобиология.– 1988.– № 2.– С. 51–52.
5. *Верховская Л.З., Карташов В.Ф., Кощий С.В. и др.* Действие алкоксизамещенных глицерина на морфофункциональные свойства перевиваемой культуры клеток // Криобиология.– 1990.– № 1.– С. 30–34.
6. *Верховская Л.З., Карташов В.Ф., Кощий С.В. и др.* Криозащитная активность алкоксизамещенных глицерина // Криоконсервирование клеток и тканей: Сб. науч. тр.– Харьков, 1988.– С. 8–15.
7. *Глузман М.Х., Башура Г.Ф., Сагарашвили Г.В.* Поверхностные вещества в фармации.– Тбилиси: Мецниереба, 1972.– 230 с.
8. *Компаниец А.М., Николенко А.В., Кощий С.В. и др.* Монометиловый эфир глицерина: цитотоксичность и криозащитная эффективность при замораживании тромбоцитов // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов: Сб. науч. тр.– Киев: Наук. думка, 1990.– С. 59–63.
9. *Кочуровская Г.Г., Матвиец Н.М., Лубяный В.Г.* Некоторые аспекты оксиэтилирования полиолов // Криобиология и криомедицина.– 1977.– № 3.– С. 76–78.
10. *Кощий С.В.* Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина (синтез, физико-химические свойства): Автореф. дис. ... канд. хим. наук.– Харьков, 1992.– 22 с.
11. *Кощий С.В., Ханина Л.А., Атовмян Е.Г.* Жидкостная хроматография продуктов оксиэтилирования глицерина // Тез. докл. VI Всесоюз. симп. по мол. жидк. хроматографии.– Алма-Ата.– 1987.– С. 234.
12. *Лучко Н.А.* Вплив умов понадшвидкого охолодження на морфофункціональні властивості сперміїв та эмбріонів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.– Харків, 1997.– 43 с.
13. *Николенко А.В., Компаниец А.М., Луговой В.И.* Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов // Пробл. криобиологии.– 1995.– № 4.– С. 36–40.


## REFERENCES


1. *Actual* problems of cryobiology / Ed. by N. S. Pushkar, A. M. Belous.– Kiev: Naukova Dumka, 1981.– 608 p.
2. *Allaberdiyev Kh., Kovan'ko Yu.* Polyglycerol — thermostable immotile phase for preparative gas-liquid chromatography // J. of Applied Chemistry.– 1987.– № 6.– P. 1327–1331.
3. *Belous A.M., Shrago M.I., Pushkar N.S.* Cryopreservatives.– Kiev: Naukova Dumka, 1979.– 198 p.
4. *Bronstein V.L., Bidny S. Yu., Kuleshova L.L., Koschiy S.V.* Diagram of the state of binary system of 1,1-di-(β′-hydroxyethoxy)-2,3-propanediol-water // Kriobiologia.– 1988.– № 2.– P. 51–52.
5. *Verhovskaya L.Z., Kartashov V.F., Koschiy S.V. et al.* The effect of glycerol alkoxy-substituted on morphological properties of recultured cell culture // Kriobioloia.– 1990.– № 1.– P. 30–34.
6. *Verhovskaya L.Z., Kartashov V.F., Koschiy S.V. et al.* Cryoprotective activity of glycerol alkoxy substituted // Cryopreservation of cells and tissues: Coll. of scientific works.– Kharkov, 1988.– P. 8–15.
7. *Gluzman M.Kh., Bashura G.F., Sagarashvili G.V.* Surficial substances in pharmacy.– Tbilisi, 1972.– 230 p.
8. *Kompaniets A.M., Nikolenko A.V., Koschiy S.V. et al.* Monomethyl ethers of glycerol: cytotoxicity and cryoprotective efficiency during freezing of platelets // Physical and chemical properties and biological effect of cryoprotectants: Coll. of scientific works.– Kiev: Naukova Dumka, 1990.– P. 59–63.
9. *Kochurovskaya G.G., Matviets N.M., Lubyany V.G.* Some aspects of oxyethylation of polyols // Cryobiology and cryomedicine.– 1977.– № 3.– P. 76–78.
10. *Koschiy S.V.* Cryoprotectants of glycerol alkoxy-substituted substances (synthesis, physical and chemical properties): Author's abstract for obtaining PhD thesis (chemistry).– Kharkov, 1992.– 22 p.
11. *Koschiy S.V., Khanina L.A., Atovmyan E.G.* Liquid chromatography of glycerol oxyethylation products // Abstracts of the reports of VI All-Union Symposium on Molecular Liquid Chromatography.– Alma-Ata.– 1987.– P. 234.
12. *Luchko N.A.* The effect of conditions of ultra-rapid cooling on morphofunctional properties of spermatozoa and embryos: Author's abstract for obtaining the degree of Doctor of biological sciences.– Kharkov, 1997.– 43 p.
13. *Nikolenko A.V., Kompaniyets A.M., Lugovoy V.I.* Polyol and their derivatives cryoprotective properties during platelets freezing // Probl. of Cryobiology.– 1995.– № 4.– P. 36–40.
14. *Paken A.M.* Epoxy compounds and epoxy resins.– L.: Goskhimizdat, 1962.– 963 p.
15. *Paraschuk Yu.S., Shrago M.I., Kalugin Yu.V. et al.* A comparative estimation of cytotoxicity and cryoprotective efficiency of glycerol and its alkyl ethers during human spermatozoa freezin // Kriobiologiya.– 1989.– № 1.– P. 40–43.
16. *Paraschuk Yu.S., Grischenko V.I., Kalugin Yu.V. et al.* Effect of different cryopreservation conditions on human spermatozoa survival // Kriobiologiya.– 1985.– № 4.– P. 22–28.
17. *Pushkar N.S., Belous A.M., Shrago M.I.* Introduction into cryobiology.– Kiev: Nauk. Dumka, 1975.– 343 p.
18. *Samal A.B., Cherenkevich S.N.., Khmara N.D.* Platelet aggregation: study methods and mechanisms.– Minsk, 1990.– P. 7–21.
19. *Shrago M.I., Koschiy S.V., Guchok V.M. et al.* Interaction of a structure and indices of cryoprotectants toxicity in the series of glycerol substituted substances // Cryopreservation of cells and tissues: Collection of sci. works.– Kharkov.– P. 3–8.
20. *Patent* 16856 Ukraine, MPK$^5$ A 01/02. The way of mammalian embryo preservation / V. I. Grischenko, N. A. Luchko, Yu. V. Kalugin, S. V. Koschiy, L. A. Khanina.– Published 29.08.97. Bull. № 4.
21. *Patent* 13708 Ukraine MPK$^4$ C 07 C 31/22; C 07 C 43/02, A 01 N1/02. Cryoprotectant / M. I. Shrago, L. A. Khanina, S. V. Koschiy et al.– Published 25.04.97. Bull. № 2.





Матеріал, захищений авторським правом

14. *Пакен А.М.* Эпоксидные соединения и эпоксидные смолы.– Л.: Госхимиздат, 1962.– 963 с.
15. *Паращук Ю.С., Шраго М.И., Калугин Ю.В. и др.* Сравнительная оценка цитотоксичности и криозащитной эффективности глицерина и его алкиловых эфиров при замораживании спермиев человека // Криобиология.– 1989.– № 1.– С. 40–43.
16. *Паращук Ю.С., Грищенко В.И., Калугин Ю.В. и др.* Влияние различных условий криоконсервирования на выживаемость спермиев человека // Криобиология.– 1985.– № 4.– С. 22–28.
17. *Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Шраго М.И.* Введение в криобиологию.– Киев: Наук. думка, 1975.– 343 с.
18. *Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Д.* Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы.– Минск, 1990.– С. 7–21.
19. *Шраго М.И., Кощий С.В., Гучок В.М. и др.* Взаимосвязь структуры и показателей токсичности криопротекторов в ряду замещенных глицерина // Криоконсервирование клеток и тканей: Сб. науч. тр.– Харьков, 1989.– С. 3–8.
20. *А.с. 1298203* СССР, МКИ С 07 С 31/22; 43/02, А 01 1/02. Криопротектор / М. И. Шраго, Л. А. Ханина, С. В. Кощий и др.– № 3929038/28-14; Заявлено 12.07.85; Опубл. 23.03.87, Бюл. № 11.– 4 с.
21. *Пат.* 16856 Украина, МПК$^5$ А 01/02. Способ консервирования эмбрионов млекопитающих / В. И. Грищенко, Н. А. Лучко, Ю. В. Калугин, С. В. Кощий, Л. А. Ханина.– Опубл. 29.08.97. Бюл. № 4.
22. *Пат. 7845 Украина, МПК$^4$* А 01 N1/00. Среда для консервирования клеточных культур / М. И. Шраго, Л. А. Ханина, Ю. В. Калугин и др.– Опубл. 26.12.95. Бюл. № 4.
23. *Berger F.* The relationship between chemical structure and central depressant action of a-substituted ethers of glycerol // J. Pharmac. and Exp. Therap.– 1948.– 93.– P. 470–481.
24. *Edgar S.* Glyceryl ethers. A review // Manuf. Chem. and Aerosol News.– 1981.– 52б № 10.– P. 63–65.
25. *Fijnheer R., Pietersz R., de Lorte D.* Monitoring of platelets morphology during storage of platelet concentrates // Transfusion.– 1989.– 29б № 1.– P. 36–40.
26. *Kharasch M. and Nudenberg.* Condensation of epichlorhydrin with ethylene glycol // J. Org. Chem.– 1943.– № 8.– P. 189–193.
27. *Shuff-Werner P., Miler U.* A new agent for the cryopreservation of mononuclear cells // Cryobiology.– 1988.– 25.– P. 487–491.

Поступила 11.12.98

22. *Patent* 7845 Ukraine, MPK$^4$ A 01 N1/00. The medium for cellular culture preservation / M. I. Shrago, L. A. Khanina, Yu. V. Kalugin et al.– Published 26.12.95. Bull. № 4.
23. *Berger F.* The relationship between chemical structure and central depressant action of a-substituted ethers of glycerol // J. Pharmac. and Exp. Therap.– 1948.– 93.– P. 470–481.
24. *Edgar S.* Glyceryl ethers. A review // Manuf. Chem. and Aerosol News.– 1981.– 52б № 10.– P. 63–65.
25. *Fijnheer R., Pietersz R., de Lorte D.* Monitoring of platelets morphology during storage of platelet concentrates // Transfusion.– 1989.– 29б № 1.– P. 36–40.
26. *Kharasch M. and Nudenberg.* Condensation of epichlorhydrin with ethylene glycol // J. Org. Chem.– 1943.– № 8.– P. 189–193.
27. *Shuff-Werner P., Miler U.* A new agent for the cryopreservation of mononuclear cells // Cryobiology.– 1988.– 25.– P. 487–491.

Accepted in 11.12.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.4: 57.089.36: 57.086.13

UDC 615.361.014.4: 57.089.36: 57.086.13

# Криоконсервирование тестикулярной ткани плодов человека и создание низкотемпературного банка для последующего использования в клинической трансплантологии

В. А. КЕРОС

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

# Cryopreservation of Human Fetus Testicular Tissue and Low Temperature Bank Creation for Further Application in Clinical Transplantology

V. A. KEROS

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

Трансплантация фетотестикулярной ткани человека является эффективным стимулятором регенерации поврежденного семенника у больных с различными формами гипогонадизма. Разработан метод криоконсервирования ткани плодового яичка, при котором сохраняются морфофункциональные характеристики изучаемого биообъекта. Оценена жизнеспособность криоконсервированных тестисов, полученных от плодов 16–27 недель гестации и с ишемией до и после 6 ч.

Трансплантація фетотестикулярної тканини людини є ефективним стимулятором регенерації ушкодженого сім'яника у хворих з різними формами гіпогонадизму. Розроблено метод кріоконсервування тканини плодового яєчка, при якому зберігаються морфофункціональні характеристики біооб'єкту, що вивчається. Оцінена життєздатність кріоконсервованих тестисів, які одержані від плодів 16–27 тижнів гестації і з ішемією до і після 6 год.

Transplantation of human fetotesticular tissue is an effective stimulator of regeneration of a damaged testis in patiens with different forms of hypogonadism. The cryopreservation method for fetal testes tissue, under which morphofunctional characteristics of studied bioobject are preserved. The viability of cryopreserved testes, obtained from fetuses of 16–27 weeks pf gestation and with ischemia before and after 6 hrs was estimated.

Лечение мужского бесплодия — сложная и актуальная задача в андрологической практике. Одним из перспективных методов коррекции этой патологии, обусловленной снижением эндокринной функции половых желез у мужчин, является трансплантация тестикулярной ткани с онтогенетическим аспермато-генезом, так как пересаженные яички стимулируют или частично компенсируют функцию утраченных или поврежденных мужских гонад.

Цель работы — изучение влияния низких температур и криопротекторов на морфофункциональное состояние фетотестикулярной ткани человека (ФТТЧ), создание режима криоконсервирования и на его основе криобанка исследуемой ткани для дальнейшего клинического применения.

Материалом исследования служили фрагменты ткани семенников плодов мужского пола, полученных в результате прерывания беременности по социальным и медицинским показаниям в условиях гинекологического стационара (сроки гестации 16–27 недель).

В зависимости от срока гестации полученные фетальные тестисы были разделены на три группы:

The treatment of male infertility is a complicated and actual task in andrological practice. One of the perspective methods for the correction of this pathology, stipulated by a reduction of endocrinic function of male sexual glands, is a testicular tissue transplantation with an ontogenetic aspermatogenesis, since the transplanted testes stimulate or partially compensate the function of lost or damaged male gonads. The aim of this work is to study the low temperature and cryoprotectant effect on morphofunctional state of human fetotesticular tissue (HFT), creation of the cryopreservation regimen and on its base of the cryobank of studied tissue for further clinical application.

The fragments of testes tissue of male fetuses, obtained in the result of pregnancy interruption according to social and medical indications under conditions of gynaecological in-patient's treatment (gestation terms were 16–27 weeks) served as the material for this study. Depending on gestation term, obtained fetal testes were divided into three subgroups: the first one — 16–20 weeks, the second one — 25–27 weeks, the third one — 25–27 weeks of intrauterine develop-



Матеріал, захищений авторським правом

первая — 16–20 недель, вторая — 21–24 недели, третья — 25–27 недель внутриутробного развития. В каждой возрастной группе были изучены семенники с ишемией до и после 6 ч.

При помощи метода дифференциальной тензодилатометрии [2] объемных процессов, происходящих в ткани семенников в процессе замораживания–оттаивания, были разработаны оптимальные условия криоконсервирования ФТТЧ: 30-минутная экспозиция фрагментов ткани в 0,7 моль раствора диметилсульфоксида (ДМСО) с дальнейшим 3-этапным замораживанием и погружением в жидкий азот (–196 °С).

При изучении морфологической структуры ФТТЧ после криоконсервирования было отмечено, что особенно выражены изменения в ткани в первые минуты после смерти плода. Это, по-видимому, обусловлено не только действием лекарственных препаратов и ишемии, но и резким снижением температуры. В тканях интенсифицируется катаболизм, продукты распада не утилизируются охлажденным организмом и наступает интоксикация клеток. Однако через 2 ч подобные изменения в ткани отсутствуют, что, вероятно, связано с запуском механизмов адаптации к действию пониженных температур и включением репарационных процессов. При увеличении ишемии до 10–20 ч изменения в ткани усугубляются и приобретают необратимый характер, что объясняется повышением активности окислительно-восстановительных ферментов при гипотермическом хранении. По мере развития аутолитических процессов происходит дезинтеграция внутриклеточных структур и проявляется цитотоксическое действие повреждения [4]. Десятичасовая ишемия тестисов приводит к деструктивным изменениям клеточных мембран, отслоению фибробластов от стенок семенных канальцев, деструкции хроматина.

Как следует из данных [4], при гипотермическом хранении тканей, богатых кровеносными сосудами, феномен повышения адаптированности клеток к внешним факторам, обеспечивающий сохранение биологических свойств в переживающих тканях, присущ всем системам и является отражением приспособительных реакций. Этот период адаптированности клеток фетального тестиса к действию гипотермии и отсутствию видимых морфологических изменений в ткани составляет 2–6 ч.

Исследования морфологии криоконсервированных по оптимальной программе с 0,7 моль ДМСО семенников различного гестационного периода и ишемией от 2-х до 6-и часов показали, что независимо от возраста плода, при соблюдении условий хранения до замораживания, ткань сохраняет структуру, характерную для нативных тестисов.

Функциональная полноценность ткани оценивалась по способности выделять тестостерон в культуральную среду клетками тестисов при органотипическом культивировании нативной ткани и

ment. In every age group the testes with an ischemia before and after 6 hrs were examined.

By means of the method of differential tensodilatometry [2] of volumetric processes, occuring in the testes tissue during the process of freeze-thawing the optimal conditions of HFT cryopreservation were developed: 30 min exposure of tissue fragments in 0.7 M of DMSO solution with following 3-stage freezing and immersion into a liquid nitrogen (–196 °C).

When studying the HFT morphological structure after cryopreservation it was noted, that the changes in tissue in the first minutes after fetus death are the most manifested. This, probably, is stipulated not only by the effect of medical preparations and ischemia, but also a sharp reduction in the temperature. In tissues a catabolism is intensified, the decay products are not utilized by a cooled organism and the intoxication of cells starts. However in 2 hrs such changes are absent in tissue, that probably is connected to the triggerring of adaptation mechanisms to the effect of lowered temperatures and triggering of reparation processes. When increasing an ischemia up to 10–20 hrs the changes in a tissue aggravate and gain an irreversible character, that is explained by a rise in the activity of oxidative-reductive enzymes during hypothermic storage. With the development of autolytic processes the desintegration of intracellular structures takes place and cytotoxic effect of a damage [4] is manifested. 10 hrs' testes ischemia results in destructive changes of cellular membranes, exfoliation of fibroblasts from the walls of testicular canaliculi, chromatine destruction.

According to the data [4] during hypothermic storage of tissues, rich with blood vessels, the phenomenon of an increase of cell adaptability to external factors, providing the preservation of biological properties in surviving tissues, is inherent to all systems and is the reflection of adaptive reactions. This period of adaptivity of fetal testis cells to hypothermia effect and the absence of visible morphological changes in tissue makes 2–6 hrs.

The investigations of morphology of cryopreserved testes of different gestational period and an ischemia from 2 to 6 hrs according to an optimal program with 0.7 M DMSO have shown, that independently on the fetus age when meeting the requirements of storage before freezing, the tissue preserves the structure, that is characteristic for native testes.

Tissue functional integrity was evaluated on the ability to release testosterone into a cultural medium by testes cells at organotypic culturing of native tissue and after cryopreservation. The testes of three determined age groups were examined. Native tissues of 16 weeks' fetus and human adult testes tissue, obtained during the sex-change operation, conducted on the patient's request and frozen according to an optimal program, were used as the control.

The methods for tissue culturing on an agar feeder in our modification were used [1, 3, 6, 7]. The novelty



Матеріал, захищений авторським правом

после криоконсервирования. Исследованию подвергались тестисы из выделенных трех возрастных групп. В качестве контроля использовались нативная ткань тестиса 16-недельного плода и ткань яичек взрослого человека, полученная во время операции по изменению пола, проведенной по просьбе пациента, и замороженная по оптимальной программе.

Была использована методика культивирования ткани на агаровой подложке (фидере) нашей модификации [1, 3, 6, 7]. Новизна данного метода заключалась в том, что в плотный фидерный слой можно было включать всевозможные добавки, которые могли быть источником как ростовых, так и гормональных факторов, необходимых для пролиферации и создания тестостерона *de novo* культивируемой тканью. В связи с этим была исследована гормональная активность тестисов, культивированных на агаре без добавления клеток гипофиза плодов 16-недельного возраста и имеющих в фидерном слое 100 тысяч нервных клеток.

На рис. 1 представлены данные содержания тестостерона в среде на 7-, 14- и 21-е сутки культивирования. По сравнению с тестисами взрослого человека количество тестостерона, выделяемого тканью тестиса 16-недельного плода, в несколько раз выше (0,86 ± 0,05 и 6,23 ± 0,17 нмоль/л на 1 мг ткани соответственно).

На 14-е сутки весь тестостерон, обнаруженный в пробе, по-видимому, был синтезирован *de novo* и выделен в среду в довольно большом количестве у плодовых тестисов (4,6 ± 0,09 нмоль/л на 1 мг ткани) и снизился почти в 2 раза в среде культивирования взрослого яичка (0,48 ± 0,02 нмоль/л на 1 мг ткани).

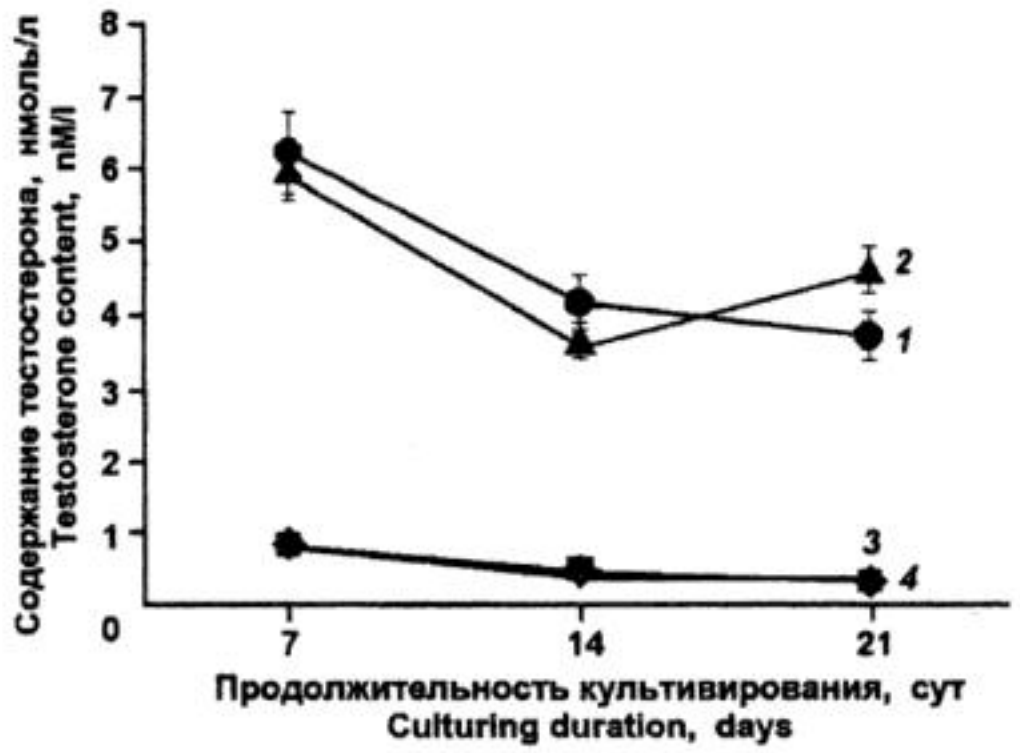



**Рис. 1.** Содержание тестостерона в среде культивирования нативных тестисов 16-недельного плода и взрослого человека: *1* — плодовые семенники (16 нед) без клеток гипофиза в фидере; *2* — плодовые семенники с фидером, содержащим клетки гипофиза; *3* — семенники взрослого мужчины без клеток гипофиза в фидере; *4* — семенники взрослого мужчины с фидером, содержащим клетки гипофиза.

**Fig. 1.** Testosterone content in the culturing medium of native testes of 16-weeks' fetus and human adult: *1* — fetus testes (16 weeks) without hypophysis cells in a feeder; *2* — fetus testes with a feeder, containing hypophysis cells; *3* — human adult testes without hypophysis cells in a feeder; *4* — human adult testes with a feeder, containing hypophysis cells.

of this method consisted in the fact, that different additives, being the source of both growth and hormonal factors, necessary for proliferation and creation of testosterone de novo by the tissue being cultured, can be added to the feeder layer. In this connection a hormonal activity of agar-cultured testes without adding the hypophysis cells of fetuses of 16 weeks' age and having 100 thousands nerve cells in a feeder layer, was studied.

Figure 1 presents the data on testosterone content in the medium for the 7th, 14th and 21st days of culturing. In comparison with the testes of human adult the quantity of testosterone, released by a tissue of 16 weeks' fetus is several times higher (0.86 ± 0.05 and 6.23 ± 0.17 nM/l per 1 tissue mg, correspondingly).

To the 14th day all testosterone, found in a sample, probably was synthesized de novo and released into the medium in quite a big quantity in fetus testes (4.6 ± 0.09 nM/l per 1 tissue mg) and reduced almost twice in the culturing medium of an adult testis (0.48 ± 0.02 nM/l per 1 tissue mg).

Fetus testes, agar-cultured with the addition of hypophysis cells, to the 7th day on the quantity of released testosterone did not statistically and significantly differ ($p > 0.05$) from initial ones (6.0 ± 0.16 nM/l per 1 tissue mg), to the 14th day the differences in indices were also not statistically true ($p > 0.05$), but to the 21st day the testosterone content increased and was statistically true higher ($p < 0.05$) than the values, obtained to the 14th day of culturing.

The quantity of testosterone, released by a human adult tissue to the 14th day reduced from 0.84 ± 0.03 down to 0.49 ± 0.2 nM/l and to the 21st day the hormone content significantly ($p < 0.05$) decreased (0.31 ± 0.04 nM/l).

After cryopreservation with 0.7 M DMSO concentration and 12.5% PEO-400 one according to an optimal program and long-term storage in a liquid nitro-

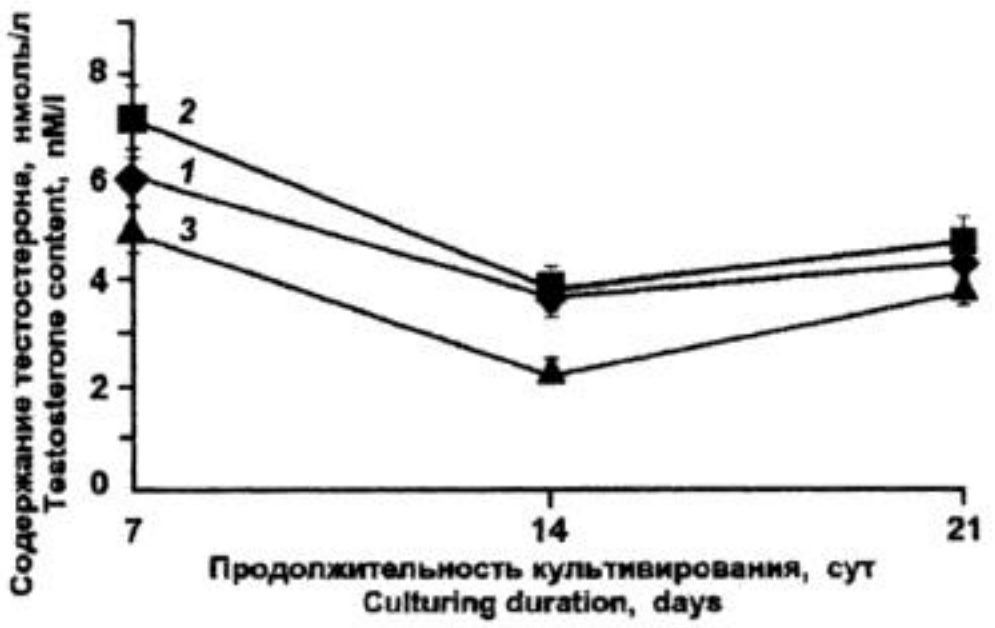



**Рис. 2.** Содержание тестостерона в среде культивирования тестисов плодов в сроки гестации 16–20 недель до и после криоконсервации с разными криопротекторами: *1* — нативная; *2* — ПЭО-400 (12%); *3* — ДМСО (5%).

**Fig. 2.** Testosterone content in the culturing medium of fetus testes in the gestation terms of 16–20 weeks before and after cryopreservation with different cryoprotectants: *1* — native; *2* — PEO-400 (12%); *3* — DMSO (5%)



Матеріал, захищений авторським правом

Тестисы плода, культивированные на агаре с добавлением клеток гипофиза, на 7-е сутки по количеству выделенного тестостерона достоверно не отличались ($p > 0,05$) от исходных ($6,0 \pm 0,16$ нмоль/л на 1 мг ткани), на 14-е сутки различия в показателях также были не достоверны ($p > 0,05$), однако на 21-е сутки содержание тестостерона увеличилось и было достоверно выше ($p < 0,05$) значений, полученных на 14-е сутки культивирования.

Количество тестостерона, выделенного тканью взрослого человека, на 14-е сутки снизилось с $0,84 \pm 0,03$ до $0,49 \pm 0,2$ нмоль/л, а на 21-е сутки содержание гормона достоверно ($p < 0,05$) снизилось ($0,31 \pm 0,04$ нмоль/л).

После криоконсервирования с 0,7 моль концентрацией ДМСО и 12,5%-й концентрацией ПЭО-400 по оптимальной программе и длительного хранения в жидком азоте размороженная ткань первой возрастной группы по выделению тестостерона в культуральную среду не отличалась от нативной при культивировании на фидере с добавлением нервных клеток.

Из рис. 2 видно, что самое большое содержание гормона в среде на 7-е сутки ($4,97 \pm 0,25$ нмоль/л), затем небольшое снижение на 14-е сутки ($2,33 \pm 0,43$ нмоль/л) и повышение на 21-е сутки ($3,86 \pm 0,37$ нмоль/л) в образцах, замороженных с ДМСО.

Аналогичную картину наблюдали при культивировании тестисов, замороженных с ПЭО-400, но исходное количество тестостерона в данном образце было выше, так как тестис был 18 недель гестации, а при консервировании с ДМСО – 16. Они относились к одной выделенной группе, но различие между ними было в длительности ишемии (при консервировании с ДМСО она составила 10 мин, с ПЭО – 2 ч), по-видимому, это и обусловило различие в количестве выделяемого гормона. Однако

gen a frozen-thawed tissue of the first age group on testosterone releasing into a cultural medium did not differ from native one during culturing on a feeder with nerve cells adding.

Figure 2 shows, that the highest hormone content in the medium is to the 7th day ($4.97 \pm 0.25$ nM/l), then there are a slight decrease to the 14th day ($2.33 \pm 0.43$ nM/l) and an increase to the 21st day ($3.86 \pm 0.37$ nM/l) in the samples, frozen with DMSO.

The same picture was observed when culturing testes, frozen with PEO-400, but an initial quantity of testosterone in a given sample was higher, since the testis was of 18 weeks' gestation term, and for DMSO it was of 16 weeks' one. They were referred to one isolated group, but the difference between them was in ischemia duration (during cryopreservation with DMSO it made 10 min, with PEO – 2 hrs), perhaps, this fact did stipulate the difference in the quantity of a released hormone. However the curve character was the same as for cryopreservation with DMSO.

In the second age group initial indices of testosterone release to the 7th day were lower, than in the first one (Fig. 3), but an increase in the release of hormones to the 14th and 21st days was not observed. In the third age group the testosterone content to the 7th day was statistically and significantly lower, than in the first two, to the 14th day the quantity of testosterone decreased and an increase in hormones in a cultural medium was also absent to the 21st day (Fig. 4).

Conducted investigations demonstrated, that the 16–20 weeks' gestation fetus testes tissue, frozen according to an optimal program, after freezing preserved the ability to synthesize testosterone within 21 days of culturing. Obtained by us data correspond to the results of the work [3], where in model animals it was shown, that Leydig cells could respond to gonadotropins and release testosterone in a culture at a high level for a long time, as well as respond by an

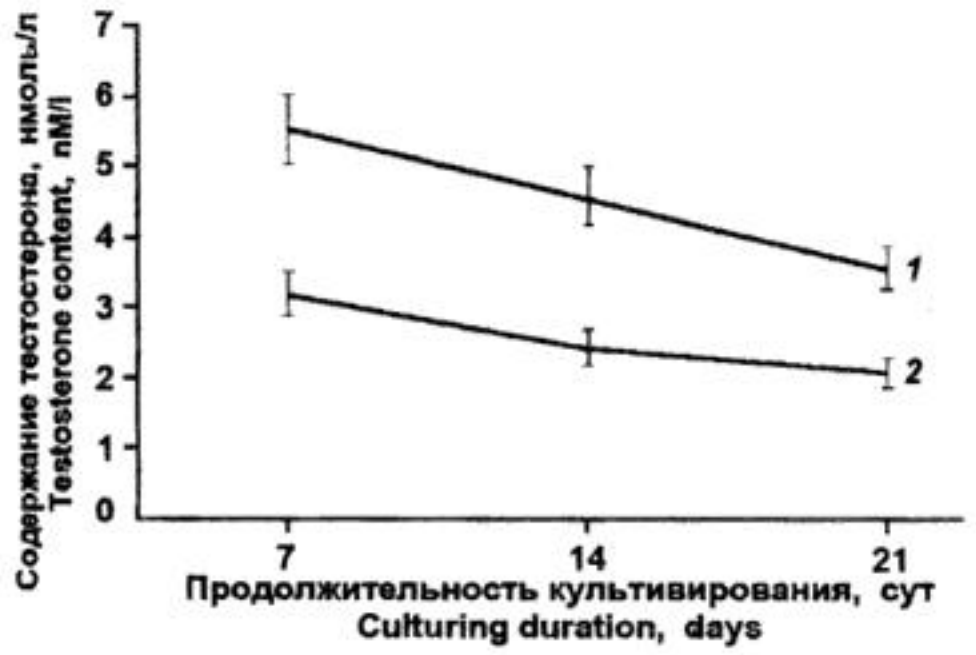



**Рис. 3.** Содержание тестостерона в среде культивирования тестисов плодов в сроки гестации 21–24 недели до и после криоконсервации с разными криопротекторами: *1* — ДМСО (5%); *2* — ПЭО-400 (12,5%).

**Fig. 3.** Testosterone content in the culturing medium of fetus testes in the gestation terms of 21–24 weeks before and after cryopreservation with different cryoprotectants: *1* — DMSO (5%); *2* — PEO-400 (12.5%).




**Рис. 4.** Содержание тестостерона в среде культивирования тестисов плодов в сроки гестации 25–27 недель до и после криоконсервации с разными криопротекторами: *1* — ДМСО (5%); *2* — ПЭО-400 (12,5%).

**Fig. 4.** Testosterone content in the culturing medium of fetus testes in the gestation terms of 25–27 weeks before and after cryopreservation with different cryoprotectants: *1* — DMSO (5%); *2* — PEO-400 (12.5%).



Матеріал, захищений авторським правом

характер кривой такой же, как и при консервировании с ДМСО.

Во второй возрастной группе исходные показатели выделения тестостерона на 7-е сутки были ниже, чем в первой (рис. 3), но повышения выделения гормонов на 14-е и 21-е сутки не наблюдали. В третьей возрастной группе содержание тестостерона на 7-е сутки было достоверно ниже, чем в первых двух, на 14-е сутки количество тестостерона снижалось и также отсутствовало увеличение гормонов в культуральной среде на 21-е сутки (рис. 4).

Проведенные исследования показали, что ткань тестисов плодов 16–20-ти недель гестации, замороженная по оптимальной программе, после размораживания сохраняет способность синтезировать тестостерон в течение 21 сут культивирования. Полученные нами данные согласуются с результатами, приведенными в [3], в которой на модельных животных было показано, что клетки Лейдига могут реагировать на гонадотропины и выделять тестостерон в культуре на высоком уровне продолжительное время, а также отвечать увеличением синтеза тестостерона на добавление в фидерный слой нервной ткани гипофиза, выделяющей тропные гормоны [5].

Из представленных данных можно сделать вывод, что после криоконсервирования с 0,7 моль ДМСО по предлагаемой нами программе сохраняются морфология ткани и способность выделять тестостерон клетками тестиса при длительном органотипическом культивировании.

Результаты исследований, проведенных после клинических аллотрансплантаций ФТТЧ в амниотической оболочке, свидетельствуют о статистическом и достоверном ($p < 0,05$) увеличении содержания тестостерона в сыворотке крови, нормализации уровней фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, а также улучшении общего состояния пациентов.

Таким образом, разработанный метод криоконсервирования плодовых семенников может быть использован для создания низкотемпературного банка ФТТЧ с целью дальнейшего применения в клинической практике при лечении гипогонадных состояний у мужчин.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Басмаджян М. Е.* Метод получения культур эмбриональных интерстициальных эндокриноцитов яичка человека: Метод. рекомендации.– Ереван, 1990.– 8 с.
2. *Грищенко В. И., Керос В. А.*. Изучение процесса замораживания-оттаивания 5%-ного и 10%-ного растворов диметилсульфоксида на среде Хенкса методом тензодилатометрии // Вісник ХДУ № 422. Біофіз. вісник.– 1998.– Вип. 2.– С. 93–95.
3. *Турчин И. С., Онищенко Д. С., Дворников Н. В.* Применение метода культур тканей для изучения структуры и функции клеток эндокринных желез // Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы.– М.: Медицина, 1972.– С. 149–150.
4. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Говоруха Т. П. и др.* Влияние охлаждения на структуру клетки.– Киев: Наук. думка, 1992.– 148 с.
5. *Leinonen P. J., Jable R. B.* Leydig cell desensitization by human horionic gonadotropin does not occur in the human fetal testis // J. Clin. Endocrinol Metab.– 1985.– Ang 61:2.– P. 234–238.
6. *Pike B. L., Robinson W. A.* Human bone marrow colony growth in agar gel // J. Cell. Physiol.– 1970.– 76.– P. 77–84.
7. *Rao S. G. A., Rao S. R. V.* Mammalian testis in organ culture // Curr. Sci., India.– 1976.– V. 45, № 16.– P. 594–596.


Поступила 27.04.99

increase in the synthesis of testosterone on an addition into a feeder layer of hypophysis nerve tissue, releasing tropic hormones [5].

According to the data presented one can conclude that after cryopreservation with 0.7 M DMSO on the program proposed by us the tissue morphology and ability to release testosterone by testis cells during a long organotopic culturing are kept.

The results of studies, conducted after clinical allotransplantations of HFT in amniotic membrane, testify to a statistically significant and true ($p < 0.05$) increase in testosterone content in a blood serum, normalization of the levels of follicle-stimulating and luteinizing hormones, as well as the improvement of general state of patients.

Thus the developed method of cryopreservation of fetus testes can be used for the creation of low temperature bank of HFT with the aim of further application in clinical practice when treating the male hypogonadal states.

## REFERENCES


1. *Basmadzhan M. E.* The method for obtaining cultures of embryonic intersticial endocrinocytes of human testis: Methodical recommendations.– Erevan.– 1990.– 8 p.
2. *Grischenko V. I., Keros V. A.* The study of the process of freeze-thawing of 5% and 10% solutions of dimethyl sulfoxide in Henks medium by means of tensodilatometry // Visnyk KhDU № 422. Biophys. visnyk.– 1998.– Issue 2.– P. 93–95.
3. *Turchin I. S., Onischenko D. S., Dvornikov N. V.* Application of the method of culture tissues to study the structure and functions of endocrinic gland cells // Actual Probelms of Physiology, Biochemistry and Pathology of Endocrinic System.– M: Meditsina, 1972.– P. 149–150.
4. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Govorukha T. P. et al.* The effect of cooling on cell structure.– Kiev: Naukova dumka, 1992.– 148 p.
5. *Leinonen P. J., Jable R. B.* Leydig cell desensitization by human horionic gonadotropin does not occur in the human fetal testis // J. Clin. Endocrinol Metab.– 1985.– Ang 61:2.– P. 234–238.
6. *Pike B. L., Robinson W. A.* Human bone marrow colony growth in agar gel // J. Cell. Physiol.– 1970.– 76.– P. 77–84.
7. *Rao S. G. A., Rao S. R. V.* Mammalian testis in organ culture // Curr. Sci., India.– 1976.– V. 45, № 16.– P. 594–596.


Accepted in 27.04.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.5: 615.832.9

# Некоторые аспекты применения локальной гипотермии в акушерско-гинекологической практике

В. И. ГРИЩЕНКО

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

Н. А. ЩЕРБИНА, В. В. ЛАЗУРЕНКО

*Харьковский государственный медицинский университет*



UDC 618.5: 615.832.9

# Some Aspects of Local Hypothermia Application in Obstetrical and Gynaecological Practice

V. I. GRISCHENKO,

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

N. A. SCHERBINA, V. V. LAZURENKO

*Kharkov State Medical University*

Представлены основные виды локальной гипотермии, используемые в акушерско-гинекологической практике и в ряде случаев с успехом заменяющие медикаментозные методы лечения. Разработан и апробирован метод локальной гипотермии передней брюшной стенки для стимуляции и коррекции родовой деятельности при ее аномалиях.

Подано основні види локальної гіпотермії, які використовуються в акушерсько-гінекологічній практиці і в ряді випадків з успіхом замінюють медикаментозне лікування. Розроблено і апробовано метод локальної гіпотермії передньої черевної стінки для стимуляції і корекції пологової діяльності при її аномаліях.

The main types of local hypothermia, used in obstetrical and gynaecological practice and in a number of cases successfully replacing medicamental methods of treatment are presented. The method of local hypothermia of an anterior abdominal wall for the labor activity stimulation and correction at its abnormalities is developed and mastered.

На нынешнем этапе развития медицины лекарственная терапия сопровождается значительными аллергическими реакциями. Учитывая высокую частоту побочных эффектов при использовании фармакологических препаратов, их дороговизну, перспективными становятся немедикаментозные методы лечения, среди которых особого внимания заслуживают факторы охлаждения, в частности локальная гипотермия [6, 14].

Нами проведен анализ применения метода локальной гипотермии в акушерско-гинекологической практике для разработки эффективной методики стимуляции и коррекции родовой деятельности. Локальная гипотермия используется для охлаждения отдельных областей тела, при этом отмечаются повышение устойчивости тканей к кислородному голоданию, снижение уровня обменных процессов и воспалительных явлений, выраженный гемостатический эффект [3, 4, 14, 23, 24]. Обычно не наблюдается значительного снижения температуры в других участках тела, что позволяет избежать специфических для общей гипотермии осложнений [16-18].

В акушерско-гинекологической практике наиболее часто применяются следующие виды локаль-

At the present stage of the medicine development a medicinal therapy is accompanied with considerable allergic reactions. Taking into account a high frequency of side-effects when using pharmacological preparations, their expensiveness, non-medicamental methods of treatment become perspective, among which cooling factors, local hypothermia in particular, are of a special attention [6, 14].

We have accomplished the analysis of the local hypothermia method application in an obstetrical and gynaecological practice for the development of an efficient technique of the labor activity stimulation and correction. A local hypothermia is used for the cooling of some body parts, thereat an increase in tissue resistance to an oxygenous starvation, a decrease in the level of metabolic processes and inflammatory effects, a manifested hemostatic effect are noted [3, 4, 14, 23, 24]. Usually a considerable decrease in the temperature in other body parts is not observed, that allows to avoid specific for general hypothermia complications [16–18].

Such types of local hypothermia as craniocerebral (CCH), rectal, vaginal, suprapubic and other ones are the most often applied in an obstetrical and gynaecological practice [8].



Матеріал, захищений авторським правом

ной гипотермии: краниоцеребральная (КЦГ), ректальная, влагалищная, надлобковая и другие [8].

КЦГ используется при лечении новорожденных с постгипоксическими и травматическими повреждениями головного мозга, в терапии поздних гестозов, сепсиса, при невынашивании беременности, лечении климактерического и посткастрационного синдромов, для коррекции менструальной функции и сексуальных расстройств, при некоторых формах эндокринного бесплодия [1, 11, 13, 20].

Разработан способ интраоперационной гипотермии органов малого таза, позволяющий значительно снизить кровопотерю при кесаревом сечении и гинекологических вмешательствах, улучшить течение послеоперационного периода, способствовать быстрейшей реабилитации пациенток [19, 21, 25]. Имеются сведения о применении интраоперационной локальной абдоминальной гипотермии в лечебной программе перитонита [2, 26].

Одним из направлений использования местного охлаждения с терапевтической целью является микролокальная гипотермия точек акупунктуры [10]. При этом отмечены противовоспалительный, обезболивающий, антиаллергический, нормализующий сосудистый тонус эффекты данного метода, который является аналогом иглоукалывания, но без нарушения целостности кожных покровов. К преимуществам метода можно отнести: неинвазивность, безболезненность, увеличение нозологического и возрастного спектра показаний, сокращение времени процедуры, индивидуальное "дозирование" холодового воздействия. В. И. Грищенко и соавт. [7] проводили стимуляцию сократительной деятельности матки методом акупунктурной гипотермии биологически активных точек хлорэтилом. Полученный результат свидетельствовал о сокращении продолжительности родов, снижении родового травматизма.

Разновидностью локального охлаждения является ректальная гипотермия, особенно при лечении дисфункциональных маточных кровотечений, при этом выявлено ее коррегирующее действие на обмен катехоламинов, гормональный гомеостаз. Применение ректальной гипотермии у рожениц уменьшает величину кровопотери в последовом и раннем послеродовом периодах.

В лечении различных акушерско-гинекологических заболеваний используется влагалищная гипотермия. В настоящее время доказано, что сложные ответные реакции объясняются не только непосредственным действием холода на половые органы, но и возбуждением нейроэндокринного звена с вовлечением гипоталамо-гипофизарной системы. Влагалищная гипотермия применяется при лечении ювенильных, дисфункциональных маточных кровотечений, при некоторых формах эндокринного бесплодия, воспалительных заболеваниях женских половых органов [9, 12, 15]. В акушерской практике этот метод используется для ле-

CCH is used when treating newborns with posthypoxical and traumatic damages of brain, in the therapy of late gestoses, sepsis, during immature pregnancy, treatment of climacteric and postcastrational syndromes, for the menstrual function and sexual disorder correction, at some forms of endocrine infertility [1, 11, 13, 20].

One developed the way of an intraoperative hypothermia of small pelvis organs, permitting to considerably decrease the hemorrhage during cesarean section and gynaecological interventions, to improve the course of a postoperative period, to contribute to the most rapid rehabilitaion of patients [19, 21, 25]. There are the data on the application of an intraoperative local abdominal hypothermia in peritonitis therapeutic program [2, 26].

Microlocal hypothermia of acupuncture points is one of the directions of the local cooling usage with therapeutic aim [10]. Thereat one noted an antiinflammatory, anesthetic, antiallergic, normalizing a vascular tonus effects of the given method, being the analogue of an acupuncture, but without the impairment of a cutaneous cover integrity. Uninvasiveness, absence of pain, increase in nosological and age spectrum indices, the procedure time reduction, an individual "dosage" of cold effect can be related to this method advantages. V. I. Grischenko and coauthors [7] have accomplished the stimulation of the uterus contractile activity using the method of an acupunctural hypothermia of biologically active points by chloroethyl. The result obtained testified to the reduction of the labor duration, to a decrease in a labor traumatism.

A local cooling type is a rectal hypothermia, especially when treating disfunctional uterine bleedings, thereat its correcting effect on the exchange of catecholamines, hormonal homeostasis was revealed. The application of rectal hypothermia reduces the hemorrhage volume in a postnatal and early postnatal periods.

A vaginal hypothermia is used when treating various obstetrical and gynaecological diseases. At the present time it is proved, that complex responses are explained not only by a direct cold effect on genital organs, but the excitation of a neuroendocrine link with the involving of hypothalamo-hypophysial system. A vaginal hypothermia is applied when treating juvenile, disfunctional uterine hemorrhage, some forms of endocrine infertility, inflammatory diseases of women's genital organs [9,12,15]. In an obstetrical practice this method is used for the treatment of an uterine inertia, arrest of hypotonic and atonic uterine bleedings [6].

The suprapubic zone hypothermia during postlabor pyo-inflammatory complications is based on a stimulating effect of cooling factors on reflex cutaneovisceral zones of the abdomen inferior part [5]. Taking into consideration a manifested antiinflammatory and locally anesthetic effect of a cold, the given method is applied and at the genitals inflammatory diseases [22].



Матеріал, захищений авторським правом

чения слабости родовой деятельности, остановки гипотонических и атонических маточных кровотечений [6].

Гипотермия надлобковой зоны при послеродовых гнойно-воспалительных осложнениях основана на стимулирующем воздействии факторов охлаждения на рефлекторные кожно-воспалительные зоны нижней части живота [5]. Учитывая выраженное противовоспалительное и местноанестезирующее действие холода, данный метод применяется и при воспалительных заболеваниях гениталий [22].

Нами проведено экспериментально-клиническое исследование эффективности локальной гипотермии передней брюшной стенки (ЛГПБС) для коррекции аномалий сократительной функции матки при родах, а также индукции родовой деятельности.

Патогенетические механизмы влияния ЛГПБС на сократительную функцию матки изучены нами на 24 беременных крольчихах при различной степени охлаждения и продолжительности воздействия с использованием специальной накладки, в которой циркулировала охлаждающая жидкость, составляющая замкнутый контур с аппаратом "Холод-2Ф". Исследовались изменения температуры различных участков тела крольчихи, сократительной функции матки, морфофункциональные особенности нейроэндокринной регуляции родового акта (содержание гормонов и биологически активных веществ в крови крольчих до и после проведения ЛГПБС; гистологическое исследование их гипофиза, яичников, маточно-плацентарного комплекса, плодов и новорожденных животных).

Экспериментальная методика индукции родов включала использование ЛГПБС у крольчих на 25–29 дни беременности (продолжительность беременности у данного вида животных составляет 31–32 дня). В результате определены оптимальная температура (10–15 °С) и экспозиция воздействия ЛГПБС (30–45 мин). При этом градиент понижения температуры достигал 3,68 ± 0,15 в прямой кишке и 3,22 ± 0,18 °С – в области матки. Нами отмечены достоверные изменения (по сравнению с исходными) показателей содержания норадреналина, серотонина и гистамина в сыворотке крови крольчих после проведения ЛГПБС. Регулярная родовая деятельность развивалась в 79,2% при указанных параметрах ЛГПБС в течение 3-х часов после процедуры. При более низких температурах (5–0 °С) и большей продолжительности воздействия у всех животных происходили роды мертвыми плодами, что связано с преждевременной отслойкой плаценты, обусловленной тетаническими сокращениями матки.

В клинике мы наблюдали 64 беременных, которым была показана индукция родов в связи с перенашиванием, иммунологическим конфликтом, поздним гестозом. Все пациентки были разделены на три клинические группы: в первую (контрольную)

We have carried out an experimental and clinical investigation of the efficiency of a local hypothermia of an anterior abdominal wall (LHAAW) for the correction of abnormalities of the uterus contractile function at the labor, as well as the induction of labor activity.

Pathogenetic mechanisms of LHAAW effect on uterus contractile function have been studied by us in 24 pregnant rabbit females at different cooling rate and the effect duration, using a special cover plate, where cooling liquid, making a closed circuit with "Kholod-2F" apparatus, circulated. The changes of temperature of different body parts of rabbit female, uterus contractile function, morphofunctional peculiarities of labor act neuroindocrine regulation (content of hormone and biologically active substances in blood of rabbit females before and after LHAAW; histological study of their hypophysis, ovaries, uterine and placental complex, fetuses and newborn animals) were investigated.

An experimental technique of labor induction included the usage of LHAAW in rabbit females on the 25th–29th days of pregnancy (pregnancy duration in the given kind of animals makes 31-32 days). As a result an optimal temperature (10–15 °C) and the exposure of LHAAW effect (30–45 min) were determined. Thereat the gradient of the temperature decrease reached 3.68 ± 0.15 in rectum and 3.22 ± 0.18 °C in the uterus area. We have noted significant changes (in comparison with intitial ones) of indices of norepinephrine, serotonin and histamine content in blood serum of rabbit females after LHAAW conducting. A regular labor activity developed in 79.2% at the mentioned parameters of LHAAW within 3 hrs after the procedure. Under lower temperatures (5–0 °C) and greater effect duration in all animals the labors with dead fetuses occured, that is related to a premature placental detachment stipulated by tetanic uterus contractions.

64 pregnant women, to whom the labor induction was indicated in connection with overmature pregnancy, immunological conflict, late gestosis, were observed in the clinic. All patients were divided in three clinical groups: the first group (control) made 20 women with pregnancy and labor normal course; the second one – 24 women, subjected to LHAAW for labor induction; the third one made 20 women with a labor stimulation by means of medicamental way. All pregnant women were subjected to a complete laboratory examination. Clinical and experimental comparisons permitted to specify the most efficient parameters of LHAAW conducting for labor induction: the temperature of cooling was 10–12 °C, the exposure – from 30 min to 1.5 hrs.

When using LHAAW with the labor stimulation aim, the labor began in 87.5% during 8–16 hrs after the procedure and its duration did not distinguish from one of the control group patients ($P > 0.05$). For



Матеріал, захищений авторським правом

вошли 20 женщин с нормальным течением беременности и родов; во вторую – 24, у которых для индукции родов использовали ЛГПБС; третью составили 20 женщин с родовозбуждением гормонально-медикаментозным способом. Все беременные подвергались полному лабораторному обследованию. Клинико-экспериментальные сопоставления позволили уточнить наиболее эффективные параметры проведения ЛГПБС для индукции родов: температура охлаждения 10–12 °С, экспозиция от 30 мин до 1,5 ч.

При использовании ЛГПБС с целью родовозбуждения роды наступали у 87,5% в течение 8–16 ч после процедуры и по продолжительности не отличались от родов пациенток контрольной группы ($P > 0{,}05$). Остальным беременным сеанс ЛГПБС проведен повторно через 24 ч с положительным эффектом.

Применение внутривенной инфузии окситоцина для индукции родов было эффективно в 60% случаев, остальным беременным проводилась повторная схема родовозбуждения с амниотомией. Обращает внимание наибольшее число осложнений в 3-й группе (родовой травматизм, гипоксия плода, патологическая кровопотеря), а также родоразрешение путем операции кесарева сечения по сравнению с первой и второй группами ($P < 0{,}01$).

Отмечен положительный эффект применения ЛГПБС в подготовке шейки матки к родам (90%) по сравнению с традиционным глюкозо-витаминоэстрогено-кальциевым фоном (45%), в лечении слабости родовой деятельности – у 80% наблюдавшихся.

Таким образом, методы локальной гипотермии, используемые в акушерско-гинекологической практике, имеют ряд положительных эффектов и с успехом заменяют медикаментозную терапию при ряде заболеваний. Разработанный и апробированный нами метод ЛГПБС для стимуляции и коррекции родовой деятельности позволяет при его значительной эффективности ограничить воздействие лекарственных веществ на роженицу и плод и тем самым уменьшить количество акушерских осложнений.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Амаякян С. А.* Применение краниоцеребральной гипотермии для коррекции менструальной функции и сексуальных расстройств при некоторых формах эндокринного бесплодия: Дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1988.– 142 с.
2. *Анисимов А. Ю., Чуприн В. Г., Подшивало А. Г.* Интраоперационная локальная абдоминальная гипотермия в лечебной программе перитонита // 1-й Моск. междунар. конгресс хирургов.– М., 1995.– С. 135–136.
3. *Аржаков Л. И.* Влияние адаптогенов на функциональную активность клеток иммунной и кроветворной систем при холодовом воздействии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Новосибирск, 1996.– 18 с.
4. *Бабийчук Г. А., Ломакин И. И., Ломако В. В. и др.* Лечебная гипотермия как метод активации механизмов саногенеза // 1-й з'їзд укр. тов. кріоб. і кріомед., 1995.– С. 9-11.
5. *Голота В. Я., Подольський В. В.* Мікробіологічна оцінка перебігу післяпологового періоду у породіль, які отримували місцеву зовнішню керовану кратну гіпотермію // 1-й з'їзд укр. тов. кріоб. і кріомед., 1995.– С. 42-44.


the rest pregnant women the LHAAW session was repeatedly carried out in 24 hrs with a positive effect.

The application of oxytocin intravenous infusion for a labor induction was efficient in 60%, for the rest pregnant women a repeated protocol of labor stimulation with amniotomy was performed. The largest number of complications in the third group (labor traumatism, fetus hypoxia, pathological hemorrhage), as well as the delivery by a cesarian section in comparison with the first and second groups ($P < 0.01$) attract the attention.

A positive effect of LHAAW application in the uterus neck preparation to the labor (90%) in comparison with a traditional glucose-vitamin-estrogen-calcic background (45%), in treatment of an uterine inertia – in 80% of observed patients was noted.

Thus, the methods of local hypothermia, used in obstetrical and gynaecological practice have a number of positive effects and siccessfully replace medicamental therapy at some diseases. Developed and mastered by us the method of LHAAW for the labor activity stimulation and correction permits at its considerable efficiency to limit the effect of medicinal substances to a women in labor and fetus and by this reduce a number of obstetrical complications.

## REFERENCES


1. *Amakyan S. A.* Application of craniocerebral hypothermia for menstrual function and sexual disorder correction at some forms of endocrine infertility: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1988.– 142 p.
2. *Anisimov A. Yu., Chuprin V. G., Podshivalo A. G.* Intraoperative local abdominal hypothermia in a medical program of peritonitis // The 1st Moscow International Congress of Surgeons.– M., 1995.– P. 135–136.
3. *Arzhakov L. I.* Adaptogene effect on cell functional activity of immune and hemopoietic systems at cold effect: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.– Novosibirsk, 1996.– 18 p.
4. *Babijchuk G. A., Lomakin I. I., Lomako V. V. et al.* Medical hypothermia as the method of sanogenesis mechanism activation // The 1st Congress of the Ukrainian Society of Cryobiology and Cryomedicine, 1995.– P. 9–11.
5. *Golota V. Ya., Podolsky V. V.* Microbiological estimation of the course of postnatal period in puerperas, to whom a local external directed partial hypothermia was done // The 1st Congress of the Ukrainian Society of Cryobiology and Cryomedicine, 1995.– P. 42–44.
6. *Grischenko V. I., Sandomirsky B. P., Babijchuk G. A.* Cold application in medicine.– Kyiv: Zdorov'ya, 1989.– 40 p.
7. *Grischenko V. I., Lupoyad V. S., Kislitsa V. V. et al.* Stimulation of uterus contractile function using the method of acupunctural hypothermia of biologically active points by chlorethyl // Voprosy reproductologii.– Kharkov: Kharkov Medical Institute, 1990.– P. 31–33.
8. *Grischenko V. I., Scherbina N. A., Potapova L. V.* Application of low temperature effects in obstetrics and gynaecology // Bulletin of Russian Assosiation of obstericians and gynaecologists.– 1996.– № 2.– P. 74–77.
9. *Grischenko O. V.* Treatment of dysfunctional uterine bleeding by means of vaginal hypothermia: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1980.– 21 p.
10. *Kovalevskaya A. P.* Cryopuncture - new direction in reflexotherapy // The 1st Congress of the Ukrainian Society of Cryobiology and Cryomedicine, 1995.– P. 97–98.
11. *Kopshev S. N.* Craniocerebral hypothermia in obstetrics.– M.: Meditsina, 1985.– 112 p.





Матеріал, захищений авторським правом

6. *Грищенко В. І., Сандомирський Б. П., Бабійчук Г. О.* Застосування холоду в медицині.– Київ: Здоров'я, 1989.– 40 с.
7. *Грищенко В. И., Лупояд В. С., Кислица В. В. и др.* Стимуляция сократительной деятельности матки методом акупунктурной гипотермии биологически активных точек хлорэтилом // Вопр. репродуктологии.– Харьков: ХМИ, 1990.– С. 31–33.
8. *Грищенко В. И., Щербина Н. А., Потапова Л. В.* Применение низкотемпературных воздействий в акушерстве и гинекологии // Вестн. рос. ассоц. акушеров-гинекологов.– 1996.– № 2.– С. 74–77.
9. *Грищенко О. В.* Лечение дисфункциональных маточных кровотечений влагалищной гипотермией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1980.– 21 с.
10. *Ковалевская А. П.* Криопунктура — новое направление в рефлексотерапии // 1-й з'їзд укр. тов. кріоб. і кріомед., 1995.– С. 97-98.
11. *Копшев С. Н.* Краниоцеребральная гипотермия в акушерстве.– М.: Медицина, 1985.– 112 с.
12. *Лесовая М. А.* Лечение больных ювенильными маточными кровотечениями методом влагалищной гипотермии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук, 1989.– 20 с.
13. *Липко О. П.* Коррекция нейроэндокринных расстройств, развивающихся у женщин при посткастрационном синдроме, методом краниоцеребральной гипотермии // Вопр. репродуктологии: Сб. науч. тр.– Харьков, 1992.– С. 60–62.
14. *Литасова Е. Е., Власов Ю. А.* Клиническая физиология искусственной гипотермии.– Новосибирск: Наука, 1997.– 564 с.
15. *Мириманова Р. П., Саркисян С. С., Геворкян В. А. и др.* Применение локальной (влагалищной) гипотермии в комплексе лечения неспецифических воспалительных заболеваний женских половых органов // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии: Материалы науч.-практ. конф.– Ереван, 1984.– С. 157–160.
16. *Новиков В. С., Чудаков А. Ю., Исаков В. Д.* Острая гипотермия.– Спб.: Наука, 1997.– 152 с.
17. *Радушкевич В. Л.,Барташевич Б. И., Караваев Ю. Н.* Непреднамеренная интраоперационная гипотермия // Анестезиология и реаниматология.– 1997.– № 4.– С. 79–82.
18. *Тимофеев Н. Н., Прокопьева Л. П.* Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма.– М.: Медицина, 1997.– 206 с.
19. *Чарчоглян А. А.* Снижение кровопотери при операции кесарева сечения методом местной гипотермии: Автореф. дис. ... канд мед. наук.– М., 1980.– 22 с.
20. *Шайтуро П. Г.* Применение краниоцеребральной гипотермии в комплексном лечении невынашивания беременности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1989.– 25 с.
21. *Amin-Hanjani S., Corcoran J., Chatwani A.* Cold therapy in the management of postoperative cesarean section pain // American Journal of Obstetrics & Gynecology.– 1992.– 167, № 1.– P. 108–109.
22. *Ernst E., Fialka V.* Ice freezes pain? A review of the clinical effectiveness of analgesic cold therapy. [Review] // J. of Pain & Symptom Management.– 1994.– 9, № 1.– P. 56–59.
23. *Fialka V., Ernst E.* Kryotherapie // Wiener Medizinische Wochenschrift.– 1994.– 144, № 3.– P. 42–44.
24. *Preisinger E., Quittan M.* Thermo- und Hydrotherapie // Wiener Medizinische Wochenschrift.– 1994.– 144, № 20–21.– P. 520–526.
25. *Stockle U., Hoffmann R., Sudkamp N.P., Haas N.* Kontinuierliche Kryotherapieein Fortschritt in der Therapie des posttraumatischen und postoperativen Odems // Unfallchirurg.– 1995.– 98, № 3.– P. 154–159.
26. *White J. D., Kamath R., Nucci R. et al.* Evaporation versus iced peritoneal lavage treatment of heatstroke: comparative efficacy in a canine model // American Journal of Emergency Medicine.– 1993.– 11, № 1.– P. 1–3.

Поступила 25.05.99

12. *Lesovaya M. A.* Treatment of patients with juvenile uterine bleedings using the method of a vaginal hypothermia: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci., 1989.– 20 p.
13. *Lipko O. P.* Correction of neuroendocrine disorders, developing in women at postcastrational syndrome, using the method of craniocerebral hypothermia // Questions of reproductology: Collection of sci. works.– Kharkov: Kharkov Medical Institute, 1992.– P. 60–62.
14. *Litasova E. E., Vlasov Yu. A.* Clinical physiology of an artificial hypothermia.– Novosibirsk: Nauka, 1997.– 564 p.
15. *Mirimanova R. P., Sarkisyan S. S., Gevorkyan V. A. et al.* Application of local (vaginal) hypothermia in the comlex of woman genital organ nonspecific inflammatory disease treatment // Actual questions of obstetrics and gynaecology: Materials of scientific and practical conference.– Erevan, 1984.– P. 157–160.
16. *Novikov V. S., Chudakov A. Yu., Isakov V. D.* Acute hypothermia.– St-Petersburg: Nauka, 1997.– 152 p.
17. *Radushkevich V. L., Bartashevich B. I., Karavayev Yu. N.* Accidental intraoperative hypothermia // Anasthesiology and reanimatology.– 1997.– № 4.– P. 79–82.
18. *Timofeyev N. N., Prokop'eva L. P.* Neurochemistry of hypobiosis and limits of an organism's cryoresistance.– M.: Meditsina, 1997.– 206 p.
19. *Charchoglyan A. A.* Reduction of hemorrhage at the cesarean section operation using the method of a local hypothermia: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.– M., 1980.– 22 p.
20. *Shajturo P. G.* Craniocerebral hypothermia application in a combined treatment of immature pregnancy: Abstr. Thesis... Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1989.– 25 p.
21. *Amin-Hanjani S., Corcoran J., Chatwani A.* Cold therapy in the management of postoperative cesarean section pain // American Journal of Obstetrics & Gynecology.– 1992.– 167, № 1.– P. 108–109.
22. *Ernst E., Fialka V.* Ice freezes pain? A review of the clinical effectiveness of analgesic cold therapy. [Review] // J. of Pain & Symptom Management.– 1994.– 9, № 1.– P. 56–59.
23. *Fialka V., Ernst E.* Kryotherapie // Wiener Medizinische Wochenschrift.– 1994.– 144, № 3.– P. 42–44.
24. *Preisinger E., Quittan M.* Thermo- und Hydrotherapie // Wiener Medizinische Wochenschrift.– 1994.– 144, № 20–21.– P. 520–526.
25. *Stockle U., Hoffmann R., Sudkamp N.P., Haas N.* Kontinuierliche Kryotherapieein Fortschritt in der Therapie des posttraumatischen und postoperativen Odems // Unfallchirurg.– 1995.– 98, № 3.– P. 154–159.
26. *White J. D., Kamath R., Nucci R. et al.* Evaporation versus iced peritoneal lavage treatment of heatstroke: comparative efficacy in a canine model // American Journal of Emergency Medicine.– 1993.– 11, № 1.– P. 1–3.

Accepted in 25.05.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.1-002: 616-002-08-092.9

UDC 618.1-002: 616-002-08-092.9

# Исследование влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе

В. А. ПИТЬКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

# The Study of the Effect of Chorion Cryoextraction and Placenta Extraction Products on Morphological Indices during Experimental Inflammatory Process

V. A. PIT'KO

*Kharkov State Medical University*

Показана положительная динамика исследованных морфологических показателей брыжейки крыс с экспериментальным воспалительным процессом и введением криоэкстракта хориона и экстракта плаценты.

Показана позитивна динаміка досліджуваних морфологічних показників брижі щурів з експериментальним запальним процесом і введенням кріоекстракту хоріона та екстракту плаценти.

The positive dynamics of studied morphological indeces of rat mesentery with inflammatory process and injection of chorion cryoexraction and placenta extraction products is showed.

Лечение воспалительных процессов — одна из актуальных задач современной медицины. Важное значение в их лечении имеют биогенные стимуляторы, которые получают из фетальных тканей человека в результате абортов ранних сроков (10–12 недель гестации). Наличие в фетальных тканях, как и в тканевых препаратах вообще, широкого спектра и большого количества биологически активных веществ позволяет направлять научные поиски на получение новых биопрепаратов, обладающих биостимулирующим действием.

Цель работы — исследование влияния фармакологического препарата экстракт плаценты и нового препарата криоэкстракт хориона, разработанного в ИПК и К НАН Украины (1997), на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе.

Опыты проведены на 96 крысах-самцах линии Вистар массой 200–220 г. Всего было сформировано 4 экспериментальные группы животных: интактные; с экспериментальным воспалением; с вызванным экспериментальным воспалением и введением криоэкстракта хориона; с экспериментальным воспалением и введением экстракта плаценты.

Моделью воспаления служил острый асептический перитонит, вызываемый внутрибрюшинным введением 5 мг λ-карагинена ("Sigma", США) в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия [1, 3]. Карагинен представляет собой сульфатированный гликозаминогликан, выделенный из ирландского морского мха *Chondrus* и используемый в большинстве экспериментальных разработок данного направления как флогоген [8]. Животных за-

The treatment of inflammatory processes is one of an actual tasks of a modern medicine. Biogenic stimulators, obtained from human fetal tissues in the result of abortions at early stages (10–12 weeks of gestation) have a great importance in their treatment. The presence of a wide spectrum and great number of biologically active substances in fetal tissues, as in tissue preparations generally, allow to direct scientific search to obtaining of new biopreparations, possessing a biostimulating effect.

The aim of the work was to study the effect of placenta extraction product pharmacological preparation and chorion cryoextraction one on morphological indices during an experimental inflammatory process, elaborated at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine in 1997.

Experiments were conducted in 96 Vistar male rats with the mass of 200–220 g. Four experimental groups of animals have been formed: intact; with an experimental inflammation; with an induced experimental inflammation and injection of chorion cryoextraction product; with an experimental inflammation and injection of placenta extraction product.

An acute aseptic peritonitis, induced by means of intraperitoneal injection of 5 mg of λ-karaginen ("Sigma", USA) in 1 ml of sodium chloride isotonic solution [1,3], served as an inflammatory model. Karaginen is sulphatated glycosisaminoglycan, extracted from the Chondrus Ireland sea moss and used in the majority of experimental elaborations of the given direction as phlogogene [8]. Animals were decapitated to the 6th hr, 1st, 3rd, 7th and 10th day.



Матеріал, захищений авторським правом

бивали декапитацией на 6-й час, 1-е, 3-и, 7-е, 10-е сутки.

Критериями воспаления служили морфологические изменения, изученные на пленочных препаратах брыжейки тонкой кишки. Кусочки брыжейки фиксировали 2–3 ч в жидкости Карнуа. Промывали в двух порциях 96%-го спирта, расправляли на предметном стекле и высушивали. После удаления жировой ткани препараты окрашивали гематоксилином-эозином по общепринятой методике [5], просветляли ксилолом и заключали в полистирол. При увеличении ×900 подсчитывали процентное содержание нейтрофилов, макрофагов, незрелых и зрелых фибробластов, фиброцитов [2, 4].

Для лечения воспалительного процесса использовали фармакологический препарат экстракт плаценты и биопрепарат криоэкстракт хориона [6]. Препараты вводили внутримышечно в дозе 1 мл: после моделирования воспаления, на 3-и и 7-е сутки. В табл. 1 представлены данные о динамике репаративных явлений при остром асептическом воспалении.

Спустя 6 ч после введения карагинена в брыжейке наблюдали набухание и слущивание мезотелиоцитов венозных сосудов и капилляров, появление в них эритроцитарных и смешанных тромбов, а также грануляторных масс с эритроцитами. В венулярном русле отмечались краевое стояние лейкоцитов, миграция нейтрофилов с преимущественно параваскуляторным их расположением, незначительный отек ткани.

Через сутки наблюдаемая картина изменилась. В зоне воспаления полностью отсутствовала мезотелиальная выстилка, отмечался выраженный отек ткани брыжейки с появлением на ее поверхности фибринозных наложений с умеренным количеством нейтрофилов. Развившееся воспаление характеризовалось также резко расширенными лимфатическими сосудами, набуханием, фрагментацией и фибриноидными изменениями коллагеновых волокон. Отмечалось интенсивное краевое расположение лейкоцитов, появлялись лейкоцитарные пе-

Morphological changes, studied in film preparations of small intestine mesentery served as inflammatory criteria. Mesentery parts were fixed within 2–3 hrs in the Karnau liquid. Then they were washed-out in two portions of 96% alcohol, straightened on a subject glass and dried. After the removal of fatty tissue, preparations were stained by hematoxylin-eosin according to generally accepted method [5], enlighted by xylol and contained in polysterole. With the ×900 magnification the percentage of neutrophiles, macrophages, immature and mature fibroblasts, fibrocytes [2, 4] was calculated.

Placenta extraction product pharmacological preparation and chorion cryoextraction biopreparation [6] were used when treating an inflammatory process. Preparations were intraperitoneally injected in the dose of 1 ml after the inflammation modelling to the 3rd or 7th day.

Data about the dynamics of reparative phenomena at an acute aceptic inflammation are represented in the Table 1.

In 6 hrs after the karaginen injection the swelling and exfoliation of mesotheliocytes, a sharp widening of venous vessels and capillaries, the presence of erythrocytic and mixed thrombuses, as well as granular masses with erythrocytes in them were observed in mesentery. A regional leucocyte location, neutrophile migration, especially with their paravasculatory arrangement, a slight tissue oedema were observed in a venous channel.

In a day the observed picture changed. In an inflammation zone a mesothelial cover was completely absent, manifested mesentery tissue edema with the appearance of fibroid applications on its surface with a moderate neutrophile amount has been observed. Developed inflammation was also characterized by sharply widened lymphatic vessels, swelling, fragmentation and fibroid changes of collagenic fibers. An intensive regional leucocyte location was observed, leucocyte perivasculary "muffs", sections of haemorrhages and neutrophile accumulations, the largest part of those was degranulated, appeared.

**Таблица 1** **Table 1**

**Клеточный состав (%) брыжейки крыс в динамике острого асептического перитонита ($X \pm x$), $n = 6$**

**Cellular content (%) of rat mesentery in the dynamics of an acute aseptic peritonitis ($X \pm x$), $n = 6$**

| Сроки исследования, сут Investigation terms, days | Нейтрофилы Neutrophiles | Макрофаги Macrophages | Формы фибробластов Fibroblast forms | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | незрелые immature | зрелые mature | фиброциты fibrocytes |
| Контроль / Control | 0,4 ± 0,18 | 23,0 ± 2,05 | 2,2 ± 0,37 | 24,7 ± 2,56 | 49,71 ± 2,75 |
| 0,25 | 36,4 ± 2,31* | 21,6 ± 1,56 | 1,0 ± 0,31* | 25,2 ± 2,63 | 15,8 ± 3,02* |
| 1 | 22,1 ± 2,44* | 35,0 ± 1,67* | 2,4 ± 0,57 | 29,7 ± 1,99* | 10,8 ± 2,37* |
| 3 | 11,2 ± 0,86* | 44,2 ± 2,08* | 5,6 ± 1,20* | 31,0 ± 2,30* | 8,0 ± 2,66* |
| 7 | 2,8 ± 0,73* | 31,0 ± 1,87* | 8,8 ± 2,65* | 39,2 ± 1,15* | 18,2 ± 1,82* |
| 10 | 2,0 ± 0,54* | 31,2 ± 2,41* | 4,8 ± 0,91* | 37,4 ± 1,93* | 24,6 ± 2,58 |

**Примечание.** * — достоверность различия между контролем и опытом $P < 0,05$.

**Note.** * — statistically significant differences between the control and experiment $P < 0.05$.



Матеріал, захищений авторським правом

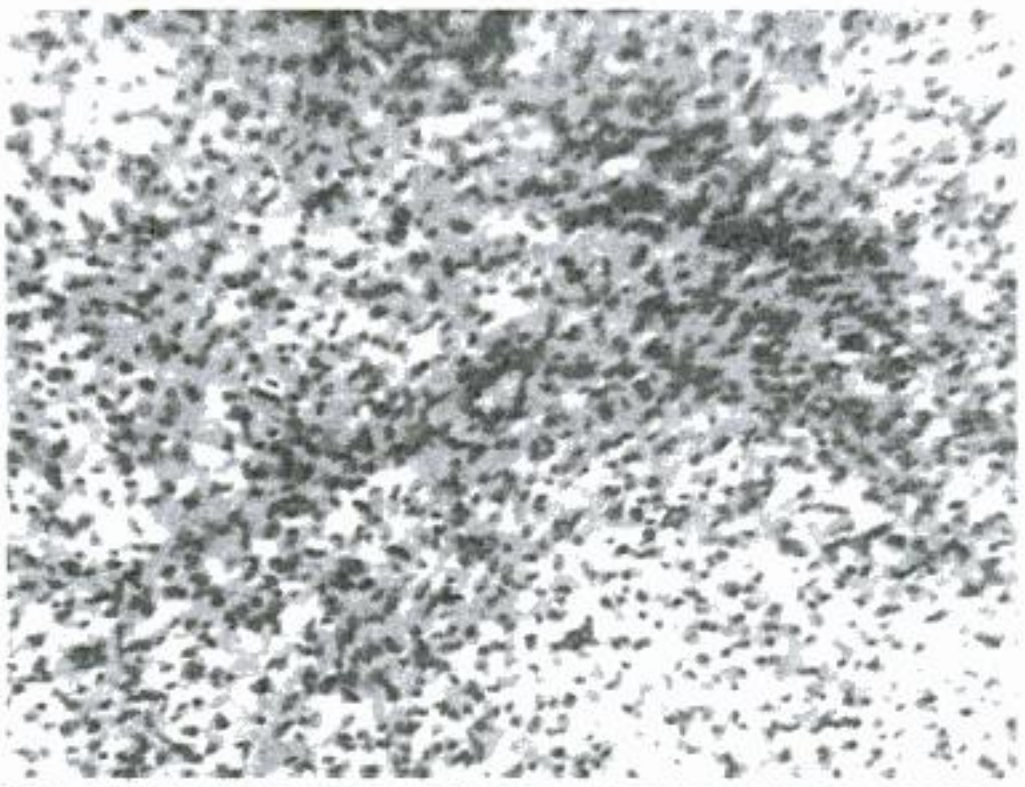


Рис. 1. Брыжейка крыс на 7-е сутки асептического воспаления. Окраска гематоксилин-эозин ×400.

**Fig. 1**. Rat mesentery to the 7th day of aseptic inflammation. Hematoxylin-eosin staining ×400.

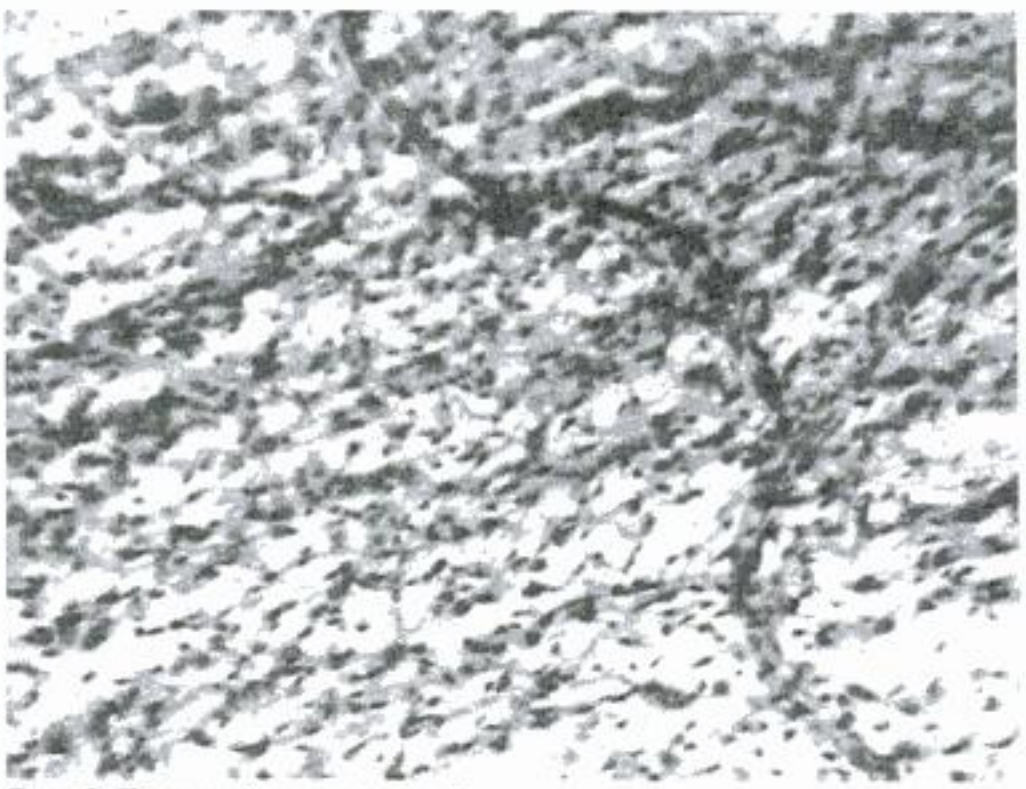


**Рис. 2.** Брыжейка крыс на 7-е сутки асептического воспаления в условиях применения криоэкстракта хориона. Окраска гематоксилин-эозин ×400.

**Fig. 2**. Rat mesentery to the 7th day of aseptic inflammation under the conditions of chorion cryoextraction product application Hematoxylin-eosin staining ×400.

риваскулярные "муфты", участки кровоизлияний и скоплений нейтрофилов, большая часть которых была дегранулирована.

Спустя 3-е суток после моделирования воспаления сосудистые нарушения ослабевали, частично восстанавливалась базальная мембрана, в отдельных сосудах сохранялись микротромбы и участки краевого стояния лейкоцитов. Резко возрастало количество макрофагов, появлялись небольшие участки молодой грануляционной ткани с пролиферирующими сосудами.

К 7-м суткам наблюдалось заметное уменьшение отечности ткани, количество нейтрофилов было увеличено незначительно, площадь кровоизлияний и фибринозных наложений намного уменьшилась. Мезотелиальная выстилка восстанавливалась более чем на половину, отмечалось появление больших зон грануляционной ткани с пролиферирующими сосудами и большим количеством макрофагов и молодых (недифференцированных и юных) фибробластов, а также небольших участков молодой соединительной ткани (рис. 1).

На 10-е сутки исчезали нарушения со стороны сосудов микроциркулярного русла, полностью восстанавливалась мезотелиальная выстилка. Прослеживалось замещение грануляционной ткани молодой соединительной, содержащей большое количество зрелых фибробластов.

При использовании для лечения воспалительного процесса криоэкстракта хориона (табл. 2) нейтрофильная реакция была похожа на такую, как и при естественном воспалении, однако менее выражена и заканчивалась на 7-е сутки.Пик количества моноцитов-макрофагов отмечали на первые сутки.

Итак, при естественном ходе воспаления максимальное развитие грануляционной ткани отмечалось на 7-е сутки, а её созревание и значительное замещение молодой соединительной тканью — на 10-е сутки; при перитоните, который лечили с при-

In three days after the inflammation modelling, vascular damages became weaker, basal membrane partially recovered, in some vessels microthrombuses and sections of regional leucocyte location retained. The number of macrophages sharply increased, small sections of a young granular tissue with proliferating vessels appeared.

Manifested decrease of oedema tissue was observed by the 7th day, neutrophile number was slightly increased, area of haemorrhages and fibrinous applications considerably decreased. Mesothelial cover recovered by more than a half, the appearance of large zones of granular tissue with proliferating vessels and a great macrophage number and a young (not differentiative young) fibroblast ones as well as slight sections of a young connective tissue (Fig. 1) was observed.

To the 10th day the damages in microcirculatory channel vessels disappeared, a mesothelial cover was completely recovered. Substitution of a granular tissue by a young connective one, containing a great number of mature fibroblasts, was observed.

When using chorion cryoextraction product to treat an inflammatory process, the neutophile responce was equal to one during a natural inflammation (Table 2), but was less manifested, and finished to the 7th day. The peak of monocyte-macrophage number was observed on the first day.

So, during a natural inflammation course the maximum development of a granular tissue was observed to the 7th day, and its maturation and a considerable substitution by a young connective tissue was revealed on the 10th day; during peritonitis, treated by means of chorion cryoextraction product, the mentioned reparative manifestations accelerated and were observed to the 7th day (Fig. 2). The maximum number of immature and mature fibroblasts was observed to the 3rd day, thereat the content of immature fibroblasts practically reverted to an initial one on the



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 2** **Table 2**

**Клеточный состав (%) брыжейки крыс с острым асептическим перитонитом и введением криоэкстракта хориона ($X \pm x$), $n$=6**

**Cellular content (%) of rat mesentery in the dynamics with an acute aseptic peritonitis and injection of the chorion cryoextraction product ($X \pm x$), $n = 6$**

| Сроки исследования, сут Investigation terms, days | Нейтрофилы Neutrophiles | Макрофаги Macrophages | Формы фибробластов Fibroblast forms | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | незрелые immature | зрелые mature | фиброциты fibrocytes |
| Контроль / Control | 0,4 ± 0,18 | 23,0 ± 2,05 | 2,2+0,37 | 24,7 ± 2,56 | 49,71 ± 2,75 |
| 0,25 | 20,5 ± 1,24*,** | 35,10 ± 2,41*,** | 2,1 ± 0,64** | 31,9 ± 2,44*,** | 10,4 ± 1,63*,** |
| 1 | 13,75 ± 2,56*,** | 50,75 ± 2,01*,** | 3,75 ± 0,47*,** | 25,5 ± 2,72 | 6,25 ± 1,93* |
| 3 | 4,2 ± 0,37*,** | 26,4 ± 1,28** | 11,2 ± 0,58*,** | 51,2 ± 2,26*,** | 7,0 ± 0,70* |
| 7 | 0,4 ± 0,24** | 25,8 ± 1,24** | 3,0 ± 0,44*,** | 39,6 ± 2,58* | 31,2 ± 1,46*,** |
| 10 | 0,4 ± 0,24** | 22,4 ± 2,18** | 2,6 ± 0,24** | 34,2 ± 2,47* | 40,4 ± 4,15*,** |

**Примечания.** * — достоверность различия между контролем и опытом $P < 0,05$; ** — достоверность различия по сравнению с теми же сроками при асептическом перитоните $P < 0,05$.

**Notes.** * — statistically significant differences between the control and experiment $P < 0.05$; ** — statistically significant differences in comparison with the same terms at an aseptic peritonitis $P < 0.05$.

менением криоэкстракта хориона, указанные явления репарации ускорялись и наблюдались уже на 7-е сутки (рис. 2). Максимальное количество незрелых и зрелых фибробластов наблюдали на 3-и сутки, при этом содержание незрелых фибробластов почти возвращалось к исходному на 7-е сутки. К 10-м суткам наблюдений отмечалось практически полное восстановление структуры брыжейки, о чем свидетельствует динамика восстановления числа фиброцитов.

Использование при воспалительном процессе препарата экстракта плаценты также было эффективно (рис 3). При воспалении на фоне введения экстракта плаценты (табл. 3) нейтрофильная реакция за динамикой похожа на естественное воспаление, однако менее интенсивная — количество нейтрофилов было меньше во все сроки наблюдений. Макрофагальная реакция была сильнее — пик количества макрофагов смещался с 3-х на 1-е сутки. Количество макрофагов в первые сутки было больше, а на 3-и, 7-е и 10-е сутки — меньше, чем при естественном воспалении.

Очевидно, что по некоторым показателям противовоспалительного действия криоэкстракт хориона имеет преимущества перед экстрактом плаценты. Так, количество нейтрофилов в воспалительной ткани брыжейки на 3-и и 7-е сутки достоверно ниже при использовании криоэкстракта хориона, а количество макрофагов — больше спустя 6 ч и меньше — на 3-и сутки.

Содержание незрелых фибробластов больше на 3-и и меньше на 7-е сутки, зрелых — меньше на 7-е сутки, фиброцитов на это время больше, что указывает на более раннее завершение нейтрофильной реакции, большую стимуляцию макрофагальной реакции, более быстрое возвращение к исходному количеству незрелых фибробластов, опережающее восстановление содержания фиброцитов.

Таким образом, сравнительные морфологические исследования ткани брыжейки крыс в динами-

7th day. Up to the 10th day of observations practically full recovery of mesentery structure was observed.

The usage of placenta extraction product preparation during an inflammatory process was also efficient (Fig.3). During the inflammation neutrophile responce at the background of placenta extraction product injection (Table 3) on the dynamics was equal to a natural inflammation, but less intensive, because neutrophile amount was less in all terms of observations. The macrophage responce was more intensive — the peak of macrophage number removed from the 3rd day down to the first one. Macrophage amount was bigger to the first day, and to the 3rd, 7th and 10th one it was less, than at a natural inflammation.

Apparently, that a chorion cryoextraction product by some indices has the advantages in comparison with placenta extraction one. Neutrophile number in mesentery inflammatory tissue on the 3rd and 7th day was statistically less when using a chorion cryoextrac-

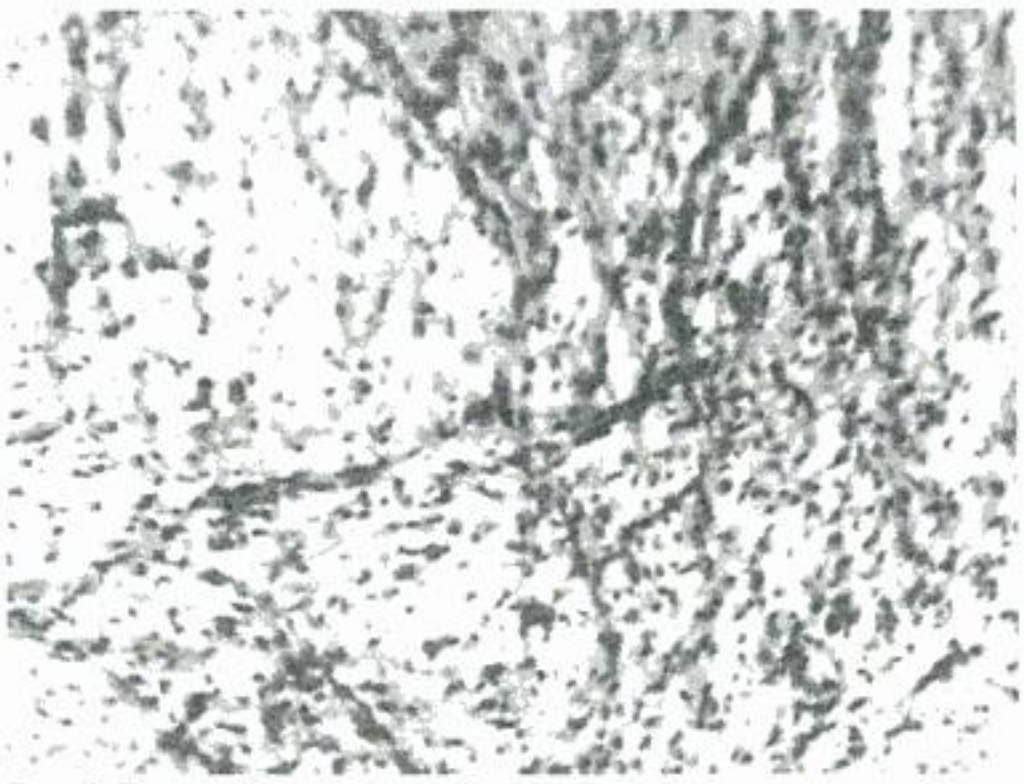


**Рис. 3.** Брыжейка крыс на 7-е сутки асептического воспаления в условиях применения экстракта плаценты. Окраска гематоксилин-эозин ×400.

**Fig. 3.** Rat mesentery to the 7th day of aseptic inflammation under the conditions of placenta extraction product application Hematoxylin-eosin staining ×400.



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 3** **Table 3**

**Клеточный состав (%) брыжейки крыс с острым асептическим перитонитом и введением экстракта плаценты ($X \pm x$), $n$=6**

**Cellular content (%) of rat mesentery in the dynamics of an acute aseptic peritonitis and injection of placenta extraction product ($X \pm x$), $n = 6$**

| Сроки исследования, сут Investigation terms, days | Нейтрофилы Neutrophiles | Макрофаги Macrophages | Формы фибробластов Fibroblast forms | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | незрелые immature | зрелые mature | фиброциты fibrocytes |
| Контроль / Control | $0,4 \pm 0,18$ | $23,0 \pm 2,05$ | $2,2 \pm 0,37$ | $24,7 \pm 2,5$ | $49,71 \pm 2,75$ |
| 0,25 | $21,0 \pm 1,22^{*,**}$ | $31,0 \pm 1,0^{*,**,+}$ | $2,4 \pm 0,39^{**}$ | $36,6 \pm 1,46^{*,**,+}$ | $9,0 \pm 0,70^{*,**}$ |
| 1 | $14,8 \pm 0,91^{*,**}$ | $47,5 \pm 1,24^{*,**}$ | $4,7 \pm 0,66^{*,**}$ | $28,2 \pm 1,61$ | $4,8 \pm 0,71^{*,**}$ |
| 3 | $6,2 \pm 0,66^{*,**,+}$ | $29,8 \pm 0,91^{*,**}$ | $9,6 \pm 0,50^{*,**,+}$ | $48,8 \pm 1,62^{*,**}$ | $5,6 \pm 0,59^{*,+}$ |
| 7 | $1,2 \pm 0,37^{*,**,+}$ | $23,6 \pm 2,11^{**}$ | $5,4 \pm 0,74^{*,**,+}$ | $47,6 \pm 2,40^{*,**,+}$ | $22,2 \pm 3,0^{*,+}$ |
| 10 | $0,6 \pm 0,24^{**}$ | $26,0 \pm 2,30^{**}$ | $3,0 \pm 0,44^{**}$ | $33,4 \pm 1,36^{*,**}$ | $37,0 \pm 2,52^{*,**}$ |

**Примечания.** * — достоверность различия между контролем и опытом $P < 0,05$; ** — достоверность различия по сравнению с теми же сроками при асептическом перитоните $P < 0,05$; + — $P < 0,05$ по сравнению с теми же сроками при введении криоэкстракта хориона и экстракта плаценты после развития перитонита

**Notes.** * — statistically significant differences between the control and experiment $P < 0.05$; ** — $P < 0.05$ in comparison with the same terms at an aseptic peritonitis; + — $P < 0.05$ in comparison with the same terms at injection of chorion cryoexraction and placenta extraction products after peritonitis development.

ке естественного развития воспаления и на фоне введения криоэкстракта хориона и экстракта плаценты позволяют сделать вывод, что криоэкстракт хориона обладает более выраженными противовоспалительными свойствами, чем экстракт плаценты.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Александров П.Н., Сперанская Т.В.* Динамика карагинового воспаления в условиях оксибутирата лития // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1988.– Т. 106.– С. 233–235.
2. *Галанкин В.Н. и др.* Морфологические критерии остроты перитонита при лечении этапными санирующими промываниями брюшной полости // Архив патологии.– 1989.– Т. 51, № 8.– С. 45–52.
3. *Клименко Н.А.* Роль лейкоцитов в реакциях тучных клеток очага воспаления // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1993.– Т. 116, № 9.– С. 249–253.
4. *Клименко Н.А., Татарко С.В.* Роль тучных клеток в репаративных явлениях при воспалении // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1995.– Т. 119, № 3.– С. 262–265.
5. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники.– М.: Медгиз.– 1961.– 341 с.
6. *Суббота Н.П., Грищенко В.И., Питько В.А. и др.* Получение, хранение и применение фрагментов, суспензий и криоэкстракта хориона: Метод. рекомендации.– Харьков, 1997.– 8 с.
7. *Филатов В.П.* Основные теоретические вопросы тканевой терапии // Тканевая терапия.– Киев: АН УССР, 1953.– С. 5–21.
8. *Чернух А.М.* Воспаление: Очерки патологии и экспериментальной терапии.– М.: Медицина, 1979.– 448 с.


Поступила 22.12.98

tion, and macrophage amount in this case was higher by 6 hrs and less to the 3rd day.

The number of immature fibroblasts is higher to the 3rd day and less on the 7th day, the number of mature ones – lower to the 7th day, the number of fibrocytesis higher up to this time and this testifies to an earlier completion of neutrophile responce, bigger stimulation of macrophagal responce and more rapid returning to an initial number of immature fibroblasts, outstripping recovery of fibrocyte content.

Thus, comparative morphological studies of rat mesentery tissue in dynamics of a natural inflammation development and at the background of the injection of chorion cryoextraction and placenta extraction products allow to conclude that the chorion cryoextraction product possesses more manifested antiinflammatory properties in comparison with placenta extraction one.

## REFERENCES


1. *Alexandrov P.N., Speranskaya T.V.* The dynamics of karaginen inflammation under the oxybutyrate lithium conditions // Experimental Biology and Medicine Bul.– 1988.– V. 106.– P. 233–235.
2. *Galankin V.N. et al.* Morphological cryteria of peritonitis acuty when treating by means of stage by stage sanating peritoneal cavity washings // Pathology archives.– 1989.– V. 51, № 8.– P. 45–52.
3. *Klimenko N.A.* Erythrocyte role in responces of mast cell inflammatory focus // Experimental biology and medicine bul.– 1993.– V. 116, № 9.– P. 249–253.
4. *Klimenko N.A., Tatarko S.V.* The role of mast cells in reparative processes at inflammation // Experimental biology and medicine Bul.– 1995.– 119, № 3.– P. 262–265.
5. *Merkulov G.A.* The course of pathohystological technology.– M.: Medgiz, 1961.– 341 p.
6. *Subbota N.P., Grischenko V.I., Pit'ko V.A. et al.* Obtaining, storage and application of fragments, suspensions and chorion cryoextraction: Metod. recommendations.– Kharkov, 1997.– 8 p.
7. *Filatov V.P.* The main theoretical questions of tissue therapy: Tissue therapy.– Kiev: The National Academy of Sciences of the Ukraine, 1953.– P. 5–21.
8. *Chernuh A.M.* Inflammation:Pathology and experimental therapy essays.– M.: Meditsina, 1979.– 448 p.


Accepted in22.12.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.145.-007.415.-085.361.438: 612.017.1

UDC 618.145.-007.415.-085.361.438: 612.017.1

# Влияние имплантаций криоконсервированной ткани тимуса на иммунореактивность организма больных эндометриозом

Л. В. ПОТАПОВА

*Харьковский государственный медицинский университет*

# Effect of Thymus Cryopreserved Tissue Implantations on Immune Reactivity of Patients' Organism with Endometriosis

L. V. POTAPOVA

*Kharkov Medical State University*

В результате комплексной терапии с применением криоконсервированной ткани тимуса отмечены положительный клинический эффект, а также нормализация функционирования Т-системы иммунитета, снижение сенсибилизации организма эндометриоидными тканевыми антигенами, подавление воспалительных реакций.

У результаті проведеної комплексної терапії з використанням кріоконсервованої тканини тимусу відмічено позитивний клінічний ефект, а також нормалізація функціонування Т-системи імунітету, зниження сенсибілізації організму ендометріоїдними тканинними антигенами, пригнічення запальних реакцій.

As a result of a complex therapy, using thymus cryopreserved tissue, a positive clinical effect as well as the normalization of the immunity T-system functioning, a decrease in an organism's sensibilization by means of endometroid tissular antigens, the suppresion of inflammatory reactions were observed.

Несмотря на многочисленные исследования последних лет, проблема эндометриоза остается весьма актуальной, так как отсутствует единое мнение об этиологии и патогенезе этого заболевания. Проведенные иммунологические исследования указывают, что данная патология протекает на фоне измененной иммунореактивности организма. В этой связи патогенетическая терапия должна быть направлена на нормализацию функционирования иммунной системы.

Цель исследования — изучение влияния имплантации криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы на клиническое проявление заболевания и показатели Т-системы иммунитета больных наружным и внутренним генитальным эндометриозом 3–4 степени распространения.

Под наблюдением находились 55 женщин (от 19 до 38 лет), больных наружным и внутренним эндометриозом. У 40 из них во время эндоскопических хирургических вмешательств диагностирован эндометриоз яичников, брюшины прямокишечно-маточного углубления, у 15 больных — аденомиоз. Основные проявления заболевания — болевой синдром (дисменорея, дисхезия, диспареуния, тазовые боли), гиперполименорея. Диагноз был подтвержден гистологическим исследованием удаленных препаратов. Контрольную группу составили 20 здоровых женщин. О характере клинического течения болезни судили по исчезновению болей, редукции эндометриоидных очагов, нормализации менструального цикла, уменьшению аллергических реак-

In spite of versatile investigations of last years the problem of edometriosis remains quite actual, since there is no common opinion on this disease ethiology and pathogenesis. Conducted immunological studies point, that the given pathology proceeds at the background of a changed immune reactivity of an organism. In this connection a pathogenetic therapy should be directed to the normalization of the immune system functioning.

The investigation aim was to study the effect of the fetal thymus cryopreserved tissue implantation on clinical disease manifestation and the immunity T-system indices of patients with external and internal genital endometriosis of 3–4 spreading degree.

55 women (from 19 to 38 years old) with an external and internal endometriosis were under observation, in 40 women from them the endometriosis of ovaries, peritoneum, recouterine pouch was diagnozed during endoscopic surgical interventions, in 15 patients — adenomiosis. Main manifestations of the disease are a painful syndrome (dysmenorrhea, dyschesia, dyspareunia, pelvic pains), hyperpolymenorrhea. The diagnosis was confirmed by a histological examination of removed preparations. 20 healthy women made a control group. The character of the disease's clinical course was considered by the disappearance of pains, reduction of endometrioid foci, menstrual cycle normalization, decrease in allergic reactions to the taking of hormonal preparations. The term of patient observation was 1 year.



Матеріал, захищений авторським правом

ций на прием гормональных препаратов. Срок наблюдения за больными — 1 год.

Программа иммунологических исследований включала изучение Т-системы иммунитета. Кровь для исследований брали из локтевой вены. Мононуклеарные клетки выделяли на градиенте фиколл–верографина. Количественное содержание Т-лимфоцитов и численность Т-активной субпопуляции лимфоцитов определяли в реакции Е-розеткообразования [3, 4], содержание Т-лимфоцитов-хелперов, Т-лимфоцитов-супрессоров — методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител анти-СД4 и анти-СД8 [1]. О функциональной активности Т-лимфоцитов судили по уровню бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) под влиянием фитогемаглютинина и экстракта эндометриоидной ткани [2]. Статистическая обработка материала проводилась с помощью критерия Стьюдента. Образцы криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы были получены из Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Фетальные ткани использовали на основании решения Министерства охраны здоровья Украины. Образец (2×2 см) размораживали и производили имплантацию в верхний наружный квадрант ягодицы в условиях операционной на 5–6-е сутки послеоперационного периода.

В результате терапии криоконсервированной тканью фетальной вилочковой железы зарегистрирован положительный клинический эффект, который проявлялся в отсутствии болевого синдрома за срок наблюдения, нормализации менструальной функции.По данным объективного исследования, УЗИ и контрольной лапароскопии наблюдалась редукция эндометриоидных гетеротопий. Все больные отмечали повышение физического тонуса, устойчивости к респираторным заболеваниям, отсутствие аллергических реакций на гормональные препараты.

Тканевая терапия приводила к нормализации функционирования Т-системы иммунитета, снижала сенсибилизацию организма эндометриоидными тканевыми антигенами, подавляла воспалительные реакции. Результаты проведенных исследований сгруппированы в таблице.

Анализ полученных данных показывает, что у больных с имплантацией криоконсервированной фетальной ткани вилочковой железы количественное содержание Т-общих лимфоцитов восстанавливается к 10-м суткам, Т-активных лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров — к концу первого месяца. Снижение индекса стимуляции лимфоцитов на эндометриоидный антиген, наблюдаемое к концу пер-

The program of immunological investigations included the immunity T-system study. Blood for examinations was taken from an ulnar vein. Mononuclear cells were isolated in ficol–verographine gradient. B-lymphocyte quantitative content and number of lymphocyte T-active subpopulation were determined in the reaction of E-rosette-formation [3, 4], the content of T-lymphocyte-helpers, T-lymphocyte-supressors was detected by means of the method of a membrane immune fluorescence using anti-SD4 and anti-SD8 monoclonal antibodies [1]. T-lymphocyte functional activity was considered according to the level of a blast transformation of lymphocytes (LBTL) under the effect of phytohemagglutinin and the endometrioid tissue extraction [2]. Material statistic processing was accomplished using Student criterion.

The samples of the fetal thymus cryopreserved tissue were obtained from the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. Fetal tissues were used on the grounds of the Ministry of Health Care of the Ukraine decree. The samples (2×2 cm) was frozen-thawed and the implantation was performed into the buttocks superior external quadrant under the operating room conditions ( on the 5–6th day of a postoperative period).

As a result of fetal thymus cryopreserved tissue therapy a positive clinical effect, manifested in the absence of painful syndrome within an observation term, normalizing of menstrual function was registered. According to the data of an objective study, US studies and a control laparoscopy, the reduction of endometroid heterotopias was observed. All patients noted the increase in a physical tonus, resistance to respiratory diseases, absence of allergical reactions to hormonal preparations.

A tissue therapy resulted in the normalization of the immunity T-system functioning, decreased an organism's sensibilization by endometroid tissue antigens, suppressed inflammatory reactions. The investigations' results are grouped in the table.

**State indices of the immunity T-system in patients with endometriosis**

| Immunological indices | Healthy women | Patients with endometriosis of 3–4 degree | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Before treatment | After treatment | | |
| | | | 10 days | 1 month | 6 months |
| T-active lymphocytes, % | 32.4 ± 0.87 | 43.2 ± 2.06 | 44.1 ± 2.0* | 33.1 ± 1.3 | 31.2 ± 1.2 |
| T-general lymphocytes, % | 64.6 ± 1.8 | 56.8 ± 2.2 | 67.1 ± 1.7 | 64.9 ± 1.7 | 64.8 ± 1.7 |
| T-lymphocyte-helpers (SD4-cell), % | 37.9 ± 1.5 | 43.6 ± 2.9 | 43.9 ± 2.2* | 38.8 ± 1.9 | 37.7 ± 1.4 |
| T-lymphocyte-supressors (SD8-cell), % | 17.1 ± 0.9 | 13.6 ± 1.1 | 14.8 ± 1.1* | 16.6 ± 1.2 | 17.3 ± 0.9 |
| Stimulation index in LBTL on FHA | 28.8 ± 2.5 | 25.0 ± 2.8 | 27.7 ± 2.3 | 30.2 ± 2.5 | 30.3 ± 2.5 |
| Stimulation index in LBTL on endometrioid AG | 1.4 ± 0.1 | 3.6 ± 0.2 | 2.3 ± 0.2* | 1.6 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 |
| Tx/Ts ratio index | 2.2 ± 0.6 | 3.2 ± 1.8 | 2.9 ± 1.8* | 2.3 ± 1.5 | 2.8 ± 1.0 |
| T/B ratio index | 3.7 ± 0.2 | 2.5 ± 1.2 | 3.0 ± 1.2* | 3.6 ± 1.1 | 3.8 ± 1.0 |

**Note.** * — $p < 0.05$ — a significant degree of differences of state indices of healthy women and patients after treatment.



Матеріал, захищений авторським правом

**Показатели состояния Т-системы иммунитета у больных эндометриозом**

| Иммунологические показатели | Здоровые женщины | Больные эндометриозом 3–4 степени | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | до лечения | после лечения | | |
| | | | 10 сут | 1 мес | 6 мес |
| Т-акт. лимфоциты, % | 32,4 ± 0,87 | 43,2 ± 2,06 | 44,1 ± 2,0* | 33,1 ± 1,3 | 31,2 ± 1,2 |
| Т-общ. лимфоциты, % | 64,6 ± 1,8 | 56,8 ± 2,2 | 67,1 ± 1,7 | 64,9 ± 1,7 | 64,8 ± 1,7 |
| Т-лимф.-хелперы (СД4-кл.), % | 37,9 ± 1,5 | 43,6 ± 2,9 | 43,9 ± 2,2* | 38,8 ± 1,9 | 37,7 ± 1,4 |
| Т-лимф.-супрессоры (СД8-кл.), % | 17,1 ± 0,9 | 13,6 ± 1,1 | 14,8 ± 1,1* | 16,6 ± 1,2 | 17,3 ± 0,9 |
| Индекс стимуляции в РБТЛ на ФГА | 28,8 ± 2,5 | 25,0 ± 2,8 | 27,7 ± 2,3 | 30,2 ± 2,5 | 30,3 ± 2,5 |
| Индекс стимуляции в РБТЛ на эндометриоидный АГ | 1,4 ± 0,1 | 3,6 ± 0,2 | 2,3 ± 0,2* | 1,6 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 |
| Индекс соотношения Тх/Тс | 2,2 ± 0,6 | 3,2 ± 1,8 | 2,9 ± 1,8* | 2,3 ± 1,5 | 2,8 ± 1,0 |
| Индекс соотношения Т/В | 3,7 ± 0,2 | 2,5 ± 1,2 | 3,0 ± 1,2* | 3,6 ± 1,1 | 3,8 ± 1,0 |

**Примечание.** * — $p < 0,05$ — степень достоверности различий показателей состояния здоровых женщин и больных после лечения.

вого месяца, свидетельствует о снижении специфической сенсибилизации организма. Нормализация индексов соотношения Т-хелперов/Т-супрессоров, Т/В-лимфоцитов указывает на нормализацию процессов иммунорегуляции.

У 5% больных, которым не проводилась терапия криоконсервированной тканью фетальной вилочковой железы, не происходило нормализации менструального цикла, у 10% отмечались болевой синдром и проявления воспалительного процесса, у 12% развивались сочетанные формы генитального эндометриоза. Показатели Т-системы иммунитета у таких больных оставались существенно измененными весь период наблюдения.

Таким образом, выраженный клинический эффект влияния имплантаций криоконсервированной ткани фетальной вилочковой железы, по-видимому, связан с нормализацией функционирования Т-системы иммунитета, подавлением воспалительных реакций, предупреждением рецидивов заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Шторх В., Эммрих Й.* Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлюорисценции // Иммунологические методы.– М.: Медицина, 1987.– С. 254–268.
2. *Шютт Х.* Реакция бластформации лимфоцитов // Иммунологические методы.– М.: Медицина, 1987.– С. 294–302.
3. *Felsburg P. J., Edelmal R., Gilman R. H.* The active E-rosette test: correlation with delayted cutaneus hypersensitivity // J. Immunol.– 1976.– 116, № 4.– P. 110–113.
4. *Jondal M., Holm J., Windgrell H.* Surface markers on human T- and B-lymphocytes 1.a large population of lymfocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells // J. Exp. Med.– 1972.– № 136.– P. 207–222.


Поступила 13.10.98

Analysis of the data obtained demonstrates that in patients with the implantation of thymus cryopreserved fetal tissue a quantitative number of T-general lymphocytes recovers by the 10th day, T-active lymphocytes, T-helpers, T-supressors — by the end of the first month. A decrease in the lymphocyte stimulation index on an endometrioid antigen, observed to the end of the first month, testifies to the decrease in an organism's specific sensibilization. Indices normalization of T-helpers/T-supressors, T/B-lymphocytes ratio points to the normalization of the immune regulation processes.

In 5% of patients, not treated by the fetal thymus cryopreserved tissue therapy, the normalization of a menstrual cycle did not occured, in 10% a painful syndrome and the inflammatory process manifestations were observed, in 12% combined forms of genital endometriosis developped. Indices of the immunity T-system in such patients remained considerably changed within all observational period.

Thus, a manifested clinical effect of the fetal thymus cryopreserved tissue implantation influence is apparently related with the normalization of the immunity T-system functioning, suppresion of inflammatory reactions, prevention of the disease relapse.

## REFERENCES


1. *Shtorkh V., Emmrikh J.* Determinaton of cellular markers by means of the membrane immunofluorescence method // Immunological methods.– M.: Meditsina, 1987.– P. 254–268.
2. *Shutt H.* Reaction of lymphocyte blastformation // Immunological methods.– M.: Meditsina, 1987.– P. 294–302.
3. *Felsburg P.J., Edelman R., Gilman R.H.* The active E-rosette test: correlation with delayted cutaneus hypersensitivity // J. Immunol.– 1976.– 116, № 4.– P. 110–113.
4. *Jondal M., Holm J., Windgrell H.* Surface markers on human T- and B-lymphocytes 1. a large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells // J. Exp. Med.– 1972.– № 136.– P. 207–222.


Accepted in 13.10.98



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.351-006.6-08: 615.832.97

UDC 616.351-006.6-08: 615.832.97

# Интраоперационное криовоздействие в лечении рака прямой кишки

Ю. А. ВИННИК, А. Е. КОТЕНКО, Л. П. ЧИБИСОВ
*Харьковский институт усовершенствования врачей*

# Intraoperative Cryoeffect When Treating Rectal Cancer

Yu. A. VINNIK, A. E. KOTENKO, L. P. CHIBISOV
*Kharkov Institute of Advanced Physician's Training*

Изучены результаты лечения 238 больных раком прямой кишки (РПК). У 86 пациентов произведена брюшно-промежностная экстирпация (БПЭ) прямой кишки, у 119 — брюшно-анальная резекция (БАР), у 33 при БАР субоперационно выполнялась криофиксация (КФ) опухоли перед ее мобилизацией и удалением. Характер послеоперационных осложнений в этой группе не отличался от осложнений у пациентов группы без КФ. Показатели летальности составили 2,38, 3,45 и 0% соответственно. Рецидивы заболевания прослеживаются от 2 мес до 4 лет 2 мес. Количество последних в исследуемых группах составило 9,5, 7,76, 6,06%, различие не достоверно. Результаты четырехлетней выживаемости в группах достоверно не различались. Применение метода интраоперационной КФ опухоли позволяет расширить показания к БАР при опухолях нижне- и среднеампулярного отделов прямой кишки, не ухудшая непосредственных и отдаленных результатов.

Вивчено результати лікування 238 хворих на рак прямої кишки. У 86 пацієнтів проведено черевно-проміжна екстракція (ЧПЕ), у 119 — черевно-анальна резекція (ЧАР), у 33 при ЧАР субопераційно виконувалася кріофіксація (КФ) пухлини перед її мобілізацією й видаленням. Характер післяопераційних ускладнень у цій групі не відрізнявся від ускладнень у пацієнтів групи без КФ. Показники летальності склали 2,38, 3,45 та 0% відповідно. Рецидиви захворювання спостерігаються від 2 міс до 4 років 2 міс. Кількість останніх у групах, що досліджувались, склала 9,5, 7,7, 6,06%, відмінність не достовірна. Результати чотирирічного виживання в групах достовірно не відрізнялися. Застосування методу інтраопераційної КФ пухлини дозволяє розширити показання до ЧАР при пухлинах нижньо- та середньоампулярного відділів прямої кишки, не погіршуючи безпосередніх та віддалених результатів.

The results of treatment have been studied in 238 patients with rectum cancer. The abdominal-perineal extirpation of rectum (APE) has been done in 86 patients, the abdominal-anal resection of rectum (AAR) in 119 patients, the cryofixation of tumor (CF) was done in 33 patients during AAR before its mobilization and extirpation. The character of postoperational complications in this group did not differ from the complication in patients of the group without CF. The lethality indices were 2.38, 3.45 and 0% for each group. Recurrences of disease have been observed from 2 months to 4 years and 2 months. Their number in investigated groups were 9.5, 7.76, 6.06%, the difference is not reliable. The results of 4 years survival period in these groups did not differ. The application of method of interoperational cryofixation of tumor can extend the indications to AAR in tumor cases of low and middle ampullar rectal parts, without deterioration of the present and later results.

По данным ВОЗ, РПК занимает 4-е место в структуре онкологической заболеваемости, поэтому вопросы диагностики и лечения больных РПК остаются актуальными. На территории Украины в 1995 году заболеваемость РПК достигла у мужчин — 4,44%, у женщин — 4,9% и имеет тенденцию к дальнейшему увеличению [9].

Ведущим методом лечения РПК признан хирургический. Вместе с тем на протяжении последних десятилетий при использовании чисто хирургического лечения не наблюдается существенного улучшения отдаленных результатов (5-летняя выживаемость составляет 50–60% [3]. Поэтому до тех пор, пока не появится достойная альтернатива хирургическому вмешательству, задачи онкологов: совершенствовать методы радикальных операций, разрабатывать и широко внедрять в практику комбинированное и комплексное лечение с рациональным сочетанием факторов местного и общего воздействия на раковую болезнь [8].

С увеличением количества больных, излеченных от РПК, становятся актуальными вопросы трудовой и социальной реабилитации этих людей. На

According to the WHO data, rectal cancer (RC) takes the fourth place in the structure of oncological disease rate, so the questions of diagnostics and treatment of RC remain actual. At the territory of Ukraine in 1995 the RC disease rate approached to 4.44 for males and 4.9% for females and it has a tendency to following increase [9].

A surgical method is considered as a leading one for treating RC. Moreover within recent decades when using only surgical treatment no significant improvement in distant results was observed (5-years' survival makes 50–60%) [3]. So, untill an appropriate alternative to a surgical invasion will appear, the task of oncologists is to improve the methods of radical operations, to develop and widely introduce into practice a combined and complex treatment with a proper combination of factors of local and general effect on a cancer disease [8].

With an increase of the number of patients, successfully treated with RC, the tasks of working capacity and social rehabilitation for these patients become more actual. The percentage of patients with RC with a localization of a low limit from 3 to 8 cm makes from



Матеріал, захищений авторським правом

долю больных раком прямой кишки (ПК) с локализацией нижней границы от 3 до 8 см приходится до 57,3–67,6% [2]. У этих больных ранее широко применялись брюшно-промежностные экстирпации. Однако больные, у которых сформирован противоестественный анус, постоянно чувствуют свою неполноценность, эмоционально неустойчивы, нарушаются взаимоотношения в семьях [4, 5].

Основным правилом в хирургии РПК является соблюдение принципов онкологического радикализма (удаление прямой кишки с опухолью вместе с фасциальным футляром и зоной регионарного метастазирования) в сочетании со стремлением к максимальному сохранению функции органа, т.е. к выполнению сфинктерсохраняющих операций (ССО), которые способствуют их социальной реабилитации [5].

Цель исследования — сравнительный анализ непосредственных и отдаленных результатов лечения рака прямой кишки с интраоперационным криовоздействием (КВ).

Проводилось комбинированное лечение 238 больных РПК (мужчин — 118 (49,58%), женщин — 120 (50,42%), возраст больных — 29–76 лет, средний возраст — 58,8 лет) с обязательным радикальным хирургическим вмешательством на базе абдоминального отделения Харьковского областного клинического центра онкологического отделения (1994–1998 гг.). В исследование включены больные РПК нижне- и среднеампулярных отделов, ограниченных по высоте 7–8 см от анального кольца. В исследование не включены больные без четкой морфологической верификации диагноза, а также больные, которым выполнялись паллиативные операции.

Согласно международной классификации TNM (4-е изд.) по критерию Т пациенты были распределены следующим образом: $T_1$ — 2 (0,84%), $T_2$ — 109 (45,80%), $T_3$ — 118 (49,58%), $T_4$ — 9 (3,78%). По критерию N: $N_0$ — 177 (74,37%), $N_1$ — 52 (21,85%), $N_2$ — 9 (3,78%). По степени дифференцировки опухолевых клеток: $G_1$ — 39 (16,39%), $G_2$ — 149 (62,60%), $G_3$ — 44 (18,49%), недифференцированные формы опухоли — 6 (2,52%).

Было сформировано три группы больных: 1-я группа — 86 больных с предоперационной гамма-терапией и БПЭ; 2-я группа — 119 больных с предоперационной гамма-терапией и БАР; 3-я группа — 33 больных с предоперационной гамма-терапией и БАР с интраоперационным локальным криовоздействием на опухоль.

Проведенный анализ в исследуемых группах по полу, возрасту, анатомической форме роста, распространенности процесса, степени дифференцировки опухолевых клеток не выявил достоверных различий между ними ($P > 0,05$), что дало нам основание считать группы репрезентативными.

В зависимости от распространенности процесса всем больным проводилось предоперационное облучение от 20 до 40 Гр.

57.3 to 67.6% [2]. For treating such patients earlier the APE was widely used. However the patients with formed unnatural anus, constantly feel their deficiency, emotionally they are not stable, there are conflicts in their families [4, 5].

The main rule in RC surgery is meeting the principles of oncological radicalism (removal of rectum with the tumor together with fascial case and zone of regional metastatic spreading) in combination with the striving to a maximum preservation of organ function, that is to the performance of sphincter preserving operations (SPO), contributing to their social rehabilitation [5].

The aim of the study is a comparative analysis of direct and distant results in treating rectal cancer with intraoperational cryoeffect (IC).

A combined treatment was done for 238 patients (males — 118 (49.58%), females — 120 (50.42%), patients age was 29–76 years, an average age was 58.8 years) with RC with an obligatory radical surgical invasion on the base of abdominal department of Kharkov Regional Clinical Oncological Dispensary (1994–1998). The patients with RC of low and middle ampullar parts, limited by the height 7–8 cm from an anal ring, were included into the study. The patients with a distinct morphological varification of the diagnosis, as well as the patients, who were palliatively operated, were not included into the investagation.

According to international classification TNM (the fourth edition) on the T criterion the patients were distributed on the following way: $T_1$ — 2 (0.84%), $T_2$ — 109 (45.80%), $T_3$ — 118 (49.58%), $T_4$ — 9 (3.78%). On the N criterion: $N_0$ — 177 (74.37%), $N_1$ — 52 (21.85%), $N_2$ — 9 (3.78%). On the degree of tumor cells differentiation: $G_1$ — 39 (16.39%), $G_2$ — 149 (62.60%), $G_3$ — 44 (18.49%), non-differentiated tumor forms — 6 (2.52%).

Three groups of patients were formed: the 1st — 86 patients with preoperational gamma-therapy and APE; the 2nd — 119 patients with preoperational gamma-therapy and AAR; the 3rd — 33 patients with preoperational gamma-therapy and AAR with intraoperational local cryoeffect on a tumor.

The conducted analysis in studied groups on sex, age, anatomical form of the growth process spreading, degree of differentiation of tumor cells did not reveal statistically significant differences between them ($P > 0.05$), that allowed us to consider the groups as representative ones.

Depending on the process spreading, all patients were irradiated prior to operation from 20–40 Gr.

When operatively treating we applied cryogenic treatment of a tumor — cryofixation, allowing to fix the tumor cells in a frozen site, to block lymphatic and blood vessels by ice thrombuses. The method is applied with the aim of ablastics, for its control a cytological study of lavaging waters from a small pelvis cavity, as well as cytological study of blood during mobilization from an upper rectal vein.



Матеріал, захищений авторським правом

При оперативном лечении нами применялась криогенная обработка опухоли — криофиксация, позволяющая фиксировать опухолевые клетки в замороженном участке, блокировать ледяными тромбами лимфатические и кровеносные сосуды. Метод применим с целью абластики, для ее контроля использовалось цитологическое исследование промывных вод из полости малого таза, а также цитологическое исследование крови при мобилизации из верхней прямокишечной вены.

Криовоздействие на опухоль ПК выполнялось аппаратом "Мороз-ММ", который разработан на производственном объединении "Монолит" (г. Харьков). Аппарат ЯЕВИ-941615.001 ПС состоит из электронного блока ЯЕВИ-943119.005, заправочного устройства ЕЖ-5.443.140, криозонда, комплекта сменных аппликаторов. Для облегчения работы в полости ПК были дополнительно разработаны и внедрены в практику ректальный цилиндр с боковым рабочим окном, а также целый ряд адаптированных крионасадок для выполнения КВ на циркулярные опухоли и опухоли, занимающие 1/3 или 1/2 окружности ПК. Хладоагентом использовали жидкий азот. Наша методика состоит в следующем: после лапаротомии и ревизии органов брюшной полости, уточнив распространенность опухолевого процесса и убедившись в отсутствии отдаленных метастазов, перед началом мобилизации ПК выполняется девульсия ануса и трансанально вводится ректальный цилиндр с внутренним стержнем, затем последний удаляется, это дает возможность без лишней травмы сфинктерного аппарата подвести цилиндр к опухоли. Визуально оценивается расположение опухоли в просвете кишки и при необходимости она выводится в рабочее окно ректального цилиндра, после этого через цилиндр проводится криозонд с адаптированными к опухоли криоаппликаторами и выполняется криосеанс 7–8 мин, после чего начинаются мобилизация ПК с опухолью и ее удаление. Температура, измеряемая электронным термометром, на поверхности опухоли составляла –40, а в глубине –24 °С. Глубина заморозки опухоли 8–10 мм*. Отогрев аппликатора самопроизвольный 3–4 мин, удаляли криозонд и ректальный цилиндр, после этого продолжали операцию. Криовоздействие не усложняло выделение кишки с опухолью, только в 2-х случаях (6,6 ± 4,32%) при выделении был вскрыт просвет, но не на самой опухоли, а на противоположной стенке ПК и ниже опухоли. Количество повреждений просвета кишки в этой группе достоверно не отличается от количества таковых в первой и второй группах ($P > 0,05$). В первой и второй группах процент повреждения просвета кишки при выполнении операции существенно не различался и составлял 9,5 ± 3,16 и 9,1 ± 2,64% соответственно ($P > 0,05$).

* Для гарантированной криодеструкции целесообразно выполнить 2 цикла замораживания–оттаивания.

The cryoeffect on RC tumor was conducted by means of "Moroz-MM", elaborated at the "Monolit" productional unit (Kharkov). YEVI-941615.001 PC apparatus consists of an electrone block YEVI 943119.005, supplying device EZh 5.443.140, cryoprobe, a set of disposable applicators. To facilitate the work in the rectum cavity a rectal cylinder with a side operating window, as well as the whole series of adapted cryonozzle to conduct the cryoeffect to circular tumors and ones taking 1/3 or 1/2 of rectum circle were additionally developed and introduced into practice. A liquid nitrogen was used as a cooling agent. Our methods include the following: after laparotomy and revision of abdominal cavity organs, after elucidation of the spreading of tumor process and to be sure as for the absence of distant metastases, before the start of rectum mobilization, the anus devulsion is done and a rectal cylinder with an inner rod is transanally introduced, than the latter is removed, this gives us the possibility without a side trauma of sphincter apparatus to approach the cylinder to a tumor. The location of tumor in an intestine lumen is visually estimated and in the case of necessity it is taken into an operating window of rectal cylinder, after this through the cylinder the cryoprobe with adapted to a tumor cryoapplicators is taken out and cryosession within 7–8 min is performed, after this the rectum mobilization with a tumor and its removal start. The temperature was measured by electrone thermometer on the tumor surface made –40 and in the depth –24 °C. The tumor freezing depth is 8–10 mm*. An applicator thawing is spontaneous (3–4 min), cryoprobe and rectal cylinder were removed, after that the operation was continued. Cryoeffect did not make difficult the isolation of intestine with a tumor, but in two cases (6.6 ± 4.32%) after isolation the lumen was opened, but not on the tumor itself, and on an opposite wall of the rectum and lower the tumor. The number of damages of intestine lumen in this group does not statistically differ from the quantity of those in the first and second groups ($P > 0.05$). In the first and the second groups the percentage of damage of an intestine lumen when conducting the operation did not significantly differ and made 9.5 ± 3.16 and 9.1 ± 2.64%, correspondingly ($P > 0.05$)..

To control an ablastics of conducted operative invasions we applied a cytological investigation of lavaging waters from the cavity of small pelvis. The material for investigation was taken during the operation after the removal of preparation (rectum with tumor) or ceasing the stage of transplant bringing down through an anal ring.

A comparative analysis in studied groups with cryofixation and without it showed, that cytological picture of lavaging waters had qualitative differences (Fig. 1). In patients without cryofixation the tumor

* For guaranteed cryodestruction it is expedient to conduct 2 cycles of freeze-thawing.



Матеріал, захищений авторським правом

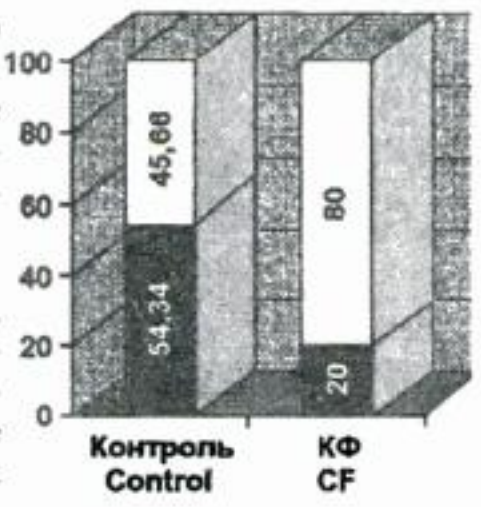



**Рис. 1.** Наличие опухолевых клеток в промывных водах малого таза в зависимости от интраоперационной КФ опухоли: белые столбцы — отрицательный результат; черные — положительный.

**Fig. 1.** Presence of tumor cells in lavaging waters of small pelvis depending on intraoperational cryofixation of the tumor: white colomns — negative result; black colomns — positive result.

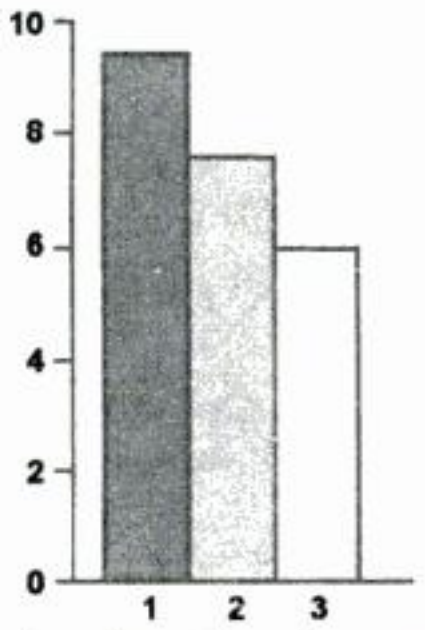



**Рис. 2.** Динамика возникновения рецидивов в исследуемых группах: 1 — БПЭ; 2 — БАР; 3 — БАР с криоводействием.

**Fig. 2.** The dynamics of relapses occurence in the investigated groups: 1 — APE; 2 — AAR; 3 — AAR with cryoeffect.

Для контроля абластики выполняемых оперативных вмешательств нами применялось цитологическое исследование промывных вод из полости малого таза. Материал для исследования брали при выполнении операции — после удаления препарата (прямая кишка с опухолью) или завершения этапа низведения трансплантата через анальное кольцо.

Сравнительный анализ в исследуемых группах с КФ и без нее показал, что цитологическая картина промывных вод имеет качественные отличия (рис. 1). У больных без КФ опухолевые клетки в промывных водах выявлены в 54,34 ± 7,34%, в то же время у больных с КФ — в 20 ± 7,30% случаев. Анализируемая разность значений выявления опухолевых клеток в промывных водах при выполнении хирургических вмешательств достоверна ($P < 0,05$).

После операции в первой группе умерли 2 (2,38 ± 1,64%) больных. Причина летальных исходов: перитонит и гнойно-воспалительные осложнения в малом тазу. Во второй группе умерли 4 (3,45 ± 1,67%) больных: от перитонита — 2 (1,68 ± 1,18%), инфаркта миокарда — 1 (0,84 ± 0,83%), острой сердечно-сосудистой недостаточности — 1 (0,84 ± 0,83%). В третьей группе летальных исходов не было (0 ± 3,00%). Летальность во всех трех группах достоверно не различается ($P > 0,05$), но отмечается тенденция снижения летальности в группе БАР с КФ.

Сравнительный анализ замыкательной функции ПК в исследуемых группах показал, что через 12 мес хорошая замыкательная функция отмечена у 20,83 % в первой группе и 22,73% — во второй, удовлетворительная — у 70,83% в первой группе и 68,18% — во второй, неудовлетворительная — у 8,33% в первой и 9,09% — соответственно во второй. Показатели восстановления замыкательной функции в исследуемых группах достоверно сравнимы.

Рецидивы заболевания в исследуемых группах больных прослеживаются от 2 мес до 4 лет 2 мес. Количество рецидивов в первой группе — 8 (9,52 ± 3,16%), второй — 9 (7,76 ± 2,45%), третьей — 2 (6,06 ± 4,15%), их количество в группах достоверно не различается ($P > 0,05$). Динамика возникновения рецидивов опухоли представлена на рис. 2.

Динамика отдаленной выживаемости радикально оперированных больных раком прямой кишки рассчитана по интервальному методу построения

cells in lavaging waters were revealed in 54.34 ± 7.34%, at the same time in the patients with cryofixation — 20 ± 7.30%. Analyzed difference between the values of revealed tumor cells in lavaging waters during surgical invasions was statistically true ($P < 0.05$).

After opeartion in the first group 2 (2.38 ± 1.64%) patients died. The cause of lethality was peritonitis and pyo-inflammatory complications in a small pelvis. In the second group 4 (3.45 ± 1.67%) patients died: from peritonitis — 2 (1.68 ± 1.18%), miocardium infarctions — 1 (0.84 ± 0.83%), an acute cardiovascular insufficiency — 1 (0.84 ± 0.83%). In the third group no lethality was observed (0 ± 3.00%). The lethality in all groups does not statistically differ ($P > 0.05$), but there is a tendency for the lethality reduction in the AAR group with cryofixation.

A comparative analysis of rectum locking function in the grous under study showed, that in 12 months a good locking function was found in 20.83% in the first group and 22.73% in the second one, a satisfactory function was oberved for the 70.83% in the first group and 68.18% in the second, non-satisfactory in 8.33% in the first group and 9.09% in the second, correspondingly. The indices of the recovery of a locking function in the investigated groups were statistically and significantly comparable.

The disease relapses in the studied groups of patients were observed from 2 months upto 4 years and 2 months. The number of relapses in the first group was 8 (9.52 ± 3.16%), in the second — 9 (7.76 ± 2.45%), in the third — 2 (6.06 ± 4.15%), their number in the groups did not significantly differ ($P < 0.05$). The dynamics of tumor relapse occorence is presented in Fig. 2.

The dynamics of a distant survival of radically operated patients with rectal cancer was calculated on an interval method of the composing longevity tables. The 4 years' survival in the groups with APE, AAR and AAR with cryoeffect does not staitistically differ: the first group — 54,30 ± 7,79%, the second one — 57,19 ± 4,68%, the third one 61,11 ± 9,35% ($P < 0.05$).

The calculation of an average longevity did not also reveal a statistically significant difference in these groups, however there was a tendency to a survival increase in the group of patients after AAR with cryoeffect.



Матеріал, захищений авторським правом

таблиц дожития. Четырехлетняя выживаемость в группах с БПЭ, БАР и БАР с криовоздействием статистически достоверно не отличается: 1-я группа – 54,30 ± 7,79%; 2-я группа – 57,19 ± 4,68%; 3-я группа – 61,11 ± 9,35% ($P > 0,05$).

Расчет средней продолжительности жизни также не выявил достоверного различия в этих группах, хотя отмечалась тенденция увеличения выживаемости в группе больных после БАР с криовоздействием.

Таким образом, методика применения интраоперационного локального КВ целесообразна и перспективна для комбинированного лечения опухолей дистальных отделов ПК с нижней границей опухоли до 8 см, с распространенностью процесса $T_1$–$T_3$, $N_0$–$N_1$, с экзофитным типом роста опухоли и различной степенью дифференцировки аденокарциномы. Применение метода интраоперационного КВ на опухоль позволяет расширить показания к ССО при раке нижне- и среднеампулярного отделов прямой кишки. При этом не происходит увеличения количества послеоперационных осложнений и летальности, улучшается абластика оперативного вмешательства, не увеличивается количество местных рецидивов, не ухудшается показатель средней продолжительности жизни.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Барсуков Ю.А., Царюк В.Ф., Ким Г.Х.* Влияние предоперационного облучения на результаты сфинктерсохраняющих операций при комбинированном лечении рака прямой кишки // Мед. радиология.– 1990.– Т. 35, № 9.– С. 49–50.
2. *Бондарь Г.В., Барсуков Ю.А., Башеев В.Х.* Органосохраняющие резекции прямой кишки при раке // Хирургия.– 1988.– № 11.– С. 12–15.
3. *Воробьев Г.И., Одарюк Т.С., Симакина Е.П. и др.* Комплексное лечение рака прямой кишки // Рос. онкол. журн.– 1998.– № 3.– С. 43–47.
4. *Дедков И.П., Черниченко В.А.* Комбинированное лечение злокачественных опухолей.– Киев: Здоров'я, 1975.– 183 с.
5. *Зыбина М.А.* Диагностика и лечение рака прямой кишки.– Киев: Здоров'я, 1980.– 166 с.
6. *Кныш В.И., Бондарь Г.В., Алиев Б.М., Барсуков Ю.А* Комбинированное и комплексное лечение рака прямой кишки.– М.: Медицина, 1990.– 158 с.
7. *Рак* прямой кишки / Под ред. В. Д. Федорова.– М.: Медицина, 1987.– 319 с.
8. *Симонов Н.Н., Гуляев А.В., Правосудов И.В. и др.* Современные подходы к радикальному хирургическому и комбинированному лечению рака прямой кишки // Вестн. хирургии им. Грекова.– 1997.– Т. 156, № 6.– С. 27–30.
9. *Федоренко З.П., Байкшнарас О.Б., Гуселетова Н.В., Лімішина О.М.* Стан протиракової боротьби та медико-статистичний аналіз розповсюдженості злоякісних новоутворень на Україні в 1992–1994 рр.– Київ, 1995.– 121 с.
10. *Duncan W.,Smith A.W., Freedman L.F. et al.* Clinico-pathological features of prognostic significance in operable rectal cancer in 17 centers in the U.K. // General Hospit.– 1984.– V. 50, № 4.– P. 435–442.


Поступила 09.04.99

Thus the methods of application of intraoperational local cryoeffect are expedient and perspective for a combined teatment of tumors of rectum distal parts with a low limit of tumor up to 8 cm with the process spreading of $T_1$–$T_3$, $N_0$–$N_1$, with exophite type of tumor growth and different degree of adenocarcinoma differentiation. The application of intraoperational cryoeffect method on a tumor allows to extend the indications to SPO for the cancer of low and middle ampullar parts of a rectum. In this case no increase in the number of postoperative complications and lethality is observed, ablastics of operative invasion increases, the number of local relapses does not increase, the index of an average longevity does not aggravate.

## REFERENCES


1. *Barsukov Yu.A., Tsaryuk V.F., Kim G.Kh.* The effect of preoperational irradiation on the results of sphincter-preserving operations during a combined treatment of rectal cancer // Medical Radiology.– 1990.– 35, № 9.– P. 49–50.
2. *Bondar G.V., Barsukov Yu.A., Basheyev V. Kh.* Organ preserving resections of rectal in cancer cases // Surgery.– 1988.– № 11.– P. 12–15.
3. *Vorobyev G.I., Odaryuk T.S., Simakina E.P. et al.* Complex treatment of rectal cancer // Russian Oncological Journal.– 1998.– № 3.– P. 43–47.
4. *Dedkov I.P., Chernichenko V.A.* Combined treatment of malignant tumors.– Kiev: Zdorov'ya, 1975.– 183 p.
5. *Zybina M.A.* Diagnostics and treatment of rectal cancer treatment.– Kiev: Zdorov'ya, 1980.– 166 p.
6. *Knysh V.I., Bondar G.V., Aliev B.M., Barsukov Yu.A.* Combined and complex treatment of of rectal cancer treatment.– M: Meditsina, 1990.– 158 p.
7. *Rectal* cancer / Ed. by V.D. Fedorov.– M.: Meditsina, 1987.– 319 p.
8. *Simonov N.N.,Gulyaev A.V., Pravosudov I.V. et al.* Modern appraoches to a radical surgical and combined treatment of rectal cancer // Proc. of Surgery, named after Grekov.– 1997.– 156, № 6.– P. 27–30.
9. *Fedorenko Z. P., Baikshnaras O. B, Guseletova N. V., Limishina O. M.* State of anticancer fighting and medicostatistical analysis of spreading of malignant tumors in Ukraine in 1992–1994.– Kyiv, 1995.– 121 p.
10. *Duncan W., Smith A.W., Freedman L.F. et al.* Clinico-pathological features of prognostic significance in operable rectal cancer in 17 centers in the UK // General Hospit.– 1984.– 50, № 4.– P. 435–442.


Accepted in 09.04.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.612.111 UDC 57.043.612.111

# Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу

О. П. СЫНЧИКОВА

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

# Glucopyranosides Effect on Human Erythrocyte Resistance to Hyperosmotic Stress

O. P. SYNCHYKOVA

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

Гиперосмотический стресс является одним из основных факторов криоповреждения клеток. Поэтому для моделирования ситуации, имеющей место при замораживании, эритроциты переносили при положительных температурах в высококонцентрированные солевые растворы. Как насыщение клеток глюкозой [2], так и предварительная дегидратация эритроцитов снижают уровень гиперосмотического лизиса [3]. Известно, что некоторые производные глюкопиранозида защищают эритроциты от гипотонического повреждения [6, 7]. В то же время гипертонический лизис клеток практически не изучен, хотя представляет значительный интерес для криобиологии.

Цель работы — изучение влияния представителей гомологичного ряда алкил-β,D-глюкопиранозидов, относящихся к неионным амфифилам, на чувствительность эритроцитов к действию гиперосмотического стресса.

Объектом исследования служили эритроциты, которые получали из донорской крови II группы по стандартной методике [3]. Гиперосмотический шок осуществляли перенесением клеточной суспензии в 4,0 М раствор NaCl. Конечный гематокрит $3.1\times10^{-3}$. Кинетику гиперосмотического гемолиза регистрировали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности суспензии эритроцитов при длине волны 720 нм в кювете с постоянным перемешиванием. Все среды готовили на 5 мМ фосфатном буфере.

В работе использовали гексил-β,D-глюкопиранозид (С6), октил-β,D-глюкопиранозид (С8), децил-β,D-глюкопиранозид (С10) производства фирмы Calbiochem и реактивы отечественного производства квалификации ХЧ и ЧДА.

При перенесении эритроцитов в 4,0 М раствор NaCl клетки разрушаются и лизируют. Если в лизирующей среде в момент внесения клеток присутствуют глюкопиранозиды в определенных концентрациях, то уровень гиперосмотического гемолиза значительно снижается. Оптимальные концентрации и максимальная антигемолитическая активность веществ в условиях гиперосмотического стресса клеток представлены в таблице. Видно, что с ростом алкильной цепи глюкопиранозида концент-

Hyperosmotic stress is one of the main factors of cell cryodamage. Therefore for the modelling of a situation, taking place during freezing, the erythrocytes were transferred under positive temperatures into highly concentrated salt solutions. Both the saturation of cells with glucose [2], and preliminary dehydration of erythrocytes reduce the level of hyperosmotic lysis [3]. It is known, that some derivatives of glucopyranoside protect erythrocytes against hypotonic damage [6, 7]. At the same time hypertonic lysis of cells is practically not studied, but is of a significant interest for cryobiology.

The aim of the work is the investigation of the effect of alkyl-β,D-glucopyranosides, referred to non-ionic amphiphiles, on the sensitivity of erythrocytes to the effect of hyperosmotic stress.

Erythrocytes, obtained from a donor's blood of the II-nd group according to standard methods [3] served as an object of this study. Hyperosmotic shock was accomplished by means of the transfer of cellular suspension into 4.0 M NaCl solution. Final hematocrit made $3.1\times10^{-3}$. Hyperosmotic lysis kinetics was spectrophotometrically recorded by a reduction of optical density of erythrocyte suspension at the wavelength of 720 nm in a cuvette with a constant stirring. All media were prepared in 5 mM phosphate buffer.

In the work hexyl-β,D-glucopyranoside (C6), octyl-β,D-pyranoside (C8), decyl-β,D-glucopyranoside (C10) of Calbiochem firm production and reagents of home production of the "chemically pure" and "pure for analysis" were used.

When removing erythrocytes into 4,0 M NaCl solution the cells destroyed and lysed. If in a lysing medium in the moment of cell introduction there are glucopyranosides in certain concentrations, then the level of hyperosmotic hemolysis significantly decreases. Optimal concentrations and maximum antihemolytical activity of substances under conditions of hyperosmotic stress of the cells were presented in the Table. It is evident, that with the growth of glucopyranoside alkyl chain the concentration, under which maximum antihemolytical effect is observed, reduces by one order for every two $-CH_2$ groups. With an increase in the length of alkyl chain an antihemolytical activity of substances increases from 75% for C6 up to 90% for C8 and C10.

**Антигемолитическая активность алкил-β,D-глюкопиранозидов при концентрациях, обеспечивающих максимальный защитный эффект эритроцитов в условиях гиперосмотического стресса**

| Вещество | Блокирующая концентрация, мМ | Антигемолитическая активность, % |
|---|---|---|
| Гексил-β,D-глюкопиранозид | 2,8 | 76 |
| Октил-β,D-глюкопиранозид | 0,45 | 86 |
| Децил-β,D-глюкопиранозид | 0,03 | 88 |

**Antihemolytical activity of alkyl-β,D-glucopyranosides under concentrations, providing a maximum protective effect of erythrocytes under the conditions of hyperosmotic stress**

| Substance | Blocking concentration, mM | Antihemolytical activity, % |
|---|---|---|
| Hexyl-β,D-glucopyranoside | 2.8 | 76 |
| Octyl-β,D-glucopyranoside | 0.45 | 86 |
| Decyl-β,D-glucopyranoside | 0.03 | 88 |



Матеріал, захищений авторським правом

рация, при которой наблюдается максимальный антигемолитический эффект, снижается примерно на порядок на каждые две -$CH_2$ группы. С увеличением длины алкильной цепи антигемолитическая активность веществ возрастает от 75% для С6 до 90% для С8 и С10.

При действии высокой тоничности среды в мембране эритроцита образуются дефекты, которые в зависимости от условий среды могут увеличиваться до размера гемолитической поры. Исходя из того, что глюкопиранозиды оказывают защитное действие в условиях как гипотонического [6, 7], так и гиперосмотического стресса, можно предположить, что эффект этих соединений обусловлен их способностью влиять на процессы, связанные с эволюцией гемолитической поры.

Было показано, что амфифильные соединения, в том числе и децил-β,D-глюкопиранозид, в концентрациях, при которых наблюдается максимальный и полумаксимальный антигемолитический эффект при гипотоническом лизисе, оказывают влияние на состояние мембраны, что проявляется в изменении ее проницаемости для ионов калия и фосфата [7]. Оптимальные концентрации веществ при гиперосмотическом стрессе гораздо ниже, чем соответствующие величины концентраций при гипотоническом гемолизе. Для децил-β,D-глюкопиранозида концентрации отличаются в 25 раз. Если данное соединение использовали в концентрации 0,3 мМ, что соответствует максимальной защите эритроцитов при гиперосмотическом гемолизе, изменений транспортных характеристик мембраны не наблюдалось [7].

Кинетические кривые изменений оптической плотности суспензии эритроцитов в зависимости от времени внесения гексилглюкопиранозида в лизирующую среду представлены на рис. 1. Кривая *1* отражает развитие гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl. Кинетика гиперосмотического лизиса в присутствии блокирующей концентрации С6 представлена кривой *2*. Кривые *3–6* отражают ситуацию, когда вещество вносится в кювету после запуска литического процесса через определенные временные интервалы. Аналогичные данные для С8 и С10 представлены на рис. 2.

Очевидно, максимальный защитный эффект всех исследуемых глюкопиранозидов наблюдается лишь тогда, когда вещество присутствует в лизирующей среде в момент действия осмотического стресса. Подобная закономерность была обнаружена ранее для катионных амфифильных соединений [1, 4]. При изменении постановки эксперимента, когда добавление вещества производится после начала гиперосмотического лизиса эритроцитов, защитный эффект уменьшается и через 50 с наблюдается полное отсутствие блокирования гемолиза (рис. 2).

Исходя из того, что процесс гемолиза происходит по принципу "все или ничего" [5], а эритроциты представляют собой достаточно гетерогенную популяцию, можно предположить, что развитие гиперосмотического лизиса во времени (около 3-х минут) обусловлено последовательным повреждением различных субпопуляций эритроцитов. Тот факт, что глюкопиранозиды, внесенные в лизирующую среду после запуска литического процесса, протектируют клетки, позволяет считать, что защищенными являются те клетки, которые по той или иной причине не начали лизировать несколько позже. Защитный эффект амфифильных соединений в данном случае может быть связан с их способностью изменять физико-химические свойства мем-

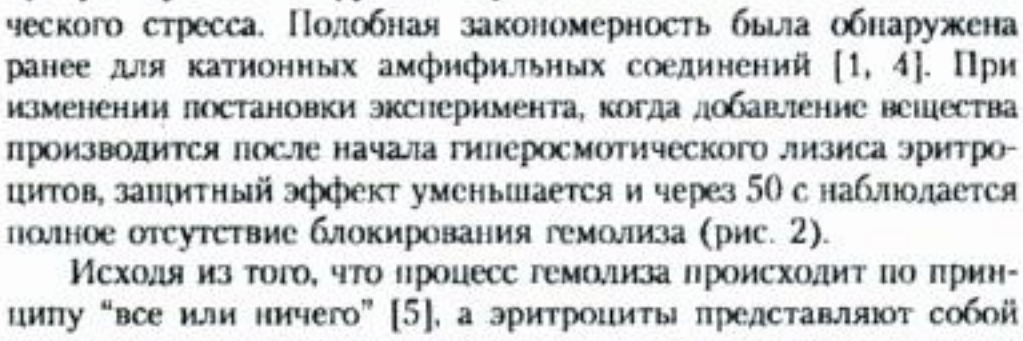



**Рис. 1.** Изменение во времени оптической плотности суспензии при лизисе эритроцитов в 4,0 М NaCl: *1* – лизис клеток при отсутствии С6; *2–6* – добавление С6 через 0, 5, 10, 25 и 50 с после начала гиперосмотического лизиса.

**Fig. 1.** The change in time of optic density of suspension at erythrocyte lysis in 4.0 M NaCl: *1* – cell lysis without C6; *2–6* – an addition of C6 in 0, 5, 10, 25 and 50 sec after the start of hyperosmotic lysis.

Under the effect of a high medium tonicity in the erythrocyte membrane the defects form, they may be increased depending on the medium conditions up to the size of hemolytical pore. Taking into consideration that glucopyranosides cause a protective effect both under conditions of hypotonic [6, 7] and hyperosmotic stress, one can suppose that the effect of these compounds is stipulated by their ability to affect the processes, connected to the evolution of a hemolytical pore.

It has been demonstrated, that amphiphilic compounds, including decyl-β,D-glucopyranoside, under concentrations when a maximum and half-maximum antihemolytical effect at a hypotonic lysis is observed, cause the effect on a membrane state, that manifests in the change of its permeability for potassium and phosphate ions [7]. Optimal concentrations of substances at hyperosmotic stress are much lower, than corresponding values of concentrations at hypotonic lysis. For decyl-β,D-glucopyranoside the concentrations differ in 25 times. If given compound is used in the concentration of 0.3 mM, that corresponds to a maximum protection of erythrocytes at hyperosmotic hemolysis, then no changes in transport characteristics are observed [7].

Kinetic curves of the changes in optical density of suspension of erythrocytes depending on a time of the introduction of hexylglucopyranoside into a lysing medium are presented in Fig. 1. The curve *1* reflects the development of hemolysis of eryhtrocytes in 4.0 M NaCl. Hyperosmotic lysis kinetics in the presence of blocking concentration C6 is presented by the curve *2*. The curves *3–6* reflect the situation, when the substance is placed into a cuvette after the triggering of lytic process in certain time intervals. Similar data for C8 and C10 are presented in Fig. 2.

It is evident, that a maximum protective effect in all studied glucopyranosides is observed only when the substance exists in a lysing medium at the moment of osmotic stress effect. Similar regularity was found earlier for cation amphiphilic compounds [1, 4]. Changing the experiment protocol, when the addition of substance is accomplished after the start of hyperosmotic lysis of erythrocytes, a protective effect reduces and in 50 sec a complete absence of hemolysis blocking is observed (Fig. 2).

Taking into account, that the process of hemolysis occurs according to the "everything or nothing" principle [5], and erythrocytes represent quite a heterogenous population, one can suppose that the development of hyperosmotic lysis in a time (about 3 minutes) is stipulated by a subsequent damage of different subpopulations of erythrocytes. That fact, that glucopyranosides, placed into a lysing medium after the triggering of lytic processs, protect the cells, allows to assume, that the cells started to lyse a little later due to a this or that reason, can be considered as protected ones. Protective effect of amphiphilic compounds in this case can be related to their ability to change physical and chemical membrane properties. During the building-in of amphiphilic compounds into a membrane there is its perturbation, in the result of what the living time of transmembrane pore may change.

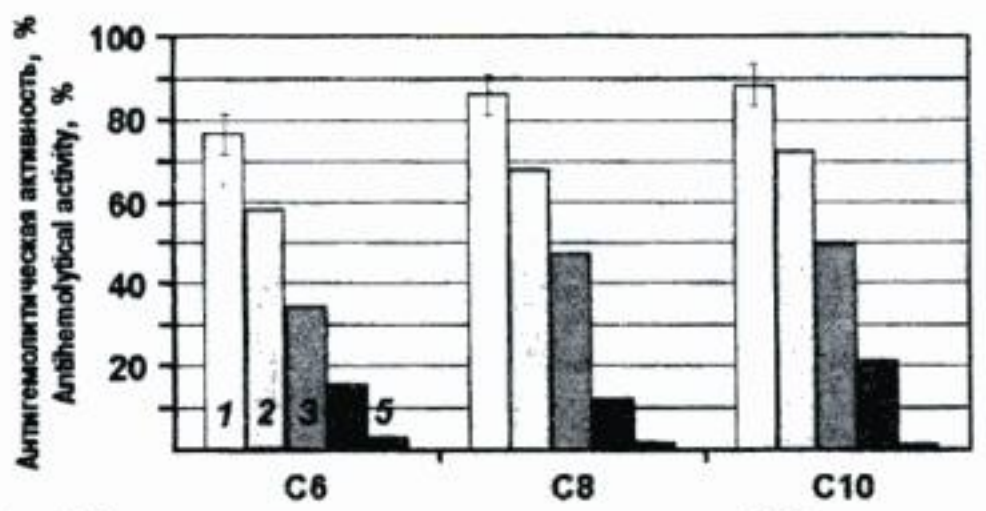



**Рис. 2.** Антигемолитическая активность алкил-β,D-глюкопиранозидов при перенесении эритроцитов в 4,0 М NaCl (температура 22 °С). *1–5* – добавление вещества в блокирующих концентрациях через 0, 5, 10, 25, 50 с после начала гиперосмотического лизиса.

**Fig. 2.** Antihemolytical activity of alkyl-β,D-pyranosides when transferring the erythrocytes into 4.0 M NaCl (temperature of 22 °C). *1–5* – addition of the substance of blocking concentrations after the start of hyperosmotic lysis in 0, 5, 10, 25, 50 sec.



Матеріал, захищений авторським правом

браны. При встраивании амфифильных соединений в мембрану происходит ее пертурбация, в результате чего может изменяться время жизни трансмембранной поры.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Дунаевская О. Н., Шпакова Н. М.* Защитный эффект трифторперазина при гиперосмотическом шоке эритроцитов // Укр. биохим. журн.– 1997.– 69, № 2.– С. 30–34.
2. *Мельникова О. В., Бондаренко Т. П.* Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу // Физико-химические процессы в криобиологических системах.– Харьков, 1991.– С. 68–78.
3. *Позднияков В. В.* Влияние состава и осмолярности среды на устойчивость эритроцитов к температурному шоку: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 16 с.
4. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
5. *Akeson S. P., Mel H. C.* Osmotic hemolysis and fragility. A new model based on membrane disruption, and a potential clinical test // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– 79.– P. 201–211.
6. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not casually related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
7. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.* Permeability alterations and antiheamolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.


Поступила 02.06.99

## REFERENCES


1. *Dunaevskaya O. N., Shpakova N. M.* Protective effect of thriphtorperazine at hyperosmotic shock of erythrocytes // Ukr. Biochem. J.– 1997.– 69, № 2.– P. 30–34.
2. *Melnikova O. V., Bondarenko T. P.* Modifying effect of glucose on the sensitivity of erythrocytes to temperature and osmotic stress // Physical and chemical processes in cryobiological systems.– Kharkov, 1991.– P. 68–78.
3. *Pozdnyakov V. V.* The effect of composition and osmolarity of the medium on resistance of eryhtrocytes to a temperature shock: Author's abstract of PhD (biology) thesis.– Kharkov, 1989.– 16 p.
4. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A.* Antihemolytical effect of chlorpromazine at hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biochemistry.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
5. *Akeson S. P., Mel H. C.* Osmotic hemolysis and fragility. A new model based on membrane disruption, and a potential clinical test // Biochim. Biophys. Acta.– 1982.– 79.– P. 201–211.
6. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced antihaemolysis is not casually related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
7. *Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G., Engblom A.* Permeability alterations and antiheamolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– 860, № 3.– P. 510–524.


Accepted in 02.06.99



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.82: 576.2: 612.014: 423: 612.66

UDC 612.82: 576.2: 612.014: 423: 612.66

# Электроэнцефалограмма и морфофункциональные особенности головного мозга животных разного возраста при общем охлаждении

В. А. БОНДАРЕНКО

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

А. Е. КУТИКОВ, И. Н. НИКИШКОВА

*Национальный университет им. В. Каразина, г. Харьков*

# Electroencephalogram and Morphofunctional Peculiarities of Animals' Brain of Different Age at General Cooling

V. A. BONDARENKO

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

A. E. KUTIKOV, I. N. NIKISHKOVA

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

Исследовали электроэнцефалограмму (ЭЭГ) и морфофункциональные особенности структур головного мозга крыс-самцов пубертатного (3 мес.) и половозрелого (6 мес.) возраста под влиянием общего неоднократного охлаждения. Охлаждение осуществляли при 10 ± 1 °С, что для животных данного вида приближается к температурному порогу, ниже которого изменяется или прекращается протекание основных процессов, определяющих их развитие [5].

Регистрировали ЭЭГ неокортекса (НК), гиппокампа (ГПК), гипоталамуса (ГПТ) и миндалевидного комплекса (МК), регулирующих адаптивные реакции животных, и морфофункциональные особенности НК и ГПТ животных (интактных и после общего охлаждения).

Охлаждение животных обеих возрастных групп оказывало на структуры мозга, особенно на лимбико-гипоталамические, тормозное влияние, снижая десинхронизирующие и усиливая синхронизирующие процессы, подавляя судорожную активность, если она наблюдалась в исходной ЭЭГ. Особенно это отражалось на электрической активности мозга животных пубертатного возраста, которые, как известно, отличаются высоким уровнем судорожной готовности. В этой группе на ЭЭГ отмечалась более выраженная реактивность на влияние температурного фактора в ГПТ и МК. У 6-месячных животных после первого охлаждения более реактивным был НК с последующим вовлечением гипоталамо-лимбических образований. Такие процессы углублялись при повторных охлаждениях, когда наблюдались ЭЭГ-корреляты фрагментов медленного сна с акцентом в гипоталамо-лимбических структурах, более выраженные у половозрелых животных.

В тканях головного мозга животных пубертатного возраста преобладали изменения функционального характера: и в НК, и в ГПТ отмечалось повышение нейрональной активности, однако степень выраженности ее была различной. В НК признаки активации были выражены слабее, наблюдались участки выпадения нейронов. В ГПТ проявления повышенной функциональной активности нейронов были значительно выше: преобладали полиморфные гиперхромные клетки, разные по величине, форме, содержанию ядерного хроматина и белков цитоплазмы, т.е. те, которые находились на разных стадиях активации.

В мозге половозрелых животных превалировали деструктивные изменения. В НК, наряду с гиперхромными нейронами, преобладающими в верхних отделах, и нормохромными — в глубоких слоях коры, наблюдались периваскулярные и перицеллюлярные отеки, клеточные выпадения. В ГПТ преобладали

Electroencephalogram (EEG) and morphofunctional peculiarities of the brain structures of male rats of pubertant (3 months) and mature (6 months) age under the effect of general not single cooling were studied. Cooling was accomplished at 10 ± 1 °C, that for animals of given kind approaches to a temperature limit, lower which the course of the main processes, determining their development, changed or ceased [5].

One recorded EEG of neocortex (NC), hippocamp (HPPC), hypothalamus (HPT) and amygdaloid complex (AC), regulating animals' adaptive reactions and NC and HPT morphofunctional peculiarities of animals (intact and after general cooling ones).

Animals' cooling of both age groups caused on brain structures, especially on limbic and hypothalamic ones, an inhibitory effect, decreasing desynchronizing processes and strengthening synchronizing ones, supressing a spastic activity, if it was observed in an initial EEG. Especially it affected an electric brain activity of pubertant age animals, which, as it is known, differed by a high level of spastic readiness. More expressed reactivity on the temperature factor effect in HPT and MC was observed in this group in EEG. NC was more reactive with the following involving of hypothalamic-limbic formations after the first cooling in the animals of 6 months age. These processes became deeper during repeated coolings, when EEG-corellators of slow sleep fragments with the accent in hypothalamic-limbic structures, more manifested in mature animals, were observed.

In brain tissues of animals of pubertant age the changes of a functional character predominated: both in NC and HPT an increase in neuronal activity was noted, but the degree of its manifestation was different. Activation signs were manifested more slightly in NC, sites of neuron falling down were observed. In HPT the manifestations of an increased neuron functional activity were considerably higher: polymorphous hyperchromic cells, distinct by dimension, shape, content of a nuclear chromatin and cytoplasm proteins, i.e. locating in different activation stages, predominated.

In the mature animals' brain the destructive changes prevailed. In NC among with hyperchromic neurons, predominating in superior sections, and normochromic ones — in the cortex deep layers, perivascular and pericellular oedemas, cellular fallings down were noted. Normochromic neurons with a moderately vacuolizated cytoplasm, among with oedema signs, prevailed in HPT. Thus, the changes were less manifested and less destructive in HPT, than in NC. Consequently, general cooling caused a considerable effect on the state of the regulation cerebral mechanisms of an organism's functions, that was confirmed by the data [4].



Матеріал, захищений авторським правом

нормохромные нейроны с умеренно вакуолизированной цитоплазмой, наряду с признаками отека. Таким образом, в ГПТ изменения были менее выражены и менее деструктивны, чем в НК. Следовательно, общее охлаждение оказывало существенное влияние на состояние церебральных механизмов регуляции функций организма, что подтверждается и данными [4].

Известно, что разные экзо- и эндогенные факторы, в том числе и гипотермия, вызывают перестройки обменных процессов, имеющие приспособительный характер [2, 3]. В данной работе показано, что общее охлаждение в разной степени влияло на центральные и в первую очередь гипоталамо-лимбические регуляции общей активности животных обеих возрастных групп. С позиций теории функциональных систем П. К. Анохина [1] полученные результаты могут свидетельствовать о бо́льших адаптивных возможностях (изменения функционального характера) в пубертатном периоде, когда у животных происходит формирование системной организации приспособительных реакций, и меньших (дистрофические, деструктивные процессы) — у половозрелых животных с уже сформировавшейся системной организацией адаптивного поведения.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Анохин П. К.* Системные механизмы высшей нервной деятельности: Избр. труды.– М.: Наука, 1979.– 443 с.
2. *Бабийчук В. Г., Латогуз И. К.* Влияние краниоцеребральной гипотермии крыс на сопряжение окислительного фосфорилирования и дыхания митохондрий в тканях миокарда // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 3.– С. 60–61.
3. *Бажанова Е. Д., Черниговская Е. В., Данилова О. А.* Гипоталамическая регуляция функций коры надпочечника у старых и молодых крыс // Журн. эволюции биохим. и физиол.– 1998.– 34, № 2.– С. 233–239.
4. *Михайлик Т. А., Крикун Е. Н.* Морфологические изменения в переднем гипоталамусе и коре полушарий большого мозга после длительного охлаждения // Морфология.– 1998.– 113, № 3.– С. 81.
5. *Trudgill D. L.* Determining the thermal requirements of poikilothermic organisms and their significance // Cryo-Lett.– 1997.– 18, № 2.– P. 73.


Поступила 22.10.99

It is known, that different exo- and endogenic factors, including hypothermal cause the rearrangements of metabolic processes, possessing an adaptive character [2, 3]. In this work it has been demonstrated, that general cooling in a different extent affected central and first of all hypothalamic-limbic mechanisms of regulation of general activity for animals of both age groups. According to the theory of functional systems of P. K. Anokhin [1] the results obtained can testify to higher adaptive opportunities (changes of functional character) in pubertant period, when the formation of systemic organization of adaptive reactions takes place in animals and lower ones (dystrophic, destructive processes) in mature animals with alreday formed systemic organization of adaptive behavior.

## REFERENCES


1. *Anokhin P. K.* Systemic mechanisms of high nerve activity: Selected papers.– M.: Nauka, 1979.– 443 p.
2. *Babijchuk V. G., Latoguz I. G.* The effect of craniocerebral hypothermia of rats on conjigation of oxidative phosphorylation and respiration of mitochindria in miocardium tissues // Problems of Cryobiology.– 1997.– № 3.– P. 60–61.
3. *Bazhanova E. D., Chernigovskaya E. V., Danilova O. A.* Hypothalamic regulation of adrenal cortex functions in old and young rats // J. Biochemistry and Physiology Evolution.– 1998.– 34, № 2.– P. 233–239.
4. *Mikhajlik T. A., Krikun E. N.* Morphological changes in an anterior hypothalamus and cortex of brain semispheres after long-term cooling // Morphology.– 1998.– 113, № 3.– P. 81.
5. *Trudgill D. L.* Determining the thermal requirements of poikilothermic organisms and their significance // Cryo-Lett.– 1997.– 18, № 2.– P. 73.


Accepted in 22.10.99

Научный редактор *В. И. Луговой*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
*И. Г. Пятигорская*

Scientific Editor *V. I. Lougovoy*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подписано в печать 10.11. 99. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 9,3. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

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

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

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

**Subscription orders should be addressed to**

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3

1999

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Индекс 74390

Index 74390