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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

2

2000

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

Материал, защищенный авторским правом

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. Воинг (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 (отв. 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 (Exec. 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: *61015, 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., 61015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Матеріал, захищений авторським правом

2 2000

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

Катков И. И. Некоторые аспекты осмотической реакции клеток. III. Временные рамки максимального переноса объема: одномембранная и многомембранная модели 3

Розанов Л. Ф., Смольянинова Е. И., Луценко Е. Д., Останков М. В., Костяев А. А. Осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в водных растворах криозащитных веществ 10

Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Луценко Е. Д., Дубрава Т. Г., Опанасенко Е. В., Прокофьева В. А. Ответ лимфогемопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса 15

Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М. Динамика активности НАД·$Н^2$ и НАДФ·$Н^2$ диафораз в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения 31

Кучеренко Ю. В., Зинченко В. Д. Фазовый переход "лед–вода" в криоконсервированных суспензиях эритроцитов 36

Бабийчук Г. А., Ломако В. В., Шуляк Л. И., Шило А. В., Ломакин И. И. Функциональное состояние фрагментов эмбриональной нервной ткани после гипотермического хранения и трансплантации реципиенту . . . 40

Цуцаева А. А., Севрюкова Л. Г. Индукция стресс-белков в течение восстановительного периода после гипотермического воздействия у *Drosophila melanogaster* 48

Грищенко В. И., Дунаевская А. В., Калугин Ю. В. Влияние быстрых и сверхбыстрых скоростей замораживания на сохранность спермиев человека 52

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

Карпенко Л. Г., Губина Н. Ф., Щирова В. А. Активность аденилатциклазы в плазматических мембранах тироцитов и кортикоцитов после действия замораживания и димексида 58

Черепанов В. В., Желтоножко С. В., Желтоножко В. В. Криоконсервация спермы реофильной нерки . . . 64

Лобасенко Н. П., Ханина Л. А., Щеглов А. В. Свойства макрофагов мыши в зависимости от методов криоконсервирования 71

Сандомирский Б. П., Волкова Н. А., Гальченко С. Е., Белочкина И. В. Влияние режимов криоконсервирования на сохранность микрофрагментов поджелудочной железы поросят 76

Грищенко В. И., Снурников А. С., Кадникова Н. Г., Марценюк В. Ф., Высеканцев И. П., Петренко Т. Ф. Жидкий азот как потенциальный источник микробной контаминации биологических объектов 81

Линник Т. П., Грищенко В. И., Артеменко А. Б., Терещенко А. В. Влияние осмотичности криозащитной среды на сохранность спермиев петуха при криоконсервировании 86

КРИОМЕДИЦИНА

Демин Ю. А. Патогенетическая коррекция метаболических нарушений введением криоконсервированных КЭП (на моделях экспериментального диабета и атеросклероза). Сообщение I. Влияние трансфузии криоконсервированных КЭП на состояние про- и антиоксидантного гомеостаза и липидный профиль крови при аллоксановом диабете 94

Грищенко В. И., Суббота Н. П., Питько В. А. Состояние иммунитета у больных с подострым сальпингоофоритом после трансплантации криоконсервированной хориальной ткани 102

Журавлев А. С., Муринец-Маркевич Б. Н. Перспективы использования криогенной техники в ЛОР практике 107

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Бондаренко Т. П. Температурная чувствительность транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде 112

Никишкова И. Н., Кутиков А. Е. Особенности моделирования общего умеренного периодического охлаждения у крыс линии Вистар 113

Олейник О. А., Бондаренко В. А. Влияние ионной силы на распределение флуоресцеина между эритроцитами и средой инкубации 115

ХРОНИКА

Ежегодная конференция молодых ученых "Холод в биологии и медицине" при участии кафедры ЮНЕСКО по криобиологии 117

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 2000

Матеріал, захищений авторським правом



PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

Katkov I. I. Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. III. Time Frame of the Maximum Volume Excursion: One-Membrane *vs* Multi-Membrane Models 3

Rozanov L. F., Smolyaninova E. I., Lutsenko E. D., Ostankov M. V., Kostyayev A. A. Osmotic Behavior of Murine Bone Marrow Cells in Aqueous Solutions of Cryoprotective Substances 10

Goltsev A. N., Ostankova L. V., Lutsenko E. D., Dubrava T. G., Opanasenko E. V., Prokofyeva V. A. Response of the Lymphohemopoietic System of the Organism on the Injection of the Products of the Fetoplacental Complex . 15

Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M. Dynamics of Activity of NAD·H^2 and NADP·H^2-diaphorases in Cells of Growing and Renewing Epithelium of Cornea During its Hypothermic Storage 31

Kucherenko Yu. V., Zinchenko V. D. A "Water–Ice" Phase Transition in Cryopreserved Suspensions of Red Cells 36

Babijchuk G. A., Lomako V. V., Shulyak L. I., Shilo A. V., Lomakin I. I. Functional State of Embryonic Nerve Tissue Fragments After Hypothermal Storage and Transplantation to a Recipient 40

Tsutsayeva A. A., Sevryukova L. G. Induction of Stress-Proteins During Recovering Period After Hypothermic Effect in *Drosophila melanogaster* 48

Grischenko V. I., Dunayevskaya A. V., Kalugin Yu. V. Action of Rapid and Suprarapid Rates of Freezing on Survival of Human Spermatozoa 52

CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

Karpenko L. G., Gubina N. F., Schirova V. A. Adenylate Cyclase Activity in Plasmatic Membranes of Thyrocytes and Corticocytes After Dimexide and Freezing Effects 58

Cherepanov V. V., Zheltonozhko O. V., Zheltonozhko V. V. Cryopreservation of Rheophylic Sock-Eyed Salmon Sperm 64

Lobasenko N. P., Khanina L. A., Scheglov A. V. Properties of Mice Macrophages Depending on the Cryopreservation Methods 71

Sandomirsky B. P., Volkova N. A., Galchenko S. E., Belochkina I. V. The Effect of Cryopreservation Regimens on the Integrity of Microfragments of Piglets' Pancreas 76

Grischenko V. I., Snurnikov A. S., Kadnikova N. G., Martsenyuk V. F., Vysekantsev I. P, Petrenko T. F. Liquid Nitrogen as a Potential Source of Biological Object Microbe Contamination 81

Linnik T. P., Grischenko V. I., Artemenko A. B., Tereschenko A. V. Effect of Osmoticity of Cryoprotective Medium on Survival of Cock Sperm During Cryopreservation 86

CRYOMEDICINE

Demin Yu. A. Pathogenetic Correction of Metabolic Impairments by Injection of Cryopreserved Embryonic Liver Cells (on the Models of Experimental Diabetes and Atherosclerosis). Report I. Effect of Transfusion of Cryopreserved Embryonic Liver Cells on the State of Pro-Antioxidative Homeostasis and Lipid Profile of Blood During Alloxanic Diabetes 94

Grischenko V. I., Subbota N. P., Pitko V. A. State of Immunity in Patients with Subacute Salpingo-oophoritis Following Transplantation of Cryopreserved Chorionic Tissue 102

Zhuravlev A. S., Murinetz-Markevich B. N. Prospects of Applying Cryogenic Equipment iIn Otolaryngological Practice 107

BRIEF COMMUNICATIONS

Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Bondarenko T. P. Temperature Sensitivity of Proton Transport in Erythrocytes in Sulphate Medium 112

Nikishkova I. N., Kutikov A. E. Peculiarities of the Modelling of General Moderate Periodic Cooling in Wistar Line Rats 113

Olejnik O. A., Bondarenko V. A. The Effect of Ionic Strength on Fluorescein Distribution Between Erythrocytes and Incubation Medium 114

CHRONICLE

Annual Conference of Young Scientists "Cold in Biology and Medicine" Jointly with the Meeting of the UNESCO Chair on Cryobiology 117

© Translated from Russian by *A. M. Mikhailov* and *E. N. Pushkova*

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 2000

Матеріал, захищений авторським правом

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

UDC 57.043

Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells.
III. Time Frame of the Maximum Volume Excursion: One-Membrane *vs* Multi-Membrane Models

Igor I. KATKOV

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

Некоторые аспекты осмотической реакции клеток.
III. Временные рамки максимального переноса объема: одномембранная и многомембранная модели

И. И. КАТКОВ

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

A general theory of cell osmotic response developed in previous papers is expanded to a multi-membrane model. The presence of intracellular organells may have a substantial effect on the osmotic behavior of the cells. Here we compare osmotic reactions of a single membrane cell model and that of cells containing a second membrane. Some practical examples are illustrated. The presence of the second (inner) membrane substantially alters the time frame of the osmotic response: 1) if the water volume of the inner part is comparable or higher than the volume occupied by water in the outer layer; 2) if the water and solute permeabilities of the inner membrane are substantially lower than those of the outer membrane. Under these conditions, at least 3 stages can be defined: the fast shrinkage, the slow shrinkage of the cell volume to the minimal one, the slow return of the equilibrium volume. The effect of the second membrane is amplified during the removal of the cryoprotector. If the permeability parameters of the inner membrane are equal to or higher than that of the outer membrane, the pattern of osmotic reactions are not different from those of the one-membrane model. These proposed estimations could be useful for estimation of membrane permeability parameters and in discriminating between the one-membrane and multi-membrane patterns of osmotic reactions.

Общая теория клеточной осмотической реакции, развитая в предыдущих работах, распространяется на мультимембранную. Внутриклеточные органеллы могут иметь значительный эффект на осмотическое поведение клеток. Здесь мы сравниваем осмотические реакции одномембранной клеточной модели и модели клеток, содержащих вторую мембрану. Приведены практические примеры. Присутствие второй (внутренней) мембраны значительно увеличивает временные рамки осмотической реакции: 1) если объем воды внутренней части сравним с объемом, занимаемым объемом воды во внешнем слое, или больше его; 2) проницаемость для растворенного вещества внутренней мембраны значительно ниже, чем внешней. В этих условиях могут быть определены по крайней мере три стадии: быстрое сжатие, медленное сжатие клеточного объема до минимального, медленное восстановление равновесного объема. Действие второй мембраны усиливалось при удалении криопротектора. Если параметры проницаемости внутренней мембраны равны или выше, чем внешней, модель осмотической реакции не отличается от одномембранной модели. Предлагаемые вычисления могут быть полезны для расчета параметров проницаемости мембраны и разделения одно- и многомембранной моделей осмотических реакций.

Загальна теорія клітинної осмотичної реакції, розвинута у попередніх роботах, розповсюджується на мультимембранну. Внутрішньоклітинні органели можуть мати значний ефект на осмотичну поведінку клітин. Ми порівнюємо осмотичні реакції одномембранної клітинної моделі і моделі клітин, які містять другу мембрану. Наведено практичні приклади. Наявність другої (внутрішньої) мембрани значно збільшує часові рамки осмотичної реакції: 1) якщо об'єм води внутрішньої частини порівняний з об'ємом, який займає об'єм води у зовнішньому шарі, або більше від нього; 2) водопроникність для розчиненої речовини внутрішньої мембрани значно нижча, ніж зовнішньої. У цих умовах можуть бути визначені три стадії: швидке стиснення, повільне стиснення клітинного об'єму до мінімального, повільне відновлення рівноважного об'єму. Дія другої мембрани посилювалась при вилученні кріопротектора. Якщо параметри проникності внутрішньої мембрани однакові або вищі, ніж зовнішньої, модель осмотичної реакції не відрізняється від одномембранної моделі. Запропоновані обчислення можуть бути корисними для розрахунку параметрів проникності мембрани і поділу одно- і багатомембранної моделей осмотичних реакцій.

Introduction

It is conventionally known that the large volume excursion that cells may undergo if are placed in anisosmotic conditions can cause sub-lethal or even lethal damage. The maximum volume excursion also marks the end of the fast phase of osmotic response that is equalizing the total extra- and intra-cellular tonicities, and indicates the beginning of the low phase of balancing of gradients of permeable and impermeable components. That is why knowledge of the time and the amplitude of the MVE are crucial for development of optimal procedures of addition and dilution of permeable CPAs [2, 7, 9]. Moreover, understanding of the phenomenology of MVE may determine the whole strategy of cryopreservation [1]. In previous companion papers we discussed phenomenology of the maximum volume excursion (MVE) and introduced simple algorithms and formulas for evaluations of conditions in which the MVE occurs [3], and for estimations of the amplitude of MVE in a relative time scale for multi-solute systems [4]. In this paper, we estimate the actual time at which the cell undergoes the MVE. We will show that the whole time frame of the cell osmotic response depends on two important factors: the characteristic time of the MVE and the relative membrane permeability. From the

Матеріал, захищений авторським правом

other hand, if the moment of MVE is experimentally defined, it gives an ability to easily estimate the cell membrane parameters without using sophisticated fitting data software.

Conventionally in permeability studies, complex cells such spermatozoa, oocytes and embryos are considered as single-membrane systems. Presence of intracellular compartments that are somehow isolated from the external media may substantially alter the shape and osmotic behavior of the cells [8]. Here we compare the "traditional" 1-membrane approach with the situation when the cell contains a second membrane that divides the cell on outer and isolated from an extracellular medium inner compartment. This situation is applicable to spermatozoa (acrosomal membrane), oocytes (yolk sack membrane) or some types of embryos (zebra fish, mosquito, etc).

Finally, we briefly explore a general situation when N compartments are present.

Time frame of osmotic response

1-membrane model

General picture. Consider a cell with initial (isosmotic) water volume W_{iso} that is initially containing non-permeable iso-osmotic salt ($Z_0 = M_{iso}$). The cell is placed in the external media containing non-permeating buffer with osmolality Z_f Osm, and a permeable cryoprotectant (CPA) with concentration Y_f Osm. The behavior of the cell can be described using coupled differential equations [4, 6]:

$$-\frac{dw}{dt} = -L_p ART[(Y_f - Y) + (Z_f - M_{iso}/w)] \quad (1\text{-w})$$

$$Y\frac{dw}{dt} + w\frac{dY}{dt} = P_y A(Y_f - Y), \quad (1\text{-Y})$$

where w is the normalized to the isosmotic intracellular water volume ($w = W/W_{iso}$), L_p is the hydraulic conductivity of the membrane, R is the gas constant ($R = 0.082$ atm/K/mol, T is the temperature, A is the surface area of the membrane, Y and Z are the intracellular osmolality of the permeable CPA and impermeable "salts" respectively (we consider this case only, the case when both entities are permeable is considered in [4, 6]), P_y is the membrane permeability to the CPA, and M_{iso} is the isosmolal tonicity. Subscript f refers to the extracellular (final, equilibrium) osmolality. The initial conditions for Eqs. (1) are $Y(0) = Y_0$, $Z(0) = Z_0$, and $w_0 = M_{iso}/Z_0$.

The characteristic iso-time τ_{iso} can be defined as:

$$\tau_{iso} \equiv W_{iso}/(L_p RTA M_{iso}). \quad (2a)$$

The normalized time can be determined as:

$$q \equiv t/\tau_{iso}. \quad (2b)$$

Pattern of changes of the cell water during addition of the CPA with the use of iso-osmotic buffer ($Z_f = M_{iso}$) is depicted in Figs. 1. The upper x-axis is the relative time scale q given in the relative τ_{iso} iso-units of the characteristic time (2b), the lower abscissa is the actual time for the concrete parameters resembled the mouse spermatozoa ($W_{iso} = 33.5\mu^3$, $A = 94\ \mu^2$, $T = 300$ K, $L_p = 2.0$ μ/atm/min, $P_y = 13.9$ μm/min, $\tau_{iso} \sim 1.5$ sec).

Osmotic reaction of the cell consists of two distinctive phases: the fast stage is the shrinkage to the minimum volume w_m at which the first derivative of the cell water volume $dw/dt = 0$, and the slow phase is the reswelling to the final (equilibrium) volume w_f.

The final water volume for 2-solute systems containing a non-permeable component can be obtained from the Boyle–vant Hoff relationship: $w_f = M_{iso}/Z_f$ that in case of isosmotic buffer equals 1.

The level of maximum shrinkage and concentration of the CPA that has been permeated the cell at that time depend on relative membrane permeability C_{rp}. The relative membrane permeability can be characterized by the relative permeability term $C_{rp} = P_y/(L_p RT)$ expressed in Osmol [3, 4, 6]. The water volume at point of MVE w_m can be estimated [4, 6] as follows:

$$w_m \sim w_0 \frac{C_{rp} + Y_0 + Z_0}{C_{rp} + Y_f + Z_f}, \quad (3a)$$

where $w_0 = M_{iso}/Z_0$ is the initial normalized water volume (1 in our case).

The total cell volume V at any time being considered can be found from a simple relationship:

$$V_j = W_k(1 - v_b)(1 + Y_k \nu_y) + v_b, \quad (3b)$$

where ν_w is the partial molar of the permeable solute (varies in a range 0.04–0.07 l/mol depends on type of the solute and its concentration), and v_b is the part that occupied at isotonic conditions by an osmotically inactive component. The subscript j means 0 for initial, f for extracellular, m for the MVE-point, or none for the actual values.

The equilibrium value of the cell volume can be calculated as follows:

$$V_f = [W_{i0}(Z_0/Z_f)](1 - v_b)(1 + Y_f \nu_y) + v_b. \quad (3c)$$

Note that we assume second solute as non-permeable ($P_z = 0$) and use the BVH relationship $W_0 Z_0 = W_f Z_f = W_{iso} M_{iso}$. For $Y_f = 0.8$ Osmol (~0.75 mol/l), the final osmotically active volume will be ~1.06 of the total value (assuming $v_b = 0$) if glycerol is used as cryoprotectant ($\nu_y = 0.071$ l/mol). Expression in the brackets in formula (3c) is the final cell water volume W_f.*

Fig. 1, *a* depicts the normalized cell water volume during addition of 0.8 mOsm of CPA and reflects influence of the relative membrane permeability on the pattern of osmotic curves. The relative membrane

---

* As we have shown previously [4, 6], the BVH is the particular case of more general relationship when if the buffer is permeable ($P_z \neq 0$); then:

$$V_f = \left[\frac{W_0(1/L_p RT + Y_0/P_y + Z_0/P_z)}{1/L_p RT + Y_0/P_y + Z_0/P_z}\right](1 - v_b)(1 + Y_f \nu_y) + v_b, \quad (3d)$$

where P_z is the permeability of a slow-permeable osmotic buffer such as xylitol. Expression in the brackets is the final water volume W_f.

Матеріал, захищений авторським правом

permeability can be characterized by the relative permeability term C_{rp}. As it is shown on the figure, the time of MVE decreases as permeability to CPA (at fixed L_p) increases. If $P_y = 0$, the water volume will monotonically decrease accordingly to the Bolyle–vant Hoff (BVH) relationship to the final volume $w_{BVH} = w_0 (Y_0 + Z_0)/(Y_f + Z_f)$. The BVH curve (the lowest in Fig. 1, *a*) has no point of MVE ($q_m \to \infty$ and not determined). Practical equilibration occurs however, in this case much faster because it is now determined only by movement of water but not by diffusion of CPA.

Fig. 1, *b* depicts the normalized cell water volume during addition of different amount of CPA at fixed membrane permeability ($C_{rp} = 0.282$ Osm) assuming as in the case for Fig. 1, *a*, a non-permeable component is kept iso-osmotic ($Z_0 = Z_f = M_{iso}$). The time of MVE decreases as the final osmolality of the CPA increases.

Time of maximum volume excursion (t_m) during shrinkage. After analyzing more than 200 different variations of initial and final conditions for Eqs. (1) we have concluded that the duration of the fast shrinkage stage t_m (time at which MVE occurs) is in a order of characteristic time and can be estimated as:

$$t_m \sim 2\tau_{iso} M_{iso}/(C_{rp} + M_f), \qquad (4)$$

where M_f is the final tonicity (i.e. $M_f = Y_f + Z_f$).

Comparison of values of t_m predicted by formula (4) with actual simulations of formulas (1) using Stiff–Episode integration (solid curves with filled symbols) is shown on Fig. 2. The upper couple of curves depict situation when 0.8 mOsm of CPA is added; the lower curves is the case when extracellular tonicity of CPA is 12.5 times higher ($Y_f = 10$ Osm). Labels *A–D* are the points on of MVE given on Figs. 1. Time of MVE decreases with increasing of C_{rp} for the case of addition of 0.8 Osm of CPA. At very high final concentration of CPA, the time of MVE is substantially lower than for the upper curve, and it is slightly depends on C_{rp}. At very high relative permeabilities ($C_{rp} > 2$), both upper and lower curves merge (not shown). Because these two curves represent more than order of altitude of addition of CPA, we can say that in general, Eq. (4) satisfactory describes the time of MVE. In general, calculation with the use of formula (4) gives good estimation. For the upper curve, the simulation values derive from the curve predicted by (4) at higher C_{rp}. However, we must say that at high values of C_{rp} that correspond to lower values of MVE, and as w_m approaches to 1, the simulation values becomes depend on the integration method. For example, at $C_{rp} = 14$ Osm, the Stiff's Episode gives values $w_m = 0.951$, and $t_m = 0.11$ sec. If the Euler's method were used, it would give the simulation values $w_m = 0.949$ that is close to the values obtained by Stiff's Episode. However, time for achieving this value would be somewhat 25% lower ($t_m = 0.08$ sec) for this

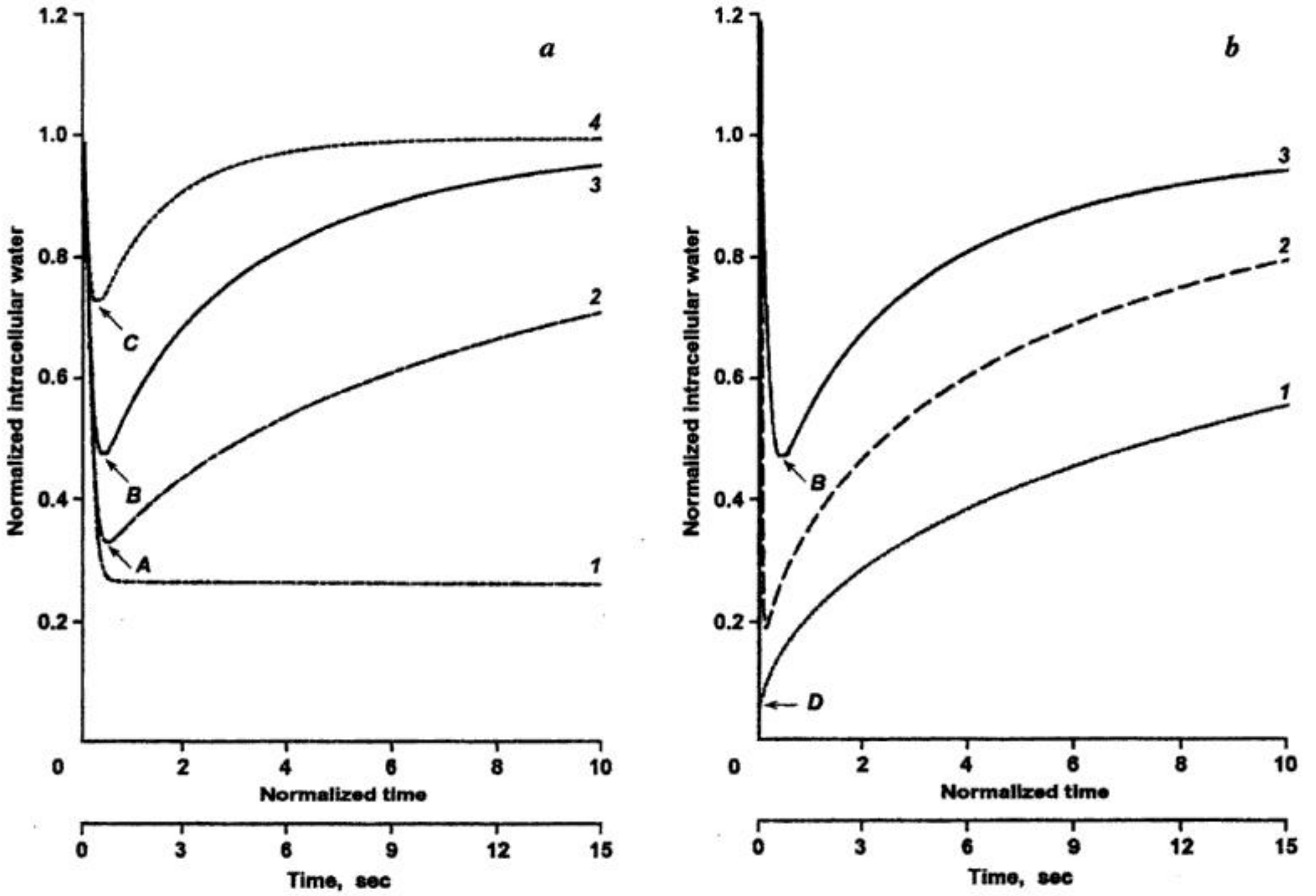


Fig. 1. Kinetics of water volume of the cell during addition a permeable CPA. The water volume is normalized to isotonic value. *a* – addition of 0.8 Osm CPA at different membrane permeability (the relative membrane permeability terms C_{rp} are labeled on curves corresponding to $P_y = 0$ (*1*), 2.8 (*2*), 14 (*3*), and 70 μ/min (*4*)). Points *A*, *B*, and *C* are the moments of maximum volume excursions. *b* – the cell with moderate relative membrane permeability ($L_p = 2.0$ um/min/atm, $P_{y2} = 2.8$ um/min, $C_{rp} = 0.282$ Osm) is placed to a bath containing different osmolalities of CPA Y_f, Osm: 10 (*1*), 2.83 (*2*), 0.8 (*3*). Points *B* and *D* represent points of maximum volume excursions for lowest and top curves. Point *B* ($q_m = 0.42$; $w_m = 0.475$) is the same point as on the curve *3* in Fig. 1, *a*.

Матеріал, захищений авторським правом

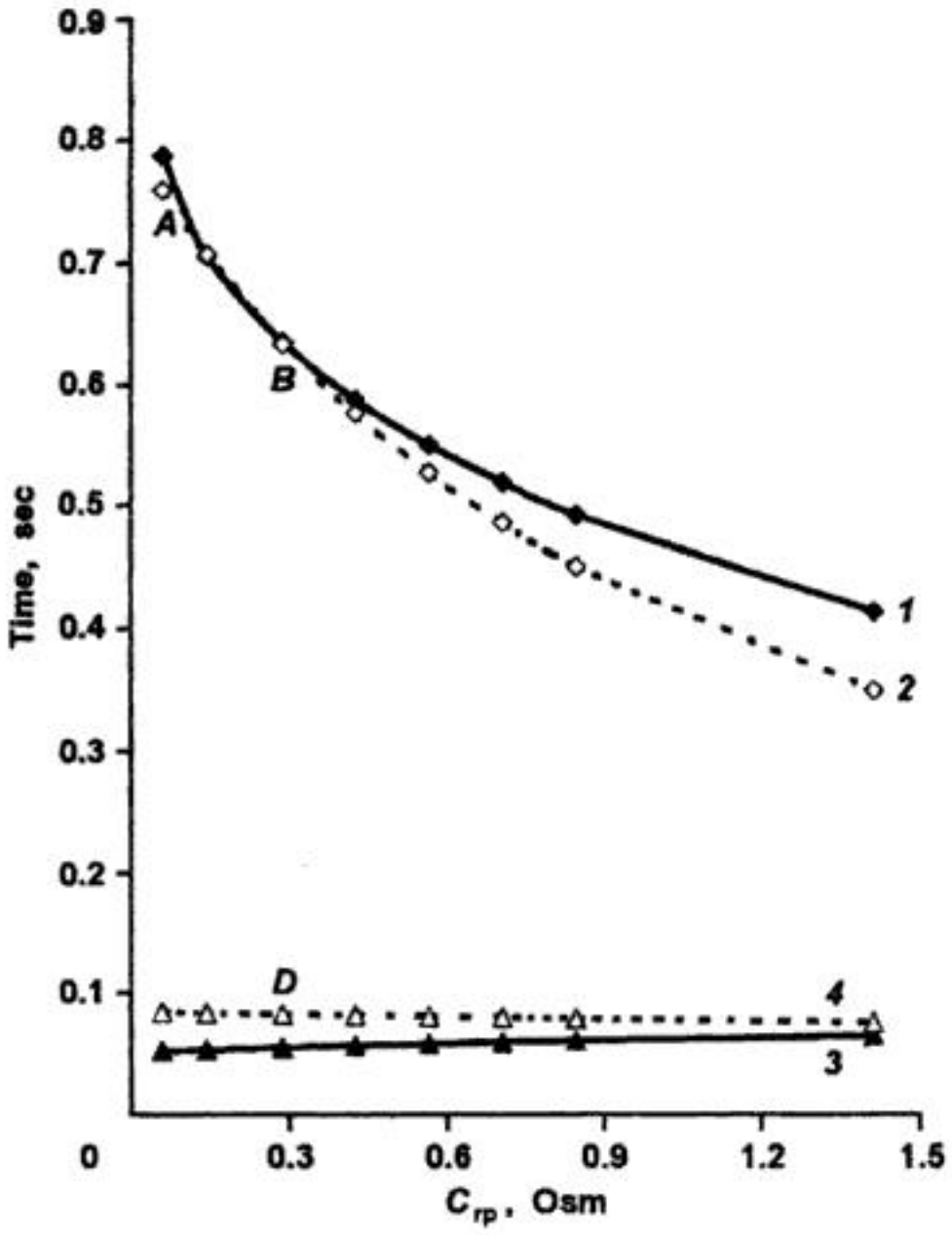


Fig. 2. Comparison of the time of the maximum volume excursion t_m obtained by simulation of equations (1) (curves *1* and *3*) and calculated from formula (2) (curves *2* and *4*). Curves *1* and *2* represent addition of 0.8 Osm of CPA, curves *3* and *4* is an addition of 10 Osm of CPA. Points *B* and *C* are the same as on Fig. 1, *a*, point *D* is the same point of MVE as in Fig. 1, *b*. Point *A* represents the same point as on the curves in Figs. 1, *a* and 1, *b*.

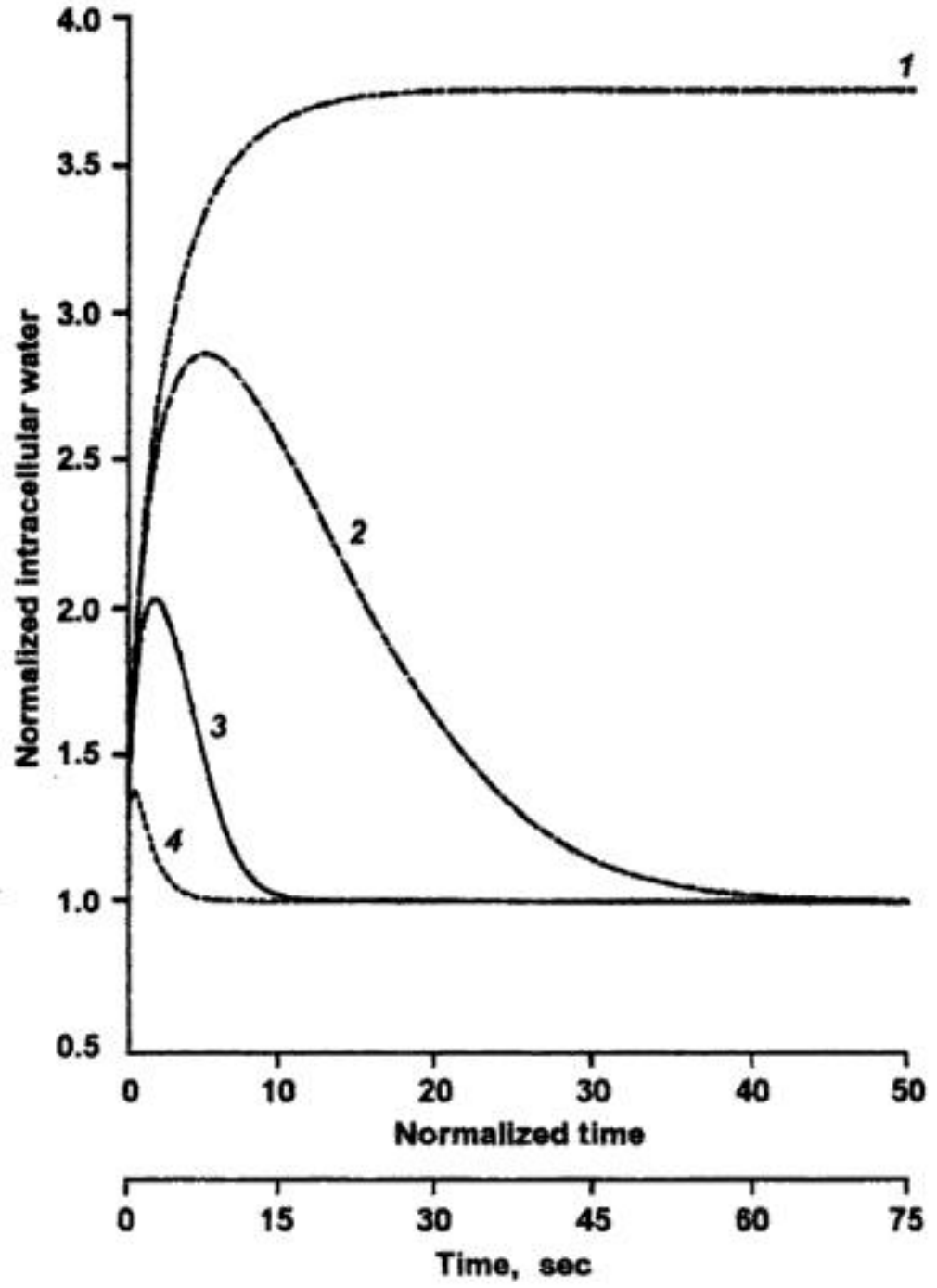


Fig. 3. Kinetics of water volume of the cell during removal of 0.8 Osm of CPA. The water volume is normalized to iso-tonic value. The upper time-scale is given in relative τ-units as determined in formula (1a). The lower scale is the actual time. $C_{rp} = 0$ (*1*), 0.056 (*2*), 0.282 (*3*), 1.41 Osm (*4*). This figure represents the situation with moderate relative membrane permeability is ($C_{rp} = 0.282$ Osm).

type of stimulation. Similarly, we have found that the method of integration matters for estimation of t_m at high total tonicities. Thus, while for estimation of w_m, the method of integration is less important, an estimation of MVE at high C_{rp} or Y_f is sensitive to the way of integration of Eqs. (2). In general, we can say that formula (4) gives a good approximation for t_m in the majority of practical cases.

Re-swelling process. Duration of the slow re-swelling is determined by the solute membrane permeability and is in a range of $(t_m/k_v)(\nu_y/\nu_w)$, where $k_v = C_{rp}\,\nu_y$ is the unit-less relative "volume" permeability coefficient [5], and ν_w is the partial molar volume of water (0.018 l/mol). Another form to express the duration of re-swelling is as of $t_m/(C_{rp}\,\nu_w)$. Re-swelling occurs faster if relative membrane permeability is higher (Fig. 1, *a*). At higher Y_f re-swelling is relatively longer (Fig. 1, *b*); however speed of influx of CPA is higher (not shown).

Removal of CPA. If the cell is returned to the iso-osmotic buffer (removal of the CPA), it undergoes relatively fast swelling (Fig. 3). The level of the maximum swelling during dilution of the CPA w_m can be also described from formula (3a). One has to remember that now Y_0' is the extracellular osmolality of CPA during addition, and $Y_f' = 0$ if the bath does not content any CPA. Similar transformation of 0 and *f* subscript should be done for the impermeable component *Z* (in our case both of them equal to M_{iso}). As we see, the cell would regain higher level of water than it lost during fast shrinkage phase when addition performed. That is why, it needs longer time to reach MVE in case of swelling, and $t_m' \sim (Y_f + M_{iso})/M_{iso}$ times higher than the fast stage t_m during the addition of CPA. The time of MVE decreases as C_{rp} increases (cf Fig. 1, *a*).

During the slow stage of the dilution, the cell re-shrinks to the iso-osmotic water volume, and it takes approximately the same time-range than for the slow stage of the addition of CPA.

Determination of membrane permeabilities characteristic using w_m and t_m. If raw experimental volumetric have been obtained, one can estimated values of water and solute membrane permeabilities without using sophisticated, expansive and time-consuming software. Assuming that W_{iso} is known, and combining formulas (3a) and (2), it gives us following:

$$C_{rp} \sim (W_m M_f - W_0 M_0)/(W_0 - W_m), \qquad (5a)$$

$$L_p \sim 2W_{iso}/[ARTt_m(C_{rp} + M_f)], \qquad (5b)$$

$$P_y \sim 2W_{iso}\,C_{rp}/[At_m(C_{rp} + M_f)]. \qquad (5c)$$

As we can see, w_m and t_m are the key experimental parameters from which permeability characteristics can be determined. One, however, has to be sure than there are enough experimental data for estimation of the point of maximum volume excursion.

Матеріал, захищений авторським правом

2-membrane model

Presence of the second (inner) membrane (Fig. 4) substantially alters the time and the level of the maximum volume excursions if the volume of the inner

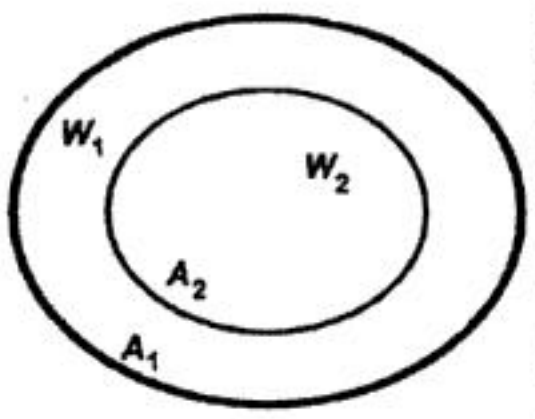


Fig. 4. A cell considered in a 2-membrane model. Permeability parameters of the outer membrane are the same as for Figs. 1, *a* and 3. The outer membrane divides the cell water volume in two equal parts $W_1 = W_2 = 16.75$ um^3. The surface area of the outer (cell) membrane $A_1 = 94$ um^2. The surface area of the inner membrane $A_2 = 59$ um^2.

(core) part is comparable or higher that the volume occupied by the outer layer, and if the permeabilities of the second membrane to water (L_{p2}) and to the cryoprotectant (P_{y2}) are substantially lower than those for the outer membrane. Two osmotic differential equations for the volume and concentration has to be replaced by of 2·2 = 4 coupled equations describing the CPA and water fluxes in both parts of the cell:

$$\frac{dw_1}{dt} = -\left\{L_p A\,[(Y_f - Y_1) + (Z_f - M_{\text{iso}}\,\rho_2/w_2)] + \right.$$
$$\left. + L_{p2} A_2\,[(Y_2 - Y_1) + M_{\text{iso}}(\rho_2/w_2 - \rho_1/w_1)]\right\} RT, \qquad \text{(6-w1)}$$

$$Y_1 \frac{dw_1}{dt} + w_1 \frac{dY_1}{dt} =$$
$$= P_y A\,(Y_f - Y_1) + P_{y2} A_2\,(Y_2 - Y_1), \qquad \text{(6-Y1)}$$

$$\frac{dw_2}{dt} = -L_{p2} A_2\,[(Y_1 - Y_2) +$$
$$+ M_{\text{iso}}(\rho_1/w_1 - \rho_2/w_2)]\,RT, \qquad \text{(6-w2)}$$

$$Y_2 \frac{dw_2}{dt} + w_2 \frac{dY_2}{dt} = P_{y2} A_2\,(Y_1 - Y_2), \qquad \text{(6-Y2)}$$

where subscripts 1 and 2 imply the outer and inner compartment respectively, subscript f refers to the extracellular media, w is the normalized to the cell isotonic water volume, Y is the concentration of the permeable CPA, $\rho_1 = W_{1\text{iso}}/W_{\text{iso}}$, and $\rho_2 = W_{2\text{iso}}/W_{\text{iso}}$ are the partial isotonic volumes of outer and inner compartments. For simplicity, we consider the permeability membrane characteristic of the outer layer as the

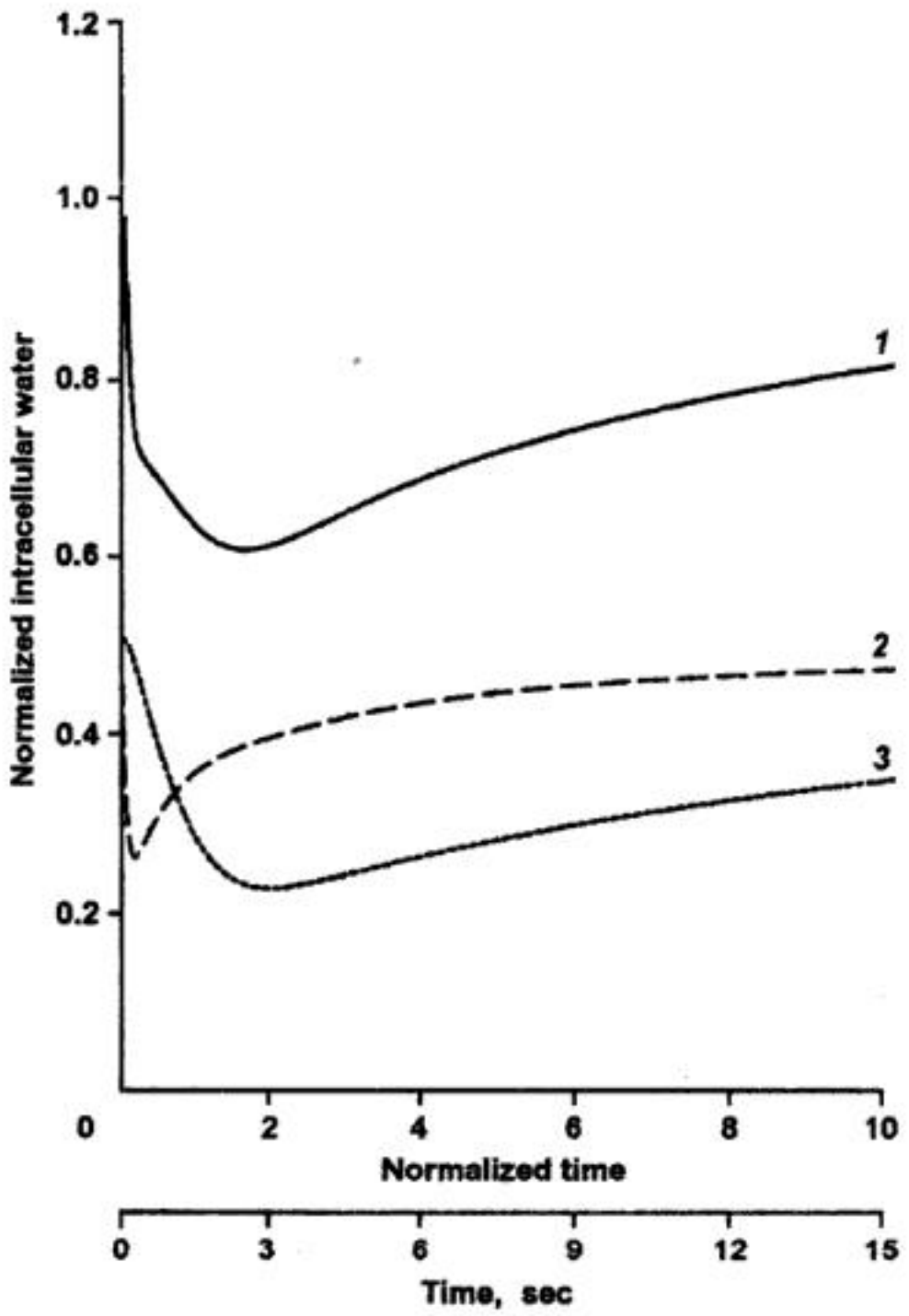


Fig. 5. Kinetics of osmotic response of the cell during addition of 0.8 Osm of CPA: normalized water volume of whole cell (*1*), the outer part (*2*) and the inner part (*3*). All volumes are normalized to the iso-osmotic water cell volume of the whole cell (W_{iso} in 1-membrane model). Upper time-scale is given in relative τ-units as determined in formula (1a). Lower x-scale is the actual time. This figure represents the situation for 2-membrane model with low absolute but the same relative membrane permeability of the inner membrane ($L_{p2} = 0.4$ um/min/atm, $P_{y2} = 2.8$ um/min/atm, $C_{rp2} = 0.282$ Osm).

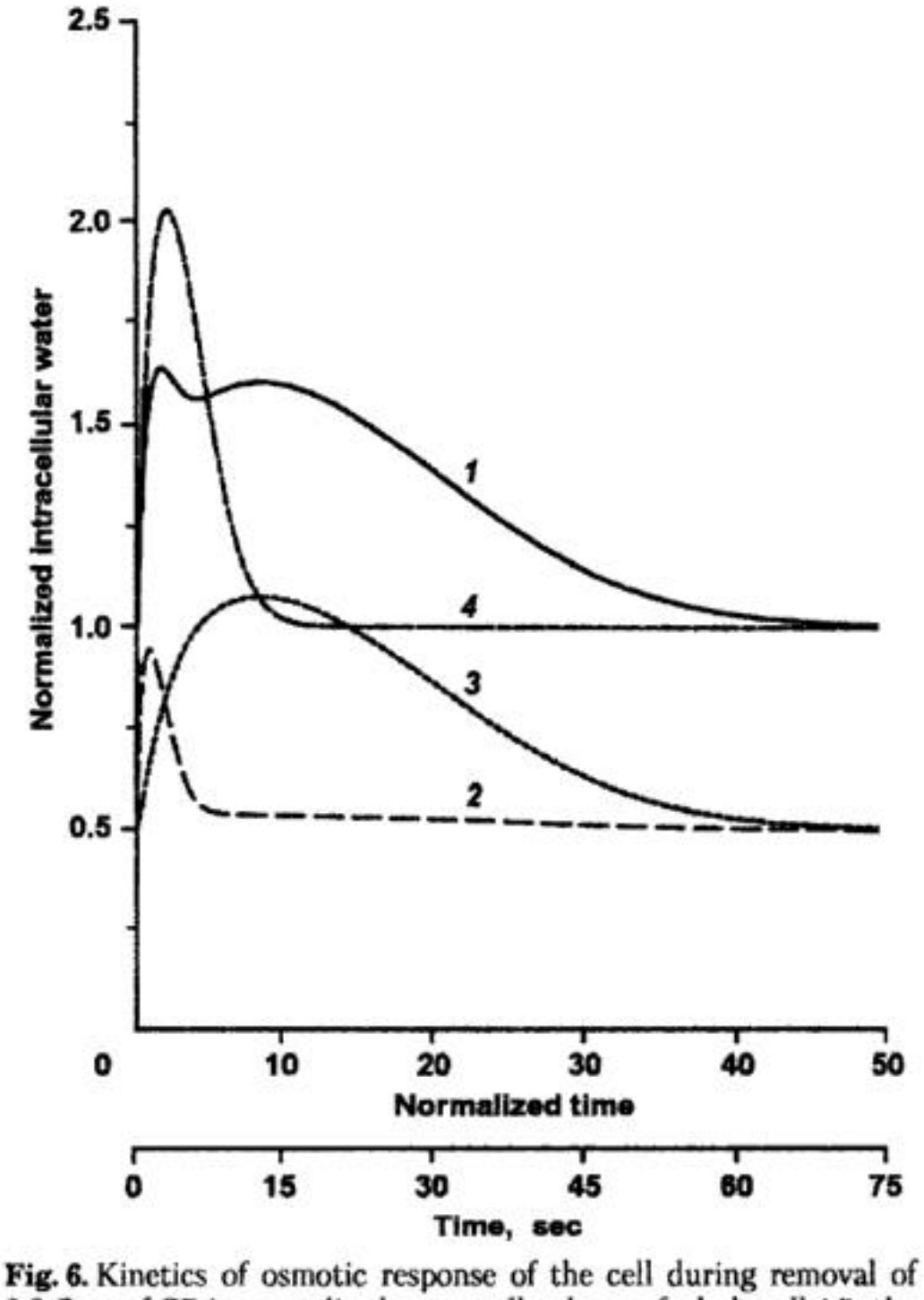


Fig. 6. Kinetics of osmotic response of the cell during removal of 0.8 Osm of CPA: normalized water cell volume of whole cell (*1*), the outer part (*2*) and the inner part (*3*). All volumes are normalized to the iso-osmotic water cell volume of the whole cell (W_{iso} in 1-membrane model). Upper time-scale is given in relative τ-units as determined in formula (2a). Lower x-scale is the actual time. This figure represents the situation for 2-membrane model with low absolute but the same relative membrane permeability of the inner membrane ($L_{p2} = 0.4$ um/min/atm, $P_{y2} = 2.8$ um/min/atm, $C_{rp2} = 0.282$ Osm). For comparison, 1-membrane model is also given in the figure (*4*).

Матеріал, захищений авторським правом

parameters of cell membrane considered for 1-membrane model in previous chapter. Thus, $L_{p1} = L_p$, $A_1 = A$, and $P_{y1} = P_y$.

Now we consider a spermatozoon with outer membrane characteristics that are equal to the 1-membarbe model considered above. The cell has been initially placed in the medium containing $Y_f = 0.8$ Osm of CPA and $M_{iso} = 0.290$ Osm of iso-osmotic buffer. We assume that the water volumes of the outer and inner compartments are equal ($\rho_1 = \rho_2 = 0.5$). We also consider "isotropic" symmetry that means that the surface area of the inner membrane related to the surface area of the outer (cell) membrane as the ratio of their volumes in power 2/3, i.e., $A_1/A = \rho_2^{2/3}$. That gives $A_2 = 59\ \mu^2$.

If the permeability of the inner membrane is lower than the outer membrane ($L_{p2} = 0.4$ μ/atm/min, $C_{rp} = 0.070$ Osm, $P_{CPA1} = 0.56$ μm/min), and the water volume of the outer and inner compartments are comparable, than at least three stage can be determined during the addition of CPA (Fig. 5): the first stage is the fast shrinkage that occurs 2-times (if $\rho_1 = \rho_2$), faster that the fast stage for the one-membrane model. The magnitude of the maximum volume excursion is approximately a half of those for the one-membrane model. Then the relatively slow shrinkage for ~2 sec occurs up to the $w_m \sim 0.62$ that is higher than those for the one-membrane consideration. Finally, the slow return to the equilibrium volume (W_f) takes $\sim P_y/P_{y1}$ time longer (~50 sec) that in the case of one-membrane model.

The effects of the second membrane are amplified during the removal of CPA (Fig. 6) where up to 4 phases and 3 local extremums of total cell water volume can be observed (solid line on the Fig. 6). The fast stage of initial swelling occurs approximately in the same ~2 sec than for the one-membrane model. In that case however, the volume excursion ($w_m \sim 1.65$) is less than for the one membrane model) ($\sim 2W_{iso}$). Then an interesting phenomenon that we call "oscillation" occurs: the cell shrinks a little bit as the results of fast re-shrinkage of the outer membrane. Then the cells swells slightly due to continuing slow swelling of the inner membrane, and it maintains at the transient swelling stage ($\sim 1.6W_{iso}$) for approximately 12 sec. Finally, the cell slowly (in ~60 sec) returns to the isotonic volume. As the results, all cells reaches equilibrium for ~5 times slower than for the 1-membrane case. Note that for addition of CPA such oscillation can be also observed if $L_{p2} << L_p$. In this case, 2 transient minimums and one local maximum can be seen.

If the permeability of the second membranes is equal to those for the outer membrane ($L_{p2} = L_p$; $P_{CPA2} = P_{CPA}$), the patterns of the osmotic reactions are

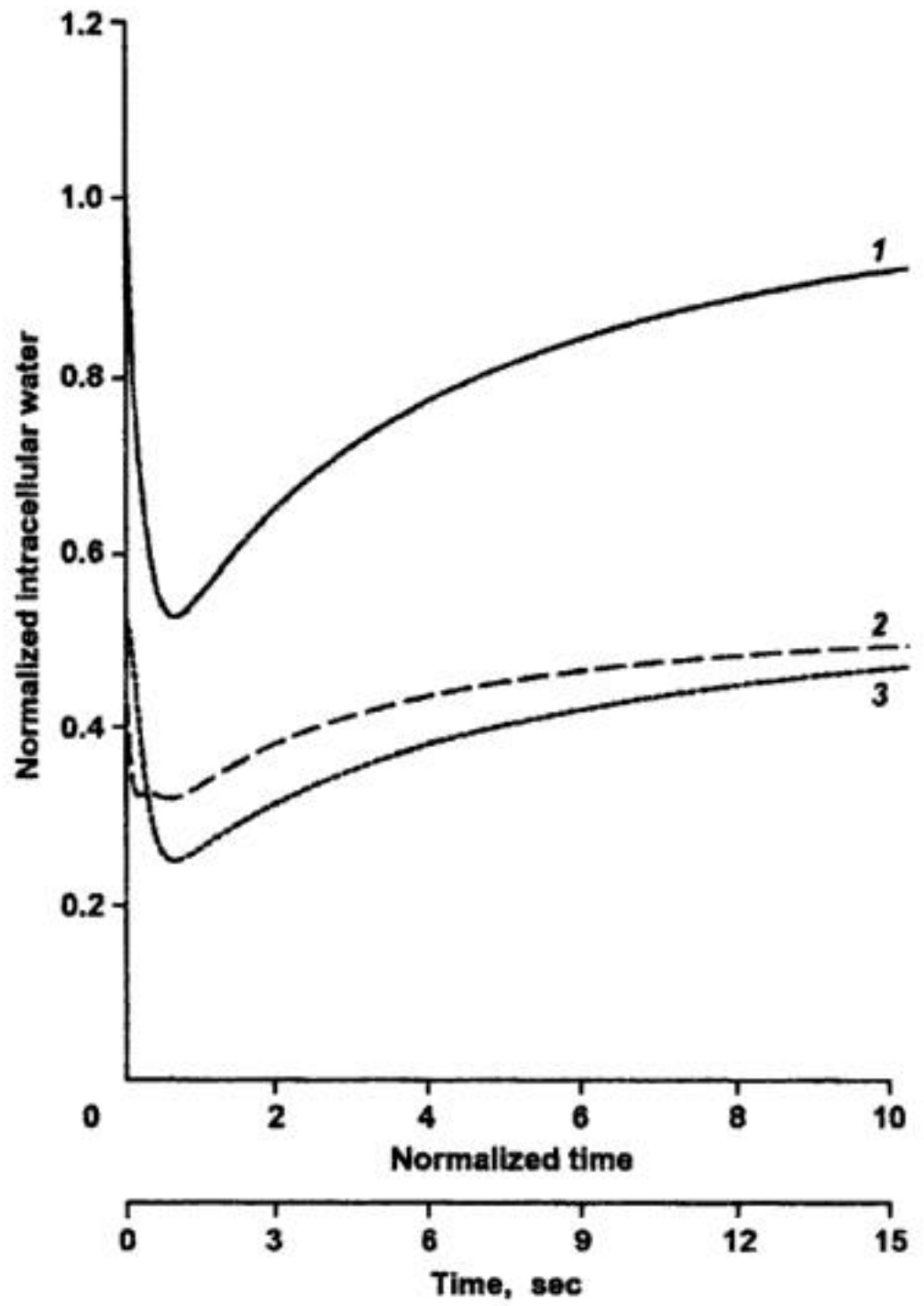


Fig. 7. Kinetics of osmotic response of the cell during additon of 0.8 Osm of CPA: normalized water cell volume of whole cell (*1*), the outer part (*2*) and the inner part (*3*). All volumes are normalized to the iso-osmotic water cell volume of the whole cell (W_{iso} in 1-membrane model). Upper time-scale is given in relative τ-units as determined in formula (2a). Lower x-scale is the actual time. This figure represents the situation for 2-membrane model when the membrane permeability characteristics and size of both compartments are equal ($L_{p2} = L_p = 2.0$ um/min/atm, $P_{y2} = P_{y2} = 14$ um/min).

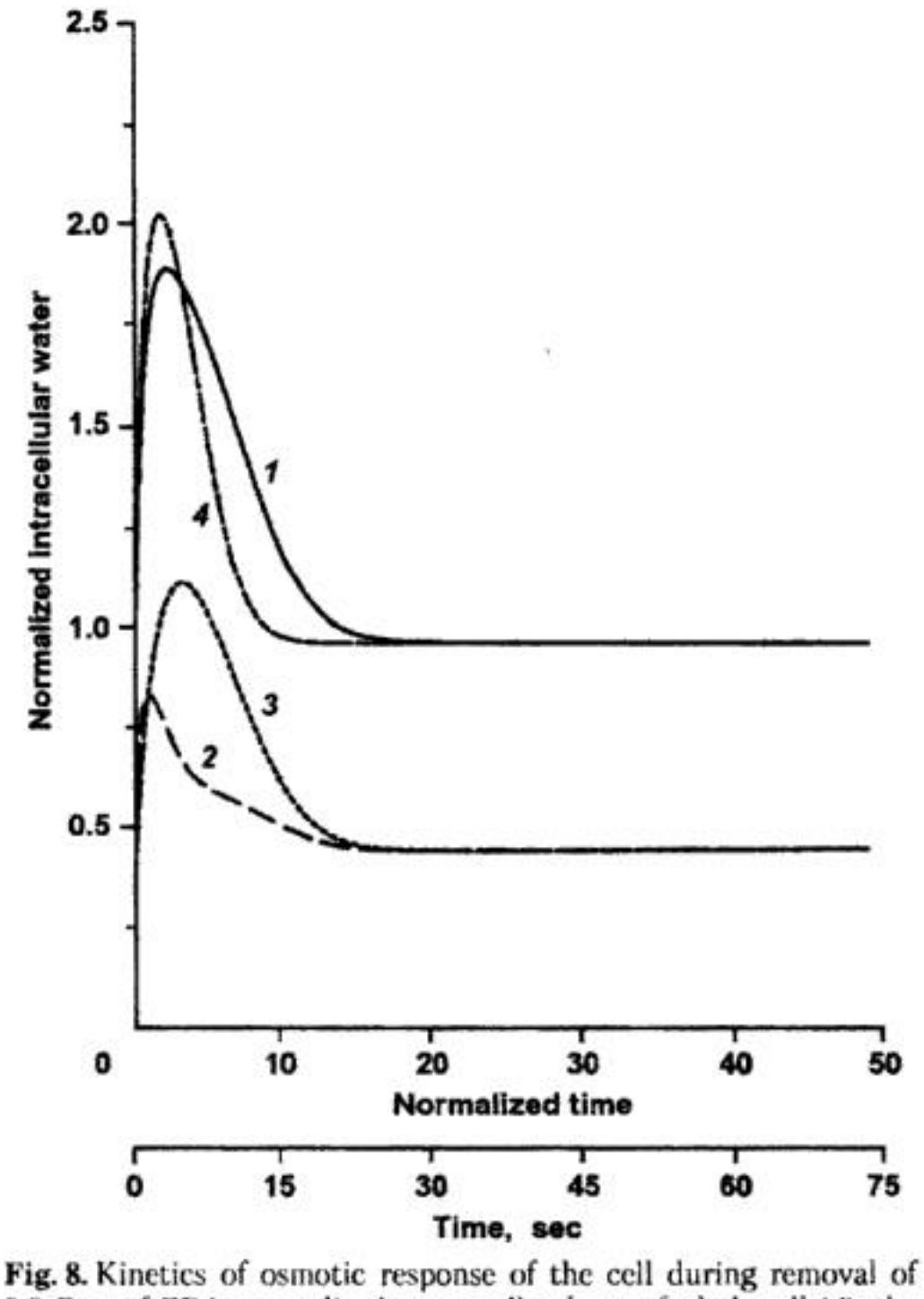


Fig. 8. Kinetics of osmotic response of the cell during removal of 0.8 Osm of CPA: normalized water cell volume of whole cell (*1*), the outer part (*2*) and the inner part (*3*). All volumes are normalized to the iso-osmotic water cell volume of the whole cell (W_{iso} in 1-membrane model). Upper time-scale is given in relative τ-units as determined in formula (2a). Lower x-scale is the actual time. This figure represents the situation for 2-membrane model when the membrane permeability characteristics and size of both compartments are equal ($L_{p2} = L_p = 2.0$ um/min/atm, $P_{y2} = P_{y2} = 14$ um/min). For comparison, 1-membrane model is also given in the figure (*4*).

Матеріал, захищений авторським правом

not different from the patterns for the one-membrane consideration; in this case the inner membrane transduces the osmotic response without a considerable delay to the inner part of the cell (Figs. 7 and 8).

N-membrane model

In general, for N layers, $2N$ equations are necessary to describe the model:

$$\frac{dw_1}{dt} = -\left\{L_p A\left[(Y_f - Y_1) + \left(Z_f - \frac{M_{\text{iso}}\rho_2}{w_2}\right)\right] + \right.$$

$$\left. + L_{p2} A_2\left[(Y_2 - Y_1) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_2}{w_2} - \frac{\rho_1}{w_1}\right)\right]\right\} RT \quad (7\text{-}w_1)$$

$$Y_1\frac{dw_1}{dt} + w_1\frac{dY_1}{dt} = P_y A(Y_f - Y_1) + P_{y2} A_2 (Y_2 - Y_1) \quad (7\text{-}Y_1)$$

$$\frac{dw_2}{dt} = -\left\{L_{p2} A_2\left[(Y_1 - Y_2) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_1}{w_1} - \frac{\rho_2}{w_2}\right)\right] - \right.$$

$$\left. - L_{p3} A_3\left[(Y_1 - Y_2) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_3}{w_3} - \frac{\rho_2}{w_2}\right)\right]\right\} RT \quad (7\text{-}w_2)$$

$$Y_2\frac{dw_2}{dt} + w_2\frac{dY_2}{dt} =$$

$$= P_{y2} A_2 (Y_1 - Y_2) + P_{y3} A_3 (Y_3 - Y_2) \quad (7\text{-}Y_2)$$

...

$$\frac{dw_i}{dt} = -\left\{L_\pi A_i\left[(Y_{i-1} - Y_i) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_{i-1}}{w_{i-1}} - \frac{\rho_i}{w_i}\right)\right] - \right.$$

$$\left. - L_{p(i+1)} A_{i+1}\left[(Y_{i+1} - Y_i) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_{i+1}}{w_{i+1}} - \frac{\rho_i}{w_i}\right)\right]\right\} RT$$

$$(7\text{-}w_i)$$

$$Y_i\frac{dw_i}{dt} + w_i\frac{dY_i}{dt} =$$

$$= P_{yi} A_i (Y_{i-1} - Y_i) + P_{y(i+1)} A_{i+1} (Y_{i+1} - Y_i) \quad (7\text{-}Y_i)$$

...

$$\frac{dw_N}{dt} =$$

$$= -L_{pN} A_N\left[(Y_{N-1} - Y_N) + M_{\text{iso}}\left(\frac{\rho_{N-1}}{w_{N-1}} - \frac{\rho_N}{w_N}\right)\right] RT$$

$$(7\text{-}w_N)$$

$$Y_N\frac{dw_N}{dt} + w_N\frac{dY_N}{dt} = P_{yN} A_N (Y_{N-1} - Y_N), \quad (7\text{-}Y_N)$$

where subscripts refer the number of layers and membranes.

The number of transient extremums that can be theoretically observed equals $2N-1$, when N of them are transient minimums and $N-1$ are transient maximums in case of addition of CPA. However, for all those maximums, $w_m < w_0$. For dilution, the situation is opposite: theoretically, N local maximums and $N-1$ local minimums between them can be observed (keeping $w_m > w_0$). In general, however, as N increases, the contribution of volume excursion of each layer decreases, and oscillation of water volume diminishes.

The proposed qualitative explanations and quantitative simulations could be useful for discrimination of one-membrane from multi-membrane pathways of osmotic reaction.

REFERENCES

1. *Isachenko V. V., Isachenko E. F., Ostashko F. I. et al.* Vitrification of rat embryos by the use of ultra-rapid addition and dilution of cryoprotective media // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 435–436.
2. *Katkov I. I.* Cell suspensions in high concentrations of a permeable cryoprotectant: optimization of addition and dilution protocols // Cryobiol.– 1999.– 37.– P. 403–404.
3. *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 Cryobiol.– 1999.– № 2.– P. 3–11.
4. *Katkov I. I.* Some Aspects of Osmotic Reaction of Cells. II. Water volume and intracellular concentrations of permeable cryoprotectants at points of maximum volume excursions. // Probl. of Cryobiology.– 1999.– № 3.– P. 3–19.
5. *Katkov I. I.* Common misuses of permeability models and parameters in Cryobiological literature // Cryobiol.– 1999.– 39.– P. 328.
6. *Katkov I. I.* A Two-Parameter Model of Cell Membrane Permeability for Multi-Solute Systems // Cryobiol.– 2000.– 40.– in press.
7. *Katkov I. I., Katkova N. , Critser J. K., Mazur P.* Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 325–338.
8. *Kleinhans F. W.* Membrane permeability modeling: Kedem-Katchalsky vs a two-parameter formalism // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 271–289.
9. *Mazur P., Katkova N., Critser J. K., Katkov I. I.* Cryopreservation of mouse sperm by the use of high concentrations of glycerol and by the presence of an *Escherihia coli* membrane preparation Oxyrase to lower oxygen concentration // Cryobiol.– 1998.– 37.– P. 415–416.

Accepted in 29.02.2000

This One
KW4J-5CH-ZHG3

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.419: 577.352.4

UDC 57.043: 612.419: 577.352.4

Осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в водных растворах криозащитных веществ

Л. Ф. РОЗАНОВ, Е. И. СМОЛЬЯНИНОВА, Е. Д. ЛУЦЕНКО, М. В. ОСТАНКОВ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

А. А. КОСТЯЕВ
НИИ гематологии и переливания крови МЗ и МП РФ, г. Киров, Россия

Osmotic Behavior of Murine Bone Marrow Cells in Aqueous Solutions of Cryoprotective Substances

L. F. ROZANOV, E. I. SMOLYANINOVA, , E. D. LUTSENKO, M. V. OSTANKOV
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

A. A. KOSTYAYEV
Scientific and Research Institute for Hematology and Blood Transition of Ministry of Health Care of Russia, Kirov

Проведено микроскопическое исследование осмотического поведения клеток костного мозга мыши в водных растворах криопротекторов, принадлежащих к различным классам химических веществ. Установлены основные закономерности изменения клеточного объема клетки и морфологические изменения, развивающиеся в процессе эквилибрации клеток в растворах. На основе литературных и полученных в работе данных обсуждаются возможные механизмы регуляции клеточного объема под действием осмотического фактора среды и роль различных компартментов клетки в поддержании клеточного гомеостаза.

Проведено мікроскопічне дослідження осмотичної поведінки клітин кісткового мозку миші у водних розчинах кріопротекторів, що належать до різних класів хімічних речовин. Встановлені основні закономірності зміни клітинного об'єму клітини та морфологічні зміни, що розвиваються під час еквілібрації клітин у розчинах. На підставі літературних та отриманих даних обговорюються можливі механізми регулювання клітинного об'єму під впливом осмотичного фактора середовища та роль різних компартментів клітини у підтримці клітинного гомеостазу.

The osmotic behavior of murine bone marrow cells was studied microscopically in the aqueous solutions of the cryoprotectants, which belong to different classes of chemical compounds. The authors elaborated basic rules of changes in the cell volumes of cells and morphological modifications, occurring during the process of cell equilibration in the solutions. Using the results obtained and the data reported elsewhere the authors speculate on the possible mechanisms of regulation of cell volumes under the action of the osmotic factor of the medium, and on the role of various compartments of the cell in the maintenance of cell homeostasis.

Важным этапом криоконсервирования является эквилибрация биообъектов в криозащитной среде, в процессе которой происходит дегидратация клеток непроникающим криопротектором или замещение части внутриклеточной воды проникающим. Процесс замещения сопровождается изменениями объема клеток, включающими четко выраженные фазы: дегидратации и регидратации. Согласно современным представлениям [2], дегидратация не продуцирует (по крайней мере, до минимального объема) сопротивления сжатию со стороны цитоматрикса и является следствием более высокой проницаемости клеточной мембраны для молекул воды, чем для молекул криопротектора. В результате дегидратации происходит осмотическое уравновешивание клеток с окружающей их гипертонической криозащитной средой. Регидратация связана с поддержанием этого равновесия потоком воды в клетку, сопровождающим проникновение в нее под действием концентрационного градиента криопротектора. Дегидратация может оказывать деструктивное действие на клетки: 1) продуцируя аномаль-

An important stage of cryopreservation is equilibration of biosystems in a cryoprotective medium, during which the cells are dehydrated with a nonpenetrating cryoprotectant, or some intracellular water is replaced with a penetrating cryoprotectant. The process of substitution is accompanied by the changes in the cell volumes, which consist in clearly distinguished phases: dehydration and rehydration. Currently it is believed [2] that dehydration does not produce (at least, down to the minimum volume) any resistance to shrinking of the cytomatrix and is due to a higher permeability of the cell membrane to water molecules as compared with the molecules of the cryoprotectant. Dehydration results in the osmotic equilibration of cells with a surrounding hypertonic cryoprotective medium. Rehydration relates to the maintenance of this balance via an inflow of water into the cell, which accompanies penetration of the cryoprotectant into it under the action of the concentration gradient. Dehydration may exercise a destructive action on the cells, which results in: (i) abnormally high permeability of the cell membranes to the substances, which do not penetrate into the cells under normal conditions, and which maintain osmotic ba-

Матеріал, захищений авторським правом

но высокую проницаемость клеточных мембран для в норме не проникающих в клетки веществ, поддерживающих осмотическое равновесие в системе "клетка–окружающая среда" [1]; 2) приводя к деструктивным изменениям в цитоплазме в результате сближения цитоплазматических структур или действия на них концентрированных внеклеточных растворов, проникающих в клетки с нарушенной в результате дегидратации проницаемостью [7]. Присутствие криопротектора в клетке может способствовать стабилизации структуры цитоматрикса, например, посредством его реорганизации [8].

Учитывая вышесказанное, а также принимая во внимание, что время восстановления клеточного объема может служить характеристикой проницаемости клеточной мембраны для криопротектора [2], а характер набухания клеток в гипертонической среде зависит от способности цитоматрикса сопротивляться растяжению [5, 6], мы изучали осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в растворах ряда крипротекторов, широко используемых при криоконсервировании клеточных суспензий.

Клетки костного мозга получали путем промывания 199 средой бедренных костей мышей линии F_1 (CBA×C57BL) 8–12-недельного возраста. После тщательного ресуспендирования суспензию выдерживали в течение 5 мин для оседания конгломератов, а затем использовали в эксперименте.

В качестве исследуемых веществ применяли диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, А-378 с концентрациями 0,5 и 1,0 М, ПВП с 15%-й концентрацией, а также 15%-е растворы ПВП с добавлением 5% ДМСО и глицерина. Все растворы готовили на дистиллированной воде с *pH* 7,4.

Исследования проводили на экспериментальной установке, включающей интерференционно-поляризационный микроскоп МПИ-5 с кинокамерой, обеспечивающей покадровую съемку со скоростью 1 кадр/3 с, и оптическую приставку к микроскопу, в которой проводилось разведение суспензии клеток костного мозга мыши водными растворами криопротекторов.

Растворы криопротекторов к клеточным суспензиям добавляли в соотношении 3:1. При этом конечная концентрация криопротектора в препарате уменьшалась примерно на 25%.

Численное моделирование процессов массопереноса в системе "клетка–окружающая среда", проводимое без учета сопротивления цитоматрикса растяжению [3], предсказывает следующую динамику изменения клеточного объема в гипертонических водных растворах проникающих веществ: 1) уменьшение до некоторого минимального значения; 2) восстановление до исходного значения к моменту уменьшения осмотического давления внеклеточного раствора до уровня 300 мОсм; 3) увеличение до значений, превосходящих исходное (набухание) по мере уменьшения градиента осмо-

lance within a "cell-environment" system [1]; (ii) the destructive changes in the cytoplasm due to the cytoplasmic structures coming close to each other or due to the action of the concentrated extracellular solutions on them, which penetrate into the cells with a permeability, dysbalanced due to dehydration [7]. The availability of the cryoprotectant in the cell, on the contrary, may facilitate stabilization of the cytomatrix structure, e.g. by means of its re-organization [8].

Considering the above and taking into account that a period of time, required for recovery of the cell volume, may serve as a characteristic feature of the cell membrane permeability to the cryoprotectant [2], while the nature of cell swelling in the hypertonic medium depends on the ability of the cytomatrix to resist stretching [5, 6], the authors investigated osmotic behavior of murine bone marrow cells in the solutions of several cryoprotectants, which are widely used during cryopreservation of cell suspensions.

Bone marrow cells were obtained by washing the femur bones of the mice of a F_1 (CBA×C57BL) line, aged 8–12 weeks. Following thorough resuspending the suspension was exposed for 5 min for precipitation of conglomerates, and then it was subsequently used in the experiments.

Dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, A-378 in the concentrations of 0.5 and 1.0 M, 15%-PVP and 15%-PVP with added 5%-DMSO and glycerol, were used as the substances under study. All the solutions were prepared on distilled water with a *pH* of 7.4.

The investigations were conducted with an experimental device, which consists of an MPI-5 interferential-polarization microscope, equipped with a videocamera, which ensures a still shooting at a velocity of 1 shot/3 sec, and of an optical stage to the microscope, at which the suspension of murine bone marrow cells was diluted with aqueous solutions of cryoprotectants.

Cryoprotective solutions were added to cells suspensions at a 3:1 ratio. Here a finite concentration of the cryoprotectant in the preparation was reduced by approximately 25%.

A numeric modelling of the processes of mass transfer in a "cell-environment" system, conducted with disregarding a resistance of the cytomatrix to stretching [3], produces the following dynamics of changes in the cell volumes in the hypertonic aqueous solutions of the penetrating substances: (i) reduction down to some minimum value; (ii) recovery up to the original value by the moment of a decrease in the osmotic pressure of the extracellular solution down to the point of 300 mosm; (iii) a rise to the values, exceeding the original swelling with a reduction in the gradient of the osmotic pressure of the penetrating component on the membrane (due to subsequent penetration of the cryoprotectant into the cell). This process is finite, swelling of cells is terminated after a reduction in the concentration of the intracellular non-penetrating solutions down to the concentration of the non-penetrating extracellular solutions (in the authors' experiments this corresponds to an increase in the cell volumes by a 4-fold minimum). However, swelling may proceed until the whole square area of the cell membrane is exhausted due to it excessive stretching, thus resulting in the loss of a property of selective permeability by the cell membrane. Subsequent exposure of cells in such a solution inevitably leads to cell lysis. Thus, the dynamics

Матеріал, захищений авторським правом

тического давления проникающего компонента на мембране (за счет дальнейшего проникновения криопротектора в клетку). Этот процесс является конечным, набухание клеток прекращается при уменьшении концентрации внутриклеточных непроникающих растворов до уровня концентрации непроникающих внеклеточных растворов (в нашем случае это соответствует увеличению объема клеток как минимум в 4 раза). Однако набухание может продолжаться до тех пор, пока не исчерпается весь запас площади поверхности клеточной мембраны в результате ее чрезмерного растяжения, что приводит к потере клеточной мембраной свойства избирательной проницаемости. Дальнейшая экспозиция клеток в таком растворе неизбежно приводит к лизису клеток. Таким образом, по динамике изменения клеточного объема можно судить о кинетике массообмена между клеткой и окружающей ее средой.

Исследования показали, что в 0,5 и 1 М водных растворах ДМСО уже на 1-й минуте экспозиции клетки костного мозга успевают восстановить свой объем после дегидратации, к 10-й минуте многие клетки набухают (рис. 1). Однако даже на 25-й минуте экспозиции не все клетки выглядят набухшими. Объем клеток в процессе эквилибрации увеличивается меньше, чем прогнозировалось (примерно в 1,5 раза). При этом наблюдались морфологические изменения клеток в виде образования на их поверхности оптически менее плотных, чем остальная часть цитоплазмы, участков, ограниченных плазматической мембраной. По-видимому, на этом этапе и в дальнейшем осмотическая регуляция клеточного объема происходит за счет объема такого мембранного "пузыря". Последующая экспозиция клеток в данных растворах приводит к изменению цитоплазматического содержимого клеток в виде фрагментации с последующей потерей клеткой цитоплазматических гранул. Такие клетки теряют свой контраст при наблюдении в световом микроскопе.

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что выравнивание вне- и внутриклеточных концентраций ДМСО происходит в пределах минуты или меньше. Задержка же набухания отдельных клеток, вероятно, связана с сопротивлением их цитоматрикса растяжению.

В 0,5 и 1 М водных растворах глицерина (рис. 2) на 1-й минуте экспозиции клетки костного мозга мыши еще сохраняли обезвоженное состояние. Приближение их размеров к исходным наблюдалось только к 3–5-й минутам экспозиции. Тогда же начиналось набухание и отдельных клеток, однако даже к 20-й минуте эквилибрации оно не было массовым. Все это позволяет заключить, что скорость проникновения молекул глицерина в клетки костного мозга, примерно, на порядок меньше, чем скорость проникновения в них молекул ДМСО. Характер разрушения клеток костного мозга мыши

of changes in the cell volumes may be used for assessment of the kinetics of mass exchange between the cell and environment.

The investigations conducted showed that in 0.5 and 1.0 M aqueous solutions of DMSO the bone marrow cells managed to restore their volumes after dehydration already at the 1st minute of exposure, while by the 10th minute most cells are getting swollen (Fig. 1). However, even at the 25th minute not all the cells are swollen. The cell volumes during equilibration increase to a lower extent as compared with predicted results (by approximately 1.5-fold). Here the morphological changes of cells, represented by formation of the sites, limited by the plasma membrane and optically less dense as compared with the rest of the cytoplasm, became evident. Apparently, at this stage and later on the osmotic regulation of the cell volumes occurs due to such a membrane "bubble". Subsequent cell exposure in these solutions results in the changes in the cytoplasmic contents of the cells, represented by fragmentation and subsequent loss of the cytoplasmic granules by the cell. Such cells loose their contrast when observed with a light microscope.

The experimental data thus obtained make it possible to conclude that levelling of the intra- and intercellular concentrations of DMSO occurs within a minute or shorter time. A delay in swelling of some cells is apparently due to the resistance of their cytomatrix to stretching.

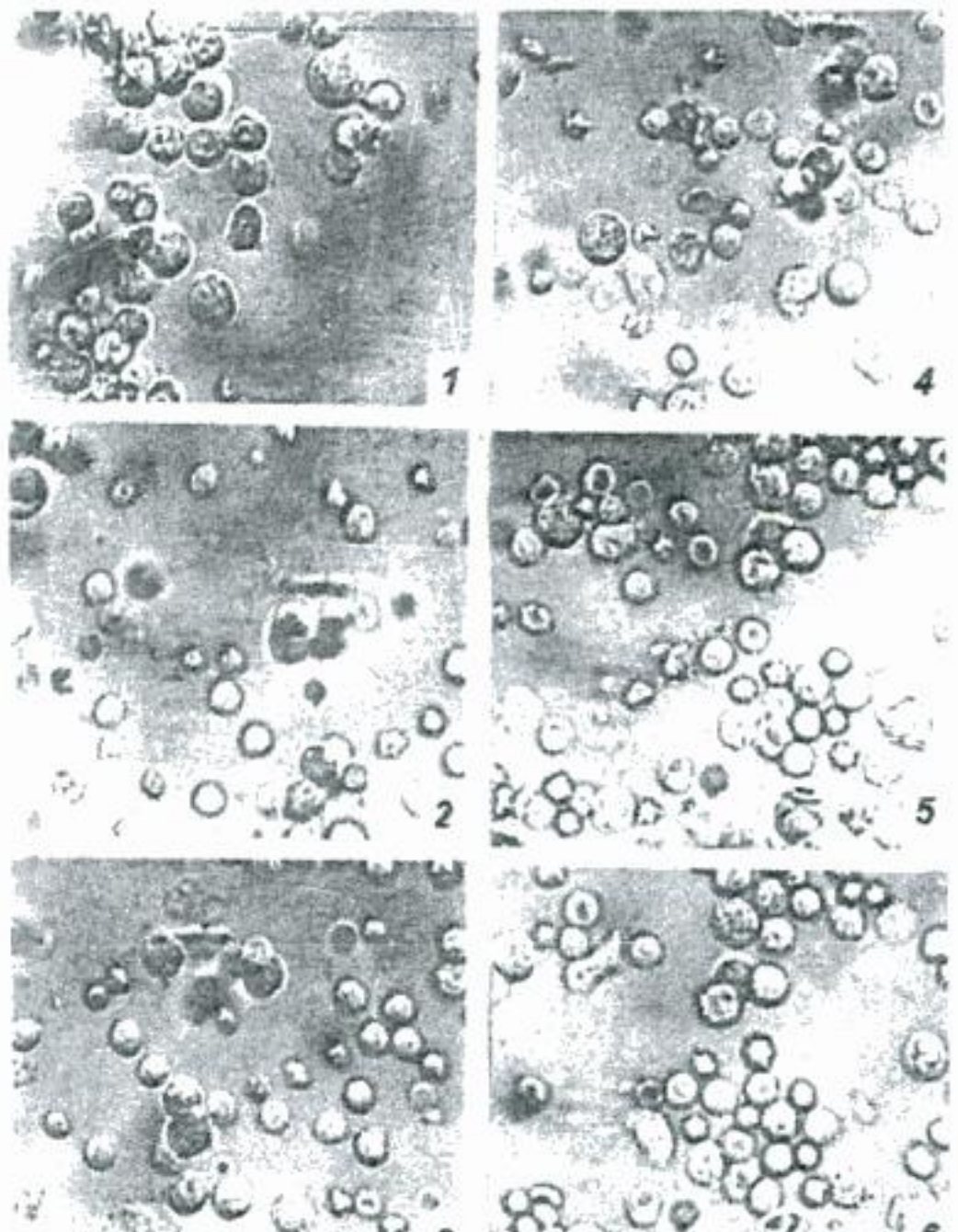


Рис. 1. Осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в 0,5 М водном растворе ДМСО: *1* – натив; *2* – 40 с; *3* – 1,5 мин; *4* – 4 мин; *5* – 10 мин; *6* – 20 мин.

Fig. 1. Osmotic behavior of murine bone marrow cells in a 0.5 M solution of DMSO: *1* – native; *2* – 40 sec; *3* – 1.5 min; *4* – 4 min; *5* – 10 min; *6* – 20 min.

Матеріал, захищений авторським правом

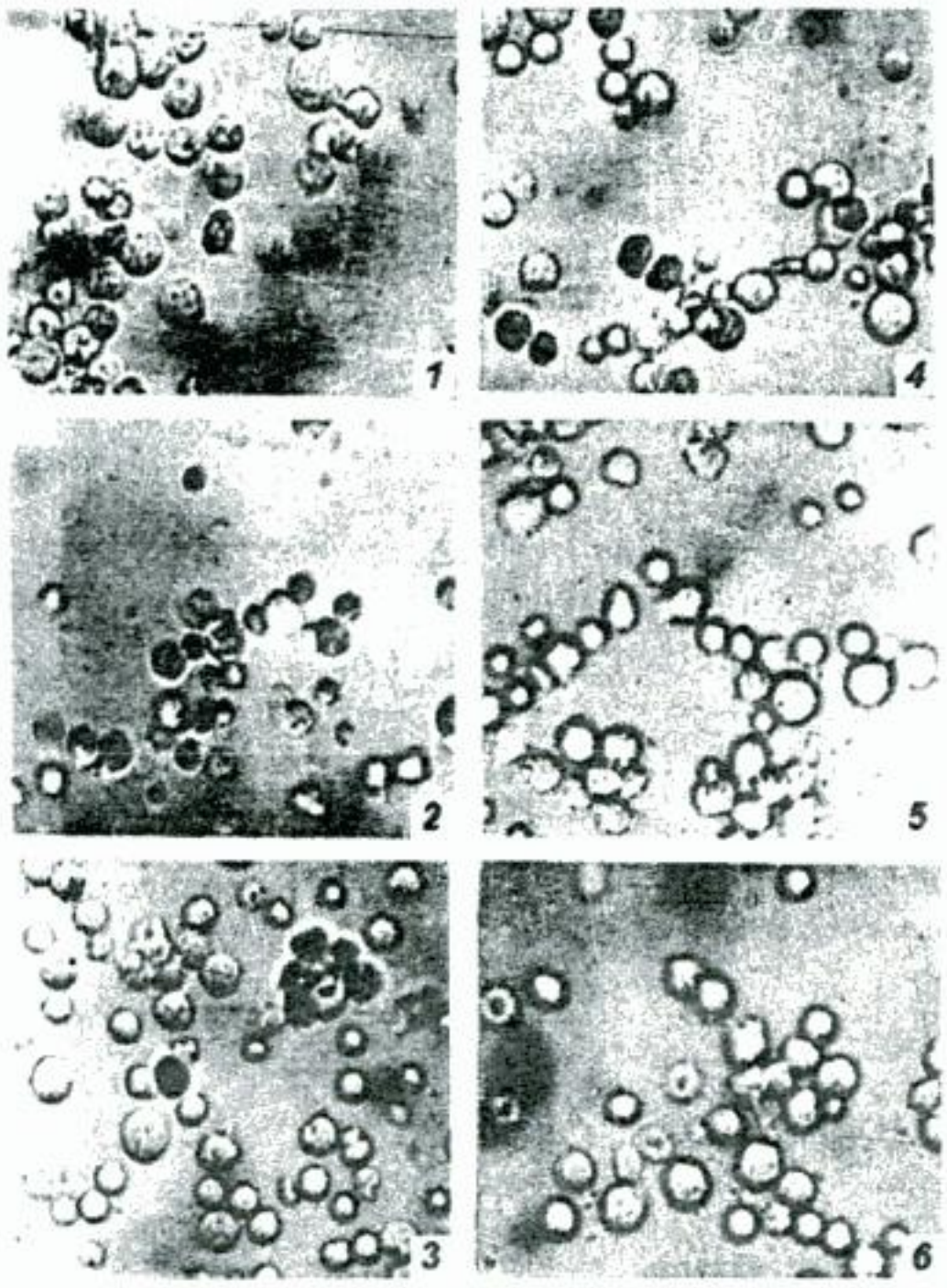


Рис. 2. Осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в 0,5 М водном растворе глицерина: *1* – контроль; *2* – 30 с; *3* – 4 мин; *4* – 6 мин; *5* – 15 мин; *6* – 20 мин.

Fig. 2. Osmotic behavior of murine bone marrow cells in a 0.5 M aqueous solution of glycerol: *1* – control; *2* – 30 sec; *3* – 4 min; *4* – 6 min; *5* – 15 min; *6* – 20 min.

под действием гипотонии, индуцируемой проникновением молекул глицерина в клетки, был сходен с характером разрушения клеток в водных растворах ДМСО. Прежде всего было зафиксировано повреждение клеток более крупных размеров. Увеличение размеров клеток при набухании было выражено слабо. Разрушение преимущественно шло по пути фрагментации и потери клеткой цитоплазматического содержимого в виде гранул.

В 0,5 и 1 М водных растворах А-378 (вещества, близкого по молекулярному весу к известному криопротектору смешанного действия [4] клеток костного мозга ПЭО-400) клетки костного мозга мыши с момента начала наблюдения заметных изменений не проявляли. В 1 М растворе они сохраняли выраженное дегидратированное состояние. В 0,5 М растворе дегидратация клеток была выражена крайне слабо. Таким образом, хотя А-378 считают криопротектором смешанного действия (как интрацеллюлярного, так и экзоцеллюлярного), наши данные не согласуются с этим суждением.

В 15%-м водном растворе ПВП клетки в начале экспозиции практически не отличались от контрольных ни размерами, ни морфологически. Однако к 5-й минуте экспозиции часть клеток проявляла признаки фрагментации, к 15–20-й завершается набухание подавляющего большинства клеток

In 0.5 and 1.0 M aqueous solutions of glycerol (Fig. 2) at the 1st minute of exposure the murine bone marrow cells still maintained their dehydrated state. Their dimensions came close to the original ones only by the 3rd–5th minutes of exposure. At the same time swelling of separate cells started; however, even by the 20th minute of equilibration it did not start on a mass scale. The above makes it possible to conclude that the rate of penetration of the glycerol molecules into the bone marrow cells is approximately by one order lower as compared with the rate of penetration of the DMSO molecules into them. The nature of destruction of the murine bone marrow cells under the action of hypotony, induced by penetration of the glycerol molecules into cells, was similar to that in the aqueous solutions of DMSO. In the first place the larger cells are getting damaged. An increase in the dimensions of cells during swelling was minor. Destruction occurred, mainly, by fragmentation and loss of the granulated contents of the cytoplasm by the cell.

In 0.5 and 1.0 M aqueous solutions of A-378 (the substance, which is close in its molecular weight to a well-known complex-action cryoprotectant [4] for the bone marrow cells – PEO-400) the murine bone marrow cells did not demonstrate any significant changes from the start of observations. In a 1.0 M solution they maintained a manifested dehydrated state. In a 0.5 M solution the cell dehydration was extremely low. Thus, though A-378 is thought to be a cryoprotectant of a complex action (both intra- and exocellu-

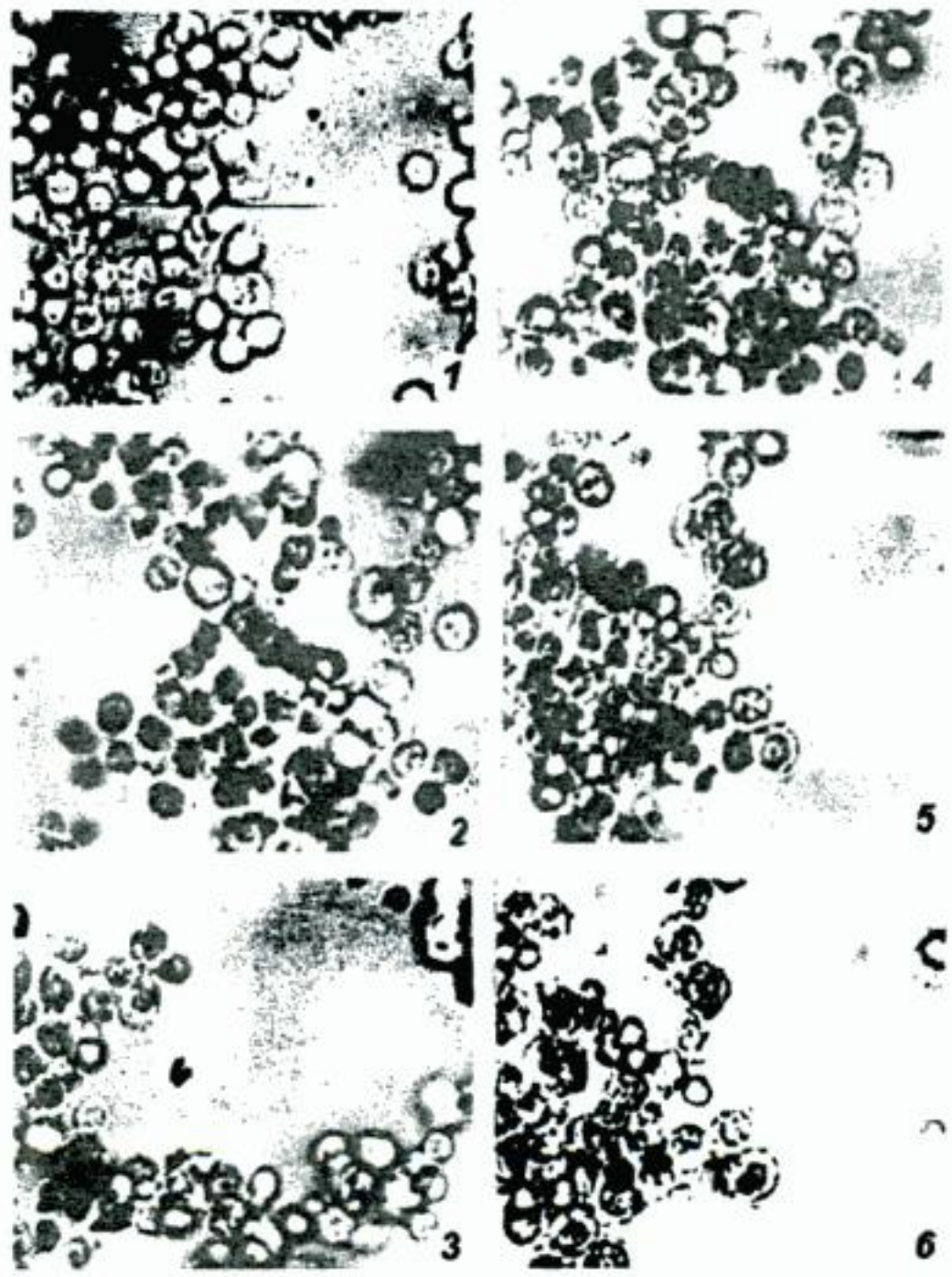


Рис. 3. Осмотическое поведение клеток костного мозга мыши в 15%-м водном растворе ПВП: *1* – контроль; *2* – 40 с; *3* – 1 мин 5 с; *4* – 2 мин; *5* – 10 мин; *6* – 20 мин.

Fig. 3. Osmotic behavior of murine bone marrow cells in a 15% aqueous solution of PVP: *1* – control; *2* – 40 sec; *3* – 1 min 5 sec; *4* – 2 min; *5* – 10 min; *6* – 20 min.

Матеріал, захищений авторським правом

(рис. 3). В отличие от описанных случаев набухания клеток в растворах проникающих криопротекторов набухание их в растворах непроникающего ПВП может быть обусловлено только поступлением воды из гипотоничной для клеток костного мозга мыши внеклеточной среды. В этом случае выраженная задержка набухания может быть объяснена сопротивлением внутриклеточного цитоматрикса растяжению, вызванному осмотическим фактором среды. Ответ на вопрос, почему набухание происходит с меньшей задержкой в растворах проникающих веществ, чем в растворах непроникающего ПВП, следует искать, по-видимому, в деструктурировании цитоматрикса клеток под действием дегидратации как физического фактора, а также возможного непосредственного влияния проникающих криозащитных веществ на мембранные и цитоскелетные структуры клеток.

Это предположение подтверждается данными по изучению действия на клетки костного мозга мыши комбинированных сред на основе ПВП. Так, в 15%-м водном растворе ПВП с добавлением 5% глицерина клетки в начале наблюдения выглядят дегидратированными, а их набухание и разрушение начинаются не на 15-й, а на 5-й минуте экспозиции.

Проведенные исследования осмотического поведения клеток костного мозга мыши в водных растворах криопротекторов и криозащитных добавок показывают, что отклонения реальной динамики поведения клеток от предсказанной с позиций мембранной теории индуцируются главным образом "реакцией" цитоматрикса клеток, а действие криопротекторов носит более сложный характер, определяемый химической природой вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф.* Замораживание и криопротекция.– М.: Высш. шк., 1987.– С. 75.
2. *Гордиенко Е. А., Пушкарь Н. С.* Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– С. 142.
3. *Котык А., Янычек К.* Мембранный транспорт.– М.: Мир, 1980.– С. 341.
4. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криокротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– С. 204.
5. *Розанов Л. Ф., Смольянинова Е. И.* Осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов мыши: роль цитоскелета // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 4.– С. 26–31.
6. *Смирнова Е. А., Казачкина Н. Н., Гребенщикова В. В., Ченцов Ю. А.* Устойчивость разных типов клеток к действию гипотонии // Цитология.– 1987.– XXIX, № 1.– С. 47–53.
7. *Takahashi T., Douglas M. St. J., Williams R. J.* Coagulation of Sea Urchin Egg Cytoplasm by High Salt Concentration // Cryobiology.– 1982.– 19, № 5.– P. 511–519.
8. *Vincent C., Gerard P., Edith P. et al.* Comparative effect of cryoprotectants on rabbit embryos cytosceleton // Cryo-Lett.– 1987.– 8, № 6.– P. 356–361.

Поступила 22.12.98

lar), the data obtained by the authors do not correspond with this assumption.

In a 15%-aqueous solution of PVP at the start of exposure the cells did not practically differ from control neither in their dimensions nor in their morphological status. However, by the 5th minute of exposure some cells demonstrated the signs of fragmentation. By the 15th–20th minute swelling of the majority of cells is completed (Fig. 3). In contrast to the reported cases of swelling of cells in the solutions of the penetrating cryoprotectants their swelling in the solutions of the non-penetrating PVP may be due to the inflow of water out of the intracellular environment, which is hypotonic for the murine bone marrow cells. In this case a manifested delay in swelling may be due to the resistance of the intracellular cytomatrix to stretching, caused by the osmotic factor of the environment. The answer to the question – why does swelling occur with a shorter delay in the solutions of the penetrating substances as compared with the solutions of the non-penetrating PVP – should be sought, apparently, in the destructuring of the cell cytomatrices under the action of dehydration as a physical factor, as well as under possible direct action of the penetrating cryoprotective substances on the membrane and cytoskeletal structures of the cells.

This assumption is supported by the data on studying the action of combined media on the basis of PVP on the murine bone marrow cells. For example, in a 15% aqueous solution of PVP with added 5%-glycerol the cells at the start of swelling appear to be dehydrated, while their swelling and destruction start not at the 15th but at the 5th minute of exposure.

The conducted investigations of the osmotic behavior of the murine bone marrow cells in the aqueous solutions of cryoprotectants and cryoprotective additives demonstrate that disturbances in the real dynamics of the cell behavior as compared with that, predicted by a membrane theory, are induced mainly by a "response" of the cell cytomatrix, while the action of cryoprotectants is of a more complicated nature, which is determined by a chemical nature of the substance.

REFERENCES

1. *Belous A. M., Gordienko E. A., Rozanov L. F.* Freezing and cryoprotection.– M.: Vysch. shkola publ., 1987.– P. 75.
2. *Gordienko E. A., Pushkar N. S.* Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Nauk. dumka publ., 1994.–P. 142.
3. *Kotyk A., Yanychek K.* Membrane transport.– M.: Mir publ., 1980.– 341 p.
4. *Pushkar N. S., Shrago M. I., Belous A. M., Kalugin Yu. V.* Cryoprotectants.–Kiev: Nauk. dumka publ., 1978.– P. 204.
5. *Rozanov L. F., Smolyaninova E. I.* Osmotic behavior of murine oocytes and embryos: role of the cytoskeleton // Probl. kriobiologii.– 1994.– № 4.– P. 26–31.
6. *Smirnova E. A., Kazachkina N. N., Grebeschikova V. V., Chentsov Yu. A.* Resistance of various types of cells to the action of hypotony // Tsitologiya.– 1987.– XXIX, № 1.– P. 47–53.
7. *Takahashi T., Douglas M. St. J., Williams R. J.* Coagulation of Sea Urchin Egg Cytoplasm by High Salt Concentration // Cryobiology.– 1982.– 19, № 5.– P. 511–519.
8. *Vincent C., Gerard P., Edith P. et al.* Comparative effect of cryoprotectants on rabbit embryos cytosceleton // Cryo-Lett.– 1987.– 8, № 6.– P. 356–361.

Accepted in 22.12.98

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.119: 615.361.013.85.014.413

UDC 612.119: 615.361.013.85.014.413

Ответ лимфогемопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса

А. Н. ГОЛЬЦЕВ, Л. В. ОСТАНКОВА, Е. Д. ЛУЦЕНКО, Т. Г. ДУБРАВА, Е. В. ОПАНАСЕНКО, В. А. ПРОКОФЬЕВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Response of the Lymphohemopoietic System of the Organism on the Injection of the Products of the Fetoplacental Complex

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

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

Обобщены данные литературы и результаты собственных исследований по оценке влияния продуктов фетоплацентарного комплекса на состояние лимфогемопоэтической системы реципиентов с разным исходным статусом. На экспериментальных моделях доказано иммуно- и гематотропное влияние плацентарных факторов. Продемонстрирована способность гомогената плаценты человека (ГПЧ) регулировать функциональный статус кроветворных предшественников различного уровня дифференцировки. Проведен анализ степени и характера влияния гомогената на селезеночное и медуллярное кроветворение. Предложена гипотетическая модель наработки гематотропных цитокинов в плаценте в разные сроки гестации. В модельных системах показано снижение функциональной активности гомогената плаценты после криоконсервирования.

Узагальнено дані літератури і результати власних досліджень щодо оцінки впливу продуктів фетоплацентарного комплексу людини на стан лімфогемопоетичної системи реципієнтів з різним вихідним статусом. На експериментальних моделях доведено імуно- и гематотропний вплив плацентарних факторів. Продемонстрована здатність гомогенату плаценти людини (ГПЛ) регулювати функціональний статус кровотворних попередників різного рівня диференціювання. Проведено аналіз ступеня і характеру впливу гомогенату на селезінкове і медулярне кровотворення. Запропоновано гіпотетичну модель наробки гематотропних цитокинів у плаценті в різні терміни гестації. У модельних системах показано зниження функціональної активності гомогенату плаценти після кріоконсервування.

The data reported elsewhere and the results of the authors' own investigations on evaluating the effect of the products of the fetoplacental complex on the state of the lymphohemopoietic system of the recipients with different initial status were summarized. The immuno- and hematotropic actions of the placental factors were demonstrated on various experimental models. The human placental homogenate (HPH) was shown to be able to regulate functional status of the hemopoietic progenitors of various levels of differentiation. The extent and nature of action of the homogenate on the splenic and medullary hemopoiesis were analyzed. A hypothetical model of production and accumulation of hematotropic cytokines in the placenta at various terms of gestation was proposed. A reduction in the functional activity in the placenta homogenate following cryopreservation was evidenced on the model systems.

Биологическая активность продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК), в частности ГПЧ, была оценена в различных экспериментальных моделях с идентификацией иммунотропных свойств в организме "интактного" реципиента, или в условиях развития дисфункционального состояния лимфогемопоэтического комплекса (ЛГПК) [5, 6]. Использовав криоконсервирование как методический подход к модификации функционального состояния миелотрансплантата [7, 8], было показано, что различные режимы замораживания-оттаивания могут по-разному влиять на компонентный состав костного мозга (КМ). Другими словами, определенные режимы криоконсервирования инактивируют в КМ субпопуляции акцессорно-регуляторных клеток подобно искусственной их элиминации в системе *in vitro*. Обладающие такой активностью клетки входят в состав фракции адгезивных элементов КМ, в которой, судя по морфологической и функциональной оценке, присутствуют клетки мо-

The biological activity of the products of the fetoplacental complex (PFPC), of the human placental homogenate (HPH), in particular, was evaluated on various experimental models with identification of the immunotropic properties in the organism of the "intact" recipient or during development of the dysfunctional state of the lymphohemopoietic complex (LHPC) [5, 6]. Using cryopreservation as a methodical approach to modification of the functional state of the myelograft [7, 8], various modes of freeze-thawing were shown to differently affect the component composition of the bone marrow (BM). In other words, certain modes of cryopreservation inactivate in the BM the subpopulations of the accessory-regulatory cells alike their artificial elimination in vitro. The cells, possessing such an activity, incorporate the fraction of the BM adhesive elements, in which, as judged by the morphological and functional evaluation, the cells of the monocyto-phagocytic system (MPC) are available [8]. These changes in the cell composition

Матеріал, захищений авторським правом

ноцитарно-фагоцитарной системы (МФС) [8]. Особую значимость такого рода изменения клеточного состава имеют при пересадке гистонесовместимого КМ реципиентам со сниженной иммунореактивностью, у которых потенциально возможно развитие фатальной реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ). Эта реакция реализуется иммунокомпетентными Т-лимфоцитами донорского типа в отношении чужеродных антигенов хозяина [25, 28]. Механизм активации эффекторных Т-клеток подробно описан [30, 34], причем отмечается важная роль в этом процессе клеток МФС: без выработки антигенпрезентирующими клетками (АПК) костимуляционного сигнала и антигенов II класса (Ia-антигенов) главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) развивается состояние неотвечаемости Т-лимфоцитов, т.е. "анергия" [34]. Донорские Т-лимфоциты будут распознавать чужеродные антигенные структуры на различных клетках, в том числе и на АПК реципиента. Однако в ответе они будут рестриктированы по HLA молекулам II класса АПК хозяина [17]. В этом случае необходимо участие АПК донорского типа, которые, наряду с процессированным антигеном хозяина, презентируют Т-лимфоциту собственные молекулы HLA II класса и костимуляционный сигнал [34]. Следовательно, предварительная элиминация (инактивация) из миелотрансплантата АПК является существенным моментом предупреждения (снижения степени) развития РТПХ. Именно с этих позиций и были рассмотрены полученные нами данные о снижении РТПХ активности аллогенного КМ, криоконсервированного в определенных режимах, либо нативного с предварительной элиминацией адгезивных клеток [8].

Факт модуляции состояния КМ при истощении по некоторым клеткам является основанием апробации иного пути изменения функционального статуса миелотрансплантата. Альтернативным вариантом может быть не удаление, а дополнительное введение с КМ клеток, потенциально обладающих свойством акцессорно-регуляторных элементов. Анализ данных [17, 21–23] ориентирует исследователей на возможность использования в этой роли ПФПК. К настоящему времени идентифицирован и систематизирован широкий спектр плацентарных и фетальных белков с гормональной, ферментативной или пока еще неустановленной активностью, проявляющих полифункциональные свойства. Считается, что иммуномодулирующий эффект белков ПФПК реализуется на уровне распознавания антигенных структур, активации процесса и клональной экспансии антиген-распознающих иммунокомпетентных клеток (ИКК) [15]. Показано, например, что их совместное введение с аллогенным КМ существенно снижает иммунореактивность миелотрансплантата [10]. При изучении механизмов иммуномодулирующей активности ГПЧ установлено, что он не только работает в "классичес-

become particularly important during grafting of the histoincompatible BM to the recipients with reduced immune reactivity, who may potentially develop a "graft versus host" fatal response (GVHR). This response is realized by the immunocompetent T-lymphocytes of the donor type towards the host alien antigens [25, 28]. The mechanism of activation of the effector T-cells is described in details elsewhere [30, 34], and the important role of the MPC cells in this process is stressed: without production of the costimulatory signal and antigens of the 2nd class (Ia-antigens) of the main complex of histocompatibility (MCH) by the antigen-presenting cells (APC) the state of irresponsiveness of the T-lymphocytes is developed, i.e. "anergy" [34]. The donor T-lymphocytes will recognize the alien antigen structures on various cells, including the recipient APC. However, within the response they will be restricted by the HLA molecules of the 2nd class of the host APC [17]. In this case the donor-type APC should be involved, which, together with the processed host antigen, present their own HLA molecules of the 2nd class and co-stimulatory signal to the T-lymphocyte [34]. Hence, preliminary elimination (inactivation) of the APC out of the myelograft is an important stage of prevention (reducing the extent) of the GVHR development. Just from this very point the authors viewed the data on the reduction of the GVHR-activity of the allogenic BM, cryopreserved under certain modes, or of the native BM with preliminary elimination of the adhesive cells [8].

The fact of the modulation of the BM state by the depletion of some cells is the basis for searching for another way of altering the functional status of the myelograft. An alternative variant may be not an elimination but an additional injection of the cells with the BM, which possess a potential of the accessory-regulatory elements. The analysis of the data reported elsewhere [17, 21–23] supports a possible usage of the PFPC in this role. By now a wide spectrum of the placental and fetal proteins with hormonal, enzymatic and not yet identified activities, which manifest polyfunctional properties, has been identified and systematized. It is thought that the immunomodulating effect of the PFPC proteins is realized at the level of recognition of the antigen structures, activation of the process and clonal expansion of the antigen-recognizing immunocompetent cells (ICC) [15]. It was shown, e.g. that their combined injection with the allogenic BM significantly reduces the immune reactivity of the myelograft [10]. When studying the mechanisms of the HPH activity it was found that it works not only in the "classical" variant of activation of the suppressor link of the immunity of the peripheral compartment of the immune system (IS), but also regulates the processes of formation of the T-system of immunity in its central organs [8].

Sufficiently profound and stable changes in the IS status of the recipients, experiencing this therapy, do

Матеріал, захищений авторським правом

ком" варианте активации супрессорного звена иммунитета периферического компартмента иммунной системы (ИС), но и регулирует процессы становления Т-системы иммунитета в центральных ее органах [8].

Достаточно глубокие и стойкие изменения состояния ИС реципиентов в процессе проведения такого рода терапии не исключают того, что продуцируемый плацентой набор цитокинов может реализовать свою иммунотропную активность, в том числе и при развитии аутоиммунных заболеваний (АИЗ), через генеральную модуляцию ЛГПК на уровне ранних его предшественников. Иначе говоря, плацента обладает тем запасом регуляторных цитокинов, которые могут "перепрофилировать" не только функциональный статус имеющихся в организме в данный момент ИКК, но и процесса более ранней ориентации дифференцировки клеток в кроветворном компартменте. В фетоплацентарном пространстве идентифицированы продуцируемые *in situm* гемопоэтические колониестимулирующие факторы (КСФ), относящиеся к классическим ростовым факторам кроветворной системы: гранулоцитарно-макрофагальный (ГМ-КСФ) и макрофагальный (М-КСФ) [23]. Вырабатываемый плацентой М-КСФ является не только мощным аутокринным фактором для инфильтрирующих плаценту макрофагов, но и трофическим фактором, стимулирующим рост плаценты. Под действием М-КСФ клетки МФС усиливают продукцию ФНО-α, который в определенной концентрации активирует Тх2-клетки, что и отмечается при беременности [32]. М-КСФ, судя по направленности действия в отношении клеток МФС, является оппозитным α_2-макроглобулину (α_2-МГ) цитокином [22, 23]. Плацентарный ГМ-КСФ влияет на процессы пролиферации клеток и роста плаценты и усиливает продукцию ФНО-α [23]. ГМ-КСФ плацентарного происхождения способен оказывать и стимулирующее влияние на ранние предшественники Т-лимфоцитов, ориентируя их дифференцировку в СД4-клетки, экспрессирующие рецептор к ИЛ-2, т.е. Т-лимфоциты провоспалительного каскада дифференцировки. Следовательно, ГМ-КСФ, подобно α_2-МГ, может при определенных условиях проявлять противоположную М-КСФ иммуномодулирующую активность.

Несмотря на очевидный гематотропный потенциал плацентарных М-КСФ и ГМ-КСФ, возможность модуляции под действием ГПЧ кроветворной системы реципиента требует экспериментального подтверждения. Необходимость проведения работ в данном направлении представляет как теоретическую, так и практическую значимость, открывая перспективы клинического применения ГПЧ при лечении дисфункционального состояния этой системы. В представленной работе была проведена оценка степени влияния ГПЧ на состояние ЛГПК реципиентов с различным исходным статусом.

not exclude the fact that the set of the cytokines, produced by the placenta, may realize its immunotropic activity, as it happens during the occurrence of the autoimmune diseases (AID), through general modulation of the LHPC at the level of its early progenitors. In other words, the placenta possess such a store of the regulatory cytokines, which may "re-orientate" not only the functional status of the ICC, available in the organism at this moment, but also the process of the early orientation of the cell differentiation in the hemopoietic compartment. In the fetoplacental space there were identified the *in situm* produced hemopoietic colony-stimulating factors (CSF), which belong to classical growth factors of the hemopoietic system: granulocyto-macrophagal (GM-MCP) and macrophagal (M-CSF) ones [23]. the M-CSP, produced by the placenta, is not only a powerful autocrine factors for the macrophages, which infiltrate the placenta, but also a trophic factor, which stimulates the growth of the placenta. Under the action of the M-CSF the MPC cells enhance production of the PNO-α, which to some extent activates the Th2-cells, and this reported during pregnancy [32]. As judged by the direction of action of the M-CSF towards the MPC cells, it is a cytokine, opposite to the α_2-macroglobulin (α_2-MG) [22, 23]. The placental GM-CSF affects the processes of cell proliferation and growth of the placenta and enhances production of the PNO-α [23]. It is also able of exercising a stimulating action on the early progenitors of the T-lymphocytes, orienting their differentiation into the CD4-cells, which express the receptor to the IL-2, i.e. the T-lymphocytes of the antiinflammatory cascade of differentiation. Hence, the GM-CSF, alike α_2-MG under certain conditions may manifest the immunomodulating activity, which is opposite to the M-CSF.

In spite of the evident hematotropic potential of the placental M-CSF and GM-CSF, the possibility of the HPH-initiated stimulation of the recipient hemopoietic system still waits to be experimentally confirmed. The necessity of doing further research in this direction is of both theoretical and practical importance, thus opening up the prospects of clinical application of the HPH in the therapy of the dysfunctional state of this system. The submitted reports deals with the evaluation of the extent of the HPH action on the state of the LHPC recipients with different initial status.The hematotropic activity of the HPH was pre-analyzed in the experiments with grafting of the syngenic BM to the recipients with the aplasia of hemopoiesis. The circumstances of initiation of the aplasia of the hemopoietic system of the mice-recipients, cryopreservation, HPH and some other distinguishing features of staging the experiments were described elsewhere [7, 8, 12]. The content of the total protein in the HPH was calculated by the method of paper chromatography according to Kirk, and the concentration of the protein was 12 mg/ml. The bovine serum albumin (BSA) was injected in the concentra-

Матеріал, захищений авторським правом

Предварительно гематотропная активность ГПЧ была проанализирована в экспериментах с пересадкой реципиентам с аплазией кроветворения сингенного КМ. Условия инициации аплазии гемопоэтической системы мышей-реципиентов, криоконсервирования ГПЧ и некоторые другие особенности постановки эксперимента описаны в [7, 8, 12]. Общий белок ГПЧ определяли методом бумажной хроматографии по Кирку и концентрация белка составляла 12 мг/мл. Бычий сывороточный альбумин (БСА) вводили в концентрации, эквивалентной содержанию белка в 0,5 мл ГПЧ, т.е. 6 мг/мышь.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, совместная трансплантация ГПЧ и КМ сопровождалась повышением гемопоэтической активности миелотрансплантата. Стимулирующее действие ГПЧ распространялось на различные плацдармы кроветворения реципиента и выражалось в различной степени. Регуляторная активность проявлялась как в отношении КОЕс, так и кроветворных клеток, расселившихся в медуллярном (костномозговом) участке гемопоэтической системы. Анализ результатов показывает также, что регуляторные цитокины ГПЧ стимулируют активность КОЕс различного уровня дифференцировки, т.е. КОЕс-8 и КОЕс-12. При этом прослеживался четкий дозозависимый эффект. Так, введение 0,1 мл ГПЧ хотя и недостоверно, но все же стимулировало колониеобразование в селезенке на 8-е сутки. Пятикратное увеличение дозы сопровождалось досто-

Таблица 1

Результаты совместной трансплантации КМ и ГПЧ летально облученным мышам-реципиентам

Группы реципиентов с трансплантатом*	Колониеобразующая способность трансплантата		Клеточность в медуллярном кроветворении (бедро×10^5)***	Выживаемость реципиентов к 12-м суткам, %
	КОЕс-8	КОЕс-12		
КМ (10^5)	9,6 ± 0,5	10,2 ± 1,0	4,1 ± 0,6	54,1 ± 3,1
КМ + НГПЧ (0,1 мл/мышь)	10,9 ± 0,5	14,2 ± 1,0**	12,8 ± 1,0**	64,9 ± 3,3**
КМ + НГПЧ (0,5 мл/мышь)	14,4 ± 0,9**	17,3 ± 1,2**	16,9 ± 1,1*	84,8 ± 3,9**
КМ + КГПЧ (0,1 мл/мышь)	10,2 ± 0,4	12,8 ± 0,9**	10,9 ± 0,7**	61,8 ± 2,9**
КМ + КГПЧ (0,5 мл/мышь)	12,6 ± 0,6**	14,6 ± 1,1**	15,0 ± 1,0**	76,4 ± 3,2**
НГПЧ (0,5 мл/мышь)	0,8 ± 0,08**	1,2 ± 0,2**	1,1 ± 0,2**	3,1 ± 0,5**
КГПЧ (0,5 мл/мышь)	0,6 ± 0,1**	1,1 ± 0,05**	0,8 ± 0,1**	4,3 ± 0,4**
КМ + БСА	8,9 ± 0,8	10,9 ± 1,2	5,0 ± 0,7	50,6 ± 2,8**
Контроль облучения	0,4 ± 0,1**	0,7 ± 0,1**	0,9 ± 0,1**	0

Примечание: *реципиентам введен сингенный нативный КМ; **достоверные различия ($p < 0,05$) в сравнении с 1-й группой; ***результат получен на 12-е сутки; в таблице представлены средние результаты 3-х экспериментов с общим для каждой группы $n = 8–11$; НГПЧ и КГПЧ — нативный и криоконсервированный гомогенат плаценты человека.

Table 1

Results of combined transplantation of BM and HPH to lethally irradiated mice-recipients

Groups of recipients with the graft*	Colony-forming ability of the graft		Cell composition in medullary hemopoiesis (femur×10^5)***	Survival of recipients by 12th day, %
	CFUc-8	CFUc-12		
BM (10^5)	9.6 ± 0.5	10.2 ± 1.0	4.1 ± 0.6	54.1 ± 3.1
HPH (0.1 ml/mouse)	10.9 ± 0.5	14.2 ± 1.0**	12.8 ± 1.0**	64.9 ± 3.3**
BM + NHPH (0.5 ml/mouse)	14.4 ± 0.9**	17.3 ± 1.2**	16.9 ± 1.1*	84.8 ± 3.9**
BM + CHPH (0.1 ml/mouse)	10.2 ± 0.4	12.8 ± 0.9**	10.9 ± 0.7**	61.8 ± 2.9**
BM + CHPH (0.5 ml/mouse)	12.6 ± 0.6**	14.6 ± 1.1**	15.0 ± 1.0**	76.4 ± 3.2**
NHPH (0.5 ml/mouse)	0.8 ± 0.08**	1.2 ± 0.2**	1.1 ± 0.2**	3.1 ± 0.5**
CHPH (0.5 ml/mouse)	0.6 ± 0.1**	1.1 ± 0.05**	0.8 ± 0.1**	4.3 ± 0.4**
BM + BSA	8.9 ± 0.8	10.9 ± 1.2	5.0 ± 0.7	50.6 ± 2.8**
Irradiation control	0.4 ± 0.1**	0.7 ± 0.1**	0.9 ± 0.1**	0

Note: *recipients were injected with syngenic native bone marrow; **the differences are significant ($p < 0.05$) as compared with group 1; ***the result was obtained by the 12th day; Table shows the average results of 3 experiments with the general for every group $n = 8–11$; NHPH and CHPH — native and cryopreserved homogenates of the human placenta.

tion, equivalent to the content of the protein in 0.5 ml of the HPH, i.e. 6 mg/mouse.

It follows from the data in Table 1 that a combined transplantation of the HPH and BM was accompanied by a rise in the hemopoietic activity of the myelograft. A stimulating action of the HPH involved various sites of hemopoiesis and was differently manifested. The regulatory activity was manifested both towards the CFUc and hemopoietic cells, homing in the medullary (bone marrow) section of the hemopoietic system. The analysis of the results also demonstrates that the HPH regulatory cytokines stimulate the activity of the CFUc of various levels of differentiation, i.e. CFUc-8 and CFUc-12. here a clear dose-dependent effect was identified. For example, injection of 0.1 ml HPH stimulated, though insignificantly, colony formation in the spleen by the 8th day. A 5-fold rise in the dose was accompanied by a significant (by 1.4-fold) increase in the number of colonies of this type. When studying functional activity of the CFUc-12 a stimulating effect of the HPH was stronger pronounced. Even its minimum dose produced a significant increase (by 39.2%) in the content of colonies, while injection of a higher dose was accompanied by their increase by 1.7-fold. Following administration of the HPH without the BM no manifested increase in the colony-formation was observed in the spleen, which is indicative of the absence of the hemopoietic progenitors (CFUc) in the HPH. Hence, an increase in the content of colonies

Матеріал, захищений авторським правом

верным (в 1,4 раза) повышением содержания колоний этого типа. При исследовании функциональной активности КОЕс-12 стимулирующий эффект ГПЧ прослеживался в более выраженной форме. Даже минимальная его доза вызывала достоверное повышение (на 39,2%) содержания колоний, а введение большей дозы сопровождалось увеличением их в 1,7 раза. После введения ГПЧ без КМ выраженного повышения колониеобразования в селезенке не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии в ГПЧ кроветворных предшественников (КОЕс). Следовательно, повышение содержания колоний при совместной трансплантации ГПЧ и КМ связано с проявлением гематотропного регуляторного потенциала ГПЧ для донорских кроветворных клеток. Подтверждением "специфической" активации кроветворения под действием ГПЧ, а не простой антигенной нагрузки является отсутствие повышения пролиферативной активности кроветворной системы при введении БСА.

Следовательно, в плаценте присутствуют не только стимуляторы роста коммитированных кроветворных предшественников (например КОЕ-ГМ), но и менее дифференцированных их форм. Действительно, помимо КСФ-1 и ГМ-КСФ, плацента синтезирует такие интерлейкины, как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 [23]. В [2] отмечалось, что разделение цитокинов на отдельные классы в какой-то степени является условным, поскольку вместе с традиционным КСФ в регуляции функционального состояния полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) принимают участие и такие цитокины, как ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-15. В плаценте присутствуют ИЛ-1 и ИЛ-6, что позволяет считать возможным проявление гомогенатом гематотропной активности в системе *in vivo*, что подтверждается полученными нами результатами. Такого рода активность ГПЧ и для 12-суточных КОЕс, являющихся приближенной формой к полипотентным СКК (ПСКК), свидетельствует о наличии в плаценте факторов регуляции кроветворения подобных стволовоклеточному фактору (СКФ), т.е. фактору Стилла [16]. СКФ обладает свойством стимуляции пролиферации и дифференцировки ПСКК, продуцируется фибробластами, стромальными, эпителиальными и эндотелиальными клетками, т.е. структурами, присутствующими в плаценте. Тот факт, что часть децидуальных клеток имеет костномозговое происхождение, также свидетельствует о потенциальной возможности ГПЧ регулировать гемопоэз [4]. Вместе с тем надо отметить, что при трансплантации КМ с КГПЧ степень выраженности эффекта стимуляции колониеобразования была несколько иная. Обе его дозы обладали меньшей колониестимулирующей активностью. Причем, если при введении 0,1 мл препарата отмечалась лишь тенденция к снижению активности, то после применения 0,5 мл различия

during combined grafting of the HPH and BM relates to manifestation of hematotropic regulatory potential of the HPH towards donor hemopoietic cells. "Specific" activation of hemopoiesis under the action of the HPH, and not of the simple antigenic load, is supported by the missing increase in the proliferative activity of the hemopoietic system after injection of the BSA.

Hence, the placenta contains not only the stimulators of the growth of the committed hemopoietic progenitors (e.g. CFU-GM), but also their less differentiated forms. Indeed, beside CSF-1 and GM-CSF, the placenta synthesizes such interleukins as IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 [23]. Elsewhere [2] it was reported that separation of the cytokines into separate classes is to some extent conditional, since together with traditional CSF such interleukins as IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, IL-12, IL-15 are involved into the regulation of the functional states of the polypotent stem hemopoietic cells (PSHC). The availability of IL-1 and IL-6 in the placenta allows to assume that the homogenate may manifest hematotropic activity *in vivo*, which is supported by the authors' results. Such an activity of the HPH towards the CFUc, aged 12 days, which are approximated to the polypotent SHC (PSHC), testifies to the availability in the placenta of the factors, regulating hemopoiesis, like stem cell factor (CSF) of Still [16]. The SCF has the ability to proliferate and differentiate the PSHC, it is produced by fibroblasts, stromal, epithelial and endothelial cells, i.e. by the structures, which are available in the placenta. The fact that some decidual cells are of the bone marrow origin, also supports a potential ability of the HPH to regulate hemopoiesis [4]. At the same time it should be mentioned that during transplantation of the BM with the HPH the extent of the manifestation of the colony-stimulating effect was different. Both its doses possessed lower colony-stimulating activity. Moreover, if injection of 0.1 ml of the preparation produced only a tendency towards reducing the activity, then administration of 0.5 ml brought about significant differences. Such a reduction in the extent of the HPH action was reported for CFUc-8 and CFUc-12.

Hypothetically a rise in the content of the CFU in the recipient spleen under the action of the HPH may be due a change in the nature of their migration from the BM into the spleen. In this case a reduction in the total number of the myelocaryocytes may be expected due a decrease in the CFU content and poorly manifested integral proliferative activity in the medullary hemopoiesis. However, a combined injection of the HPH and bone marrow was accompanied by a significant increase in the cell composition in the femur, thus stressing a high probability of the process of the CFU homing under the action of the HPH. Nevertheless, the ability of the homogenate to stimulate homing in the CFU hemopoietic microenvironment cannot be excluded. It is common knowledge that no more than

Матеріал, захищений авторським правом

были достоверными. Такое снижение степени влияния КГПЧ было отмечено для КОЕс-8 и КОЕс-12.

Гипотетически повышение содержания КОЕ в селезенке реципиента под действием ГПЧ может быть следствием изменения характера их миграции из КМ в селезенку. В этом случае за счет снижения содержания КОЕ и менее выраженной интегральной пролиферативной активности в медуллярном кроветворении следовало бы ожидать уменьшения общего числа миелокариоцитов. Однако совместное введение с костным мозгом ГПЧ сопровождалось значительным повышением клеточности в бедре, подчеркивая большую вероятность стимуляции под действием ГПЧ процесса пролиферации расселившихся КОЕ. И все же нельзя исключать способность гомогената стимулировать расселение в кроветворном микроокружении КОЕ. Известно, что из всех трансплантируемых колониеобразующих кроветворных клеток в селезенке и КМ оседает не более 40% КОЕ [19], а остальная их масса "инактивируется" при попадании в другие органы и ткани. Однако имеются данные о том, что "хомминг" КОЕ в кроветворном микроокружении может быть повышен под действием некоторых биоактивных агентов [33]. Следовательно, увеличение содержания КОЕ в селезенке и КМ после совместного введения миелокариоцитов и ГПЧ может быть следствием проявления гомогенатом обоих свойств.

Обращает на себя внимание факт прямой зависимости выживаемости реципиентов от активности процесса кроветворения в селезенке и КМ. Вместе с тем показано, что клетки эмбриональной печени (КЭП) при совместной трансплантации с КМ стимулировали в большей степени медуллярное кроветворение, чем колониеобразование в селезенке. При этом выживаемость реципиентов коррелировала с активностью пролиферативного процесса в медуллярном кроветворении [10]. Известно, что мигрирующие в КМ и селезенку кроветворные КОЕ по-разному отвечают на тот или иной "набор" регуляторных гематотропных медиаторов кроветворного микроокружения [19]. Из этого следует, что КЭП и ГПЧ могут содержать различные "наборы" такого рода цитокинов, определяющих соответствующий ответ КОЕ в кроветворном микроокружении селезенки или КМ. Например, наиболее мощным стимулом запуска ПСКК в пролиферацию и дифференцировку является совместно использованная триада СКФ, ИЛ-6 и/или ИЛ-3 [26]. Находящиеся, если не в этом же, то близком к нему компартменте мультифактор-отвечающие кроветворные клетки с высоким пролиферативным потенциалом (ВПП) КОЕ содержат две отвечающие пролиферацией субпопуляции: одна на сложный стимул (КСФ-1 + ИЛ-1 + ИЛ-3 + ИЛ-6), другая менее сложный (КСФ-1 + ИЛ-1 + ИЛ-6) [29].

В совокупности с полученными нами данными в другой экспериментальной модели [9] становятся

40% of the CFU out of all the transplanted colony-forming cells settles down in the spleen and BM [19], while the rest isinactivated" after entering other organs and tissues. However, it is thought that homing of the CFU in the hemopoietic microenvironment may be increased under the action of some bioactive agents [33]. Hence, a rise in the content of the CFU in the spleen and BM after combined injection of the myelocaryocytes and HPH may be due to the manifestation of both properties by the homogenate.

It should be mentioned that survival of recipients is directly dependent on the activity of the process of hemopoiesis in the spleen and BM. At the same time it was reported that the combined injection of the cells of the embryonic liver (CEL) together with BM induced a stronger stimulation of the medullary hemopoiesis as compared with colony-formation in the spleen. Here the survival of recipients correlated with the activity of the proliferative process in the medullary hemopoiesis [10]. It is no secret that the hemopoietic CFU which migrate into the BM and spleen, differently respond to one or anotherset of hematotropic mediators of the hemopoietic microenvironment [19]. It follows from here that the CEL and HPH may contain various "sets" of these cytokines, determining a corresponding response of the CFU in the hemopoietic microenvironment of the spleen or BM. For example, a jointly used SCF, IL-6 and/or IL-3 triade is the most powerful stimulus of sending the PSHC into proliferation and differentiation [26]. The multifactor-responding hemopoietic cells with high proliferative potential (HPP) CFU, which stay if not in the same, but in a very close compartment to it, contain two subpopulations, one of which responds by proliferation to a complex stimulus (CSF-1 + IL-1 + IL-3 + IL-6), and another — by a less complicated one (CSF-1 + + IL-1 + IL-6) [29].

When analyzing the data obtained by the authors on another experimental model [9] both the immune-correcting action of the HPH becomes evident during development of the immune conflict, and its hemopoiesis-stimulating activity during myelotransplantation. It seems likely that both the regulators of the hemopoiesis and the factors, limiting its immune reactivity, are concentrated in the placenta. Such an activity is realized via the natural suppressors (NS) of the bone marrow, which produce a non-specific suppressive factor, limiting the development of the immune conflict during transplantation of the allogenic BM [35]. The NS enriched fraction inhibited the extent of the GVHR during combined transplantation with the allogenic BM [31]. Nevertheless, the nature of the NS interactions with the hemopoietic progenitors remains unclear. In this respect it seems interesting and expedient to evaluate the dual activities (immune and hematotropic) of the HPH during the development of the autoimmune disease in the form of one of the GVHR types. Indeed, the GVHR is a representative of a wide spectrum of the AID [13].

Матеріал, захищений авторським правом

очевидными как иммунокоррегирующее свойство ГПЧ в условиях развития иммунного конфликта, так и его гемопоэзстимулирующая активность при миелотрансплантации. Похоже, что в плаценте, подобно КМ, сосредоточены как регуляторы гемопоэза, так и факторы, ограничивающие его иммунореактивность. Такого рода активность реализуется естественными супрессорами (ЕС) костного мозга, продуцирующими неспецифический супрессорный фактор, ограничивающий развитие иммунного конфликта при пересадке аллогенного КМ [35]. Обогащенная фракция ЕС при совместной трансплантации с аллогенным КМ ингибирует выраженность РТПХ [31]. Тем не менее характер взаимоотношений ЕС с гемопоэтическими предшественниками остается неясным. В связи с этим интересно и важно одновременно оценить дуалистическую активность (иммуно- и гематотропную) ГПЧ в различных условиях развития аутоиммунного заболевания (АИЗ) в виде одной из форм РТПХ. Действительно, РТПХ является представителем широкого спектра АИЗ [13]. Однако среди них можно выделить те, в инициации и развитии которых бóльшую значимость имеют элементы клеточного или гуморального звена ИС [18]. При различной степени участия этих субстратов ИС реализуется РТПХ в тех или иных структурах организма, в острой или хронической форме, в виде системного или локального ее проявления.

На основании сказанного для оценки гемато- и иммуномодулирующей активности ГПЧ нами была выбрана экспериментальная модель срыва беременности, в которой иммунный конфликт вызывали введением экзогенных ИКК, инициирующих РТПХ [20]. Эта модель аутоиммунной патологии является в определенной мере универсальной, характеризующей как отмену иммунологической толерантности, так и экспансию в организме аутоантигенов. В клинической практике подобный конфликт наблюдается чаще всего именно на фоне дисфункционального состояния плаценты, характеризуется как угроза прерывания беременности (УПБ) иммунной природы и, с точки зрения участия тех или иных субстратов ИС, является этиологически мультифакториальным. Вместе с тем надо отметить, что по направленности иммунных реакций он рассматривается как реакция хозяина против трансплантата (РХПТ) с развитием иммуноагрессии материнских эффекторных клеток против антигенов фетоплацентарного комплекса (ФПК) [20]. Мы считаем, что предложенная экспериментальная модель наиболее приемлема для изучения патофизиологических основ развития данной реакции и терапевтического влияния ГПЧ на характер ее проявления.

Было проведено исследование влияния ГПЧ на характер развития АИЗ в виде РТПХ в системе иммунных взаимодействий "мать–плод". Условия эксперимента были следующими. В конце первого

However, among them those responses may be separated, in the initiation and development of which major roles are played by the elements of the cell or humoral links of the IS [18]. When the extent of the involvement of the IS substrates is different, the GVHR is differently realized in one or the other structures of the organism, in the acute or chronic form, and with systemic or local manifestation of it.

Judging from the above, to evaluate the hemato- and immune-modulating activities of the HPH the authors selected an artificial model of the pregnancy termination, in which the immune conflict was stimulated by injection of exogenous ICC, initiating the GVHR [20]. This model of the autoimmune pathology is to some extent universal, characterizing both cancellation of the immunologic tolerance and expansion of the autoantigens in the organism. In clinical practice such a conflict is most frequently observed under the dysfunctional state of the placenta; it is characterized as a threat of the pregnancy termination (TPT) of the immune nature and, from the point of view of the involvement of one or the other IS substrates, is an etiologically multifactor one.At the same time it should be noted that according to the direction of the immune responses it is considered as a response of the host against the graft (RGAG) with the development of the immune aggression of the maternal effector cells against the antigens of the fetoplacental complex (FPC) [20]. The authors believe the proposed experimental model is acceptable for studying pathophysiological grounds of the development of the given response and therapeutic action of the HPH on the nature of its manifestation.

There was studied the action of the HPH on the nature of the AID development in the form of the GVHR within the system of the immune interaction "mother-fetus". The experimental conditions were as follows. At the end of the first trimester of pregnancy the female mice of the CBA line were intravenously injected with the antigen-sensibilized lymphoid cells ($3–5 \cdot 10^7$ per mouse) of the father line (C57B1 males) of the spleen and lymphatic nodes of the mother line, i.e. the effector cells (EC) in a 2:1 ratio. The manifestation of the response against the fetoplacental structures, initiated by the injected lymphocytes, was evaluated by the integral index — termination of pregnancy. Besides, the states of the LHPC of the pregnant females were taken into account, in particular, cell composition of the BM, spleen, thymus, lymphatic nodes, and the phenotypical characteristics of the ICC in them were evaluated with the help of the monoclonal antibodies (MAB). The MAB to the membrane antigenic determinants of the lymphoid cells (CD8, CD4), belonging to the IgG-2a class, were courteously granted by the workers of the Laboratory of the mechanisms of regulation of the immunity of the Russian Oncological Scientific Center, Moscow, headed by Prof. D. B. Kazansky. The pregnant females were monitored for 14-15 days after coupling with the male

Матеріал, захищений авторським правом

триместра беременности (7-е сутки) самкам мышей линии СВА внутривенно вводили сенсибилизированные к антигенам отцовской линии (самцы С57Bl) лимфоидные клетки ($3–5·10^7$ на мышь) селезенки и лимфоузлов материнской линии, т.е. клетки-эффекторы (КЭ) в соотношении 2:1. Проявление инициируемой введенными лимфоцитами реакции против фетоплацентарных структур оценивали по интегральному показателю – срыву беременности. Кроме того, учитывали состояние ЛГПК беременных самок, в частности, клеточность КМ, селезенки, тимуса, лимфатических узлов, а с помощью моноклональных антител (МАТ) оценивали фенотипические характеристики ИКК в них. МАТ к мембранным антигенным детерминантам лимфоидных клеток (CD8, CD4), относящиеся к классу IgG-2a, были нам любезно предоставлены сотрудниками лаборатории механизмов регуляции иммунитета (Зав. лаб. проф. Казанский Д. Б.) Российского онкологического научного центра, г. Москва. Беременных самок наблюдали на протяжении 14–15 дней после спаривания с самцами. ГПЧ вводили внутривенно в дозе 0,5 мл за три дня до введения КЭ. Целесообразность введения ГПЧ именно в этот срок обоснована в [5]. Подробно все детали методических подходов, использованных в данных экспериментах, были описаны в [5, 6].

Как свидетельствуют результаты (рис. 1), введение беременным самкам КЭ сопровождалось срывом беременности у большинства из них в период с 9-х по 11-е сутки. Сохранили беременность, закончившуюся родами в срок, не более 20% мышей. Введение НГПЧ увеличивало количество мышей (до 88%), у которых после введения КЭ беременность завершилась в срок, аналогичный физиологически протекающей беременности (ФПБ). Криоконсервированный гомогенат оказался менее эффективен в предупреждении развития иммунного конфликта. Только у 67% мышей данной группы беременность завершилась в срок. Судя по количеству мышей, родивших потомство в срок, введение как НГПЧ, так и КГПЧ не изменяло ФПБ. Очевидно, срыв беременности в данных модельных экспериментах реализуется введенными КЭ, отменяющими иммунологическую толерантность в системе "мать–плод". Одним из механизмов реализации отмены толерантности может быть нарушение сбалансированного содержания регуляторных клеток Т-звена иммунитета, в частности снижения Т-супрессоров, и на этом фоне повышения активности материнских клеток-эффекторов [32]. Подобная ситуация наблюдается при введении сенсибилизированных экзогенных КЭ материнской линии, активность которых не способна ингибировать присутствующие в этот период ФПБ Т-супрессоры. В значительной степени иммунореактивность введенных КЭ ограничивает трансплантация (трансфузия) ГПЧ, восстанавливая состояние толерантности у большинства беременных мышей.

mice. The HPH was injected intravenously at a dose of 0.5 ml in 3 days prior to administration of the EC. The expediency of injecting the HPH at this very moment was substantiated earlier [5]. All the detail of the methodical approaches, applied in these experiments, were described elsewhere [5, 6].

It follows from Fig. 1 that injection of the EC to the pregnant females was accompanied by termination of pregnancy in most of them during the period of 9–11th days. No more than 20% of the mice maintained their pregnancy, which ended in normal birth delivery. Injection of the HPH increased the number of mice (up to 88%), in which the pregnancy ended at normal terms with normal birth deliveries after injection of the EC, similarly to physiologically occurring pregnancy (POP). Cryopreserved homogenate turned out to be less effective in preventing the development of the immune conflict. Only in 67% of the mice of the given group the pregnancy ended in due time. Judging by the number of the mice, which gave birth to the progeny in due time, injection of both NHPH and CHPH does not alter the POP. Apparently, termination of pregnancy in the given model experiments is realized by the injected EC, which cancel the immunologic tolerance within a "mother–fetus" system. One of the mechanisms of realization of the tolerance cancellation may be a disturbance of the balanced content of the regulatory cells of the T-link of the immunity, reduction in the T-suppressors, and the accompanying rise in the activity of the maternal cells-effectors [32]. A similar pattern is observed after injection of the sensibilized exogenic EC of the maternal line, the activities of which are not capable of

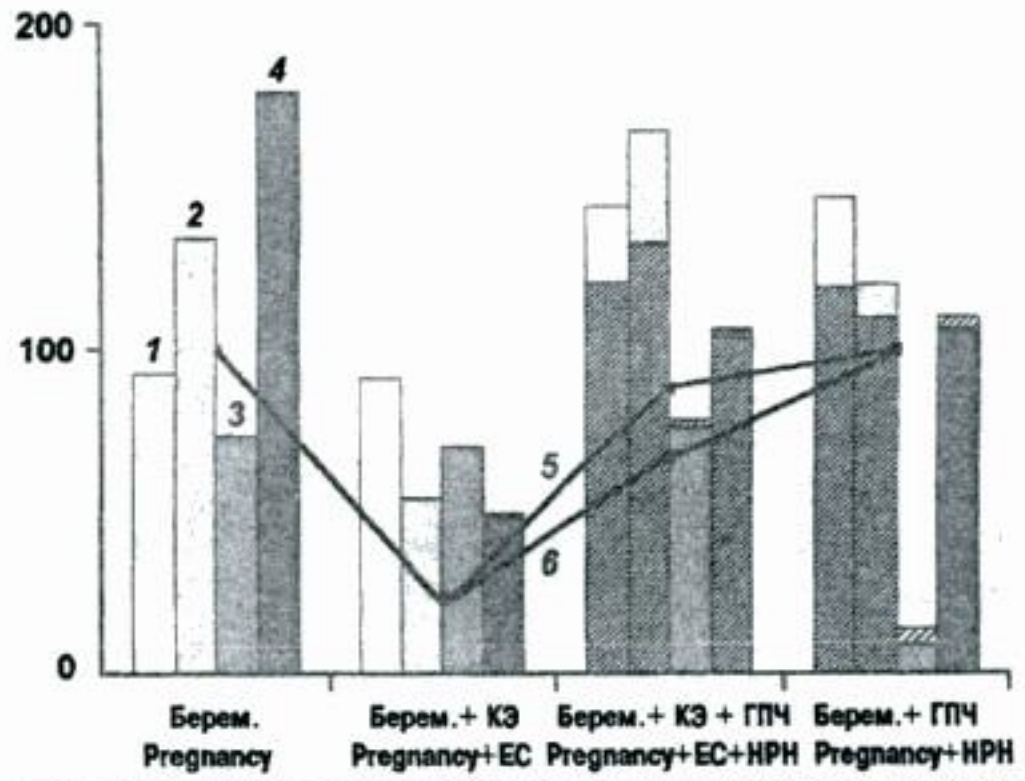


Рис. 1. Клеточность органов беременных мышей (12–13 сут) при развитии РТПХ в виде срыва беременности и после введения ГПЧ: *1* – КМ; *2* – селезенка; *3* – тимус; *4* – лимфоузлы; *5* – сохранение беременности после введения НГПЧ; *6* – сохранение беременности после введения КГПЧ; заштрихованная область – клеточность органов после введения КГПЧ.

Fig. 1. Cell composition of the organs of the pregnant mice (12–13 days) during development of the GVHR in the form of the pregnancy termination and after injection of the HPH: *1* – bone marrow; *2* – spleen; *3* – thymus; *4* – lymphatic nodes; *5* – saving the pregnancy after injection of the NHPH; *6* – saving the pregnancy after injection of the CHPH; shaded area – cell composition of the organs after injection of the CHPH.

Матеріал, захищений авторським правом

Видимо, механизм такого рода активности ГПЧ не замыкается только на изменении функционального статуса ИКК беременных самок. Действительно, введение ГПЧ "интактным" реципиентам, а также с некоторыми формами развившихся иммуноконфликтных ситуаций активирует Т-супрессорное звено иммунитета [5, 10]. Возникает вопрос, прослеживается ли такая же закономерность и при введении гомогената беременным мышам, иммунный статус которых уже имеет существенные отличия от интактных животных. Оценка фенотипических характеристик ИКК лимфоидных органов исследуемых групп животных показала (табл. 2, рис. 2), что концентрация и соотношение Т-клеток с маркерами CD4 (Т-хелперы) и CD8 (Т-супрессоры) контрольных мышей соответствовали данным [1]. В конце первого триместра ФПБ и еще в большей степени на протяжении второго триместра в селезенке, плацдарме формирования Т-супрессо-

inhibiting the T-suppressors, being available during that period of the POP. To a high extent the immune reactivity of the injected EC is limited by the transplantation (transfusion) of the HPH, thus restoring the state of tolerance in most pregnant mice. Apparently, the mechanism of such an activity of the HPH does not involve only changes in the functional states of the ICC of the pregnant females. Indeed, injection of the HPH tointact recipients, and together with some forms of the developed immune-conflict situations, activates the T-suppressive link of the immunity [5, 10]. The question is due whether this rule is observed during injection of the homogenate to the pregnant mice, the immune statuses of which already differ from those in intact animals. The evaluation of the phenotypical properties of the ICC of the lymphoid organs of the studied groups of animals showed (Table 2, Fig. 2) that the concentration and ratio of the T-cells with the markers CD4 (T-helpers) and

Таблица 2

Table 2

Изменение фенотипических характеристик иммунокомпетентных клеток в центральных и периферических лимфоидных органах у мышей при ФПБ, РТПХ в виде срыва беременности и после введения ГПЧ

Changes in phenotypical characteristics of immune-competent cells in central and peripheral lymphoid organs in mice during POP, GVHR in the form of pregnancy termination and after HPH injection

Группа животных Group of animals	Срок беременности, сут Pregnancy duration, days	Селезенка Spleen			Тимус Thymus			Лимфоузлы Lymphatic nodes		
		Количество клеток, % Number of cells, %		ИРИ IRI	Количество клеток, % Number of cells, %		ИРИ IRI	Количество клеток, % Number of cells, %		ИРИ IRI
		СД4 (Тх) CD4 (Th)	СД8 (Тс) CD8 (Ts)		СД4 (Тх) CD4 (Th)	СД8 (Тс) CD8 (Ts)		СД4 (Тх) CD4 (Th)	СД8 (Тс) CD8 (Ts)	
Интактный контроль (1-я группа) Intact control (group 1)	—	17,5	7,5	2,5	73,0	29,3	2,5	35,0	27,5	1,4
Беременные мыши (ФПБ) (2-я группа) Pregnant mice (POP) (group 2)	7*	15,0	9,4	1,6	65,0	58,5	1,1	44,0	11,0	4,0
	9	8,1	16,2	0,5	53,0	8,0	6,6	9,0	14,0	0,6
	11	8,3	13,8	0,6	71,0	22,3	3,2	9,9	9,0	1,1
	13	7,4	11,3	0,7	88,5	56,5	1,6	18,0	8,5	2,1
Беременные мыши + КЭ (3-я группа) Pregnant mice + EC (group 3)	7	15,0	9,4	1,6	65,0	58,5	1,1	44,0	11,0	4,0
	9**	13,0	7,0	1,9	72,0	20,0	3,6	38,0	8,0	4,8
	11	14,0	8,0	1,7	64,2	54,0	1,2	25,5	11,0	2,3
	13	4,5	1,6	2,8	86,5	59,5	1,5	20,0	13,0	1,6
Беременные мыши + КЭ + НГПЧ (4-я группа) Pregnant mice + EC + NHPH (group 4)	7	14,1	10,1	1,4	54,3	45,3	1,2	51,3	16,0	3,2
	9	9,3	11,6	0,8	68,4	34,4	2,8	47,6	15,4	3,1
	11	10,4	11,6	0,9	60,3	27,4	2,2	41,6	20,8	2,0
	13***	13,2	12,0	1,1	69,8	20,8	2,4	41,3	20,7	2,0
Беременные мыши + КЭ + КГПЧ (5-я группа) Pregnant mice + EC + CHPH (group 5)	7	13,6	8,0	1,7	50,9	42,4	1,2	49,7	16,6	3,0
	9	18,8	9,9	1,9	68,1	22,8	3,0	47,0	16,8	2,8
	11	14,2	8,9	1,6	67,0	33,5	2,0	47,1	16,8	2,8
	13	12,5	9,6	1,3	63,1	28,7	2,2	40,8	17,0	2,4

Примечания: *в этот срок животным вводили сенсибилизированные КЭ, индуцирующие срыв беременности; **срыв беременности на 9–11-е сутки; ***показатели у беременных животных; доверительный интервал в группах не превышал 2,5–3%.

Notes: *at that time the animals were injected with sensibilized EC, which induced termination of pregnancy; **termination of pregnancy at the 9–11th day; ***the features in pregnant animals; confidence interval in the groups did not exceed 2.5–3%.

Матеріал, захищений авторським правом

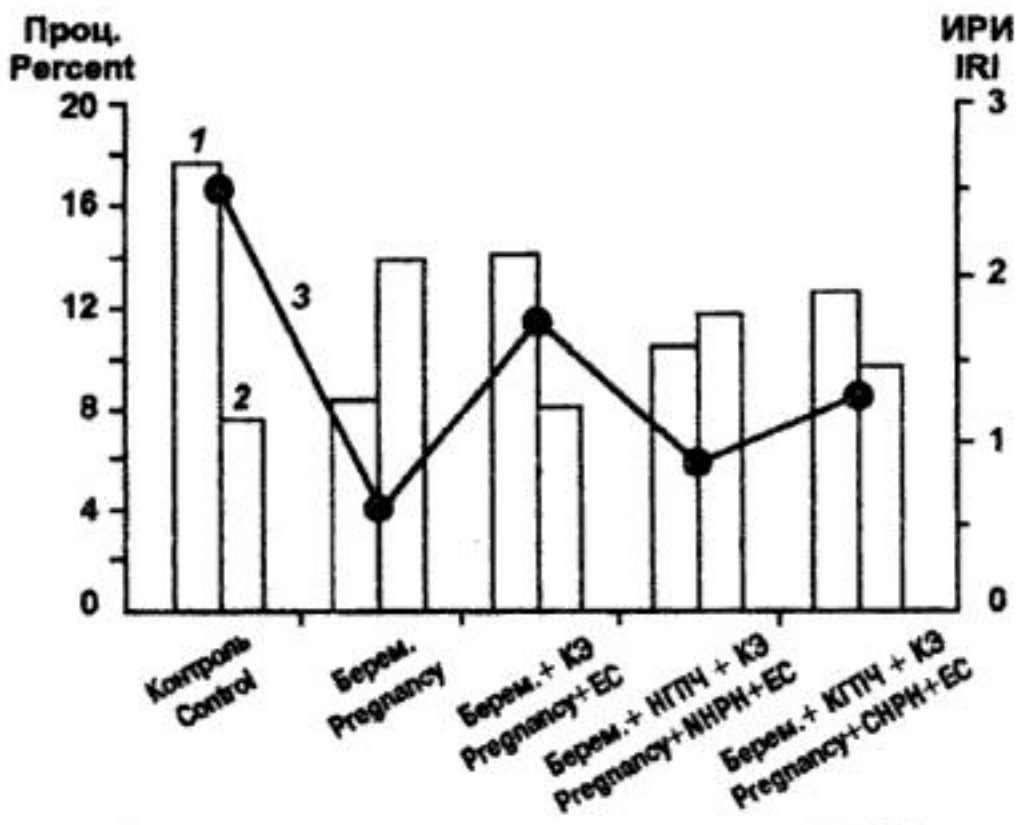


Рис. 2. Фенотипия клеток селезенки при развитии РТПХ в виде срыва беременности и после введения ГПЧ на 11-е сутки гестации: *1* – Т-хелперы; *2* – Т-супрессоры; *3* – ИРИ.

Fig. 2. Phenotypic characteristics of the spleen cells during development of the GVHR in the form of pregnancy termination and after injection of the HPH by the 11th day of gestation: *1* – T-helpers; *2* – T-suppressors; *3* – IRI.

ров, прослеживались перераспределение субпопуляций в сторону повышения концентрации CD8-клеток и значительное снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ). В регионарных лимфоузлах и тимусе в некоторые сроки ИРИ был таким же, как и в селезенке. Введенные на 7-е сутки КЭ в значительной степени изменяли эти показатели. В селезенке в период срыва беременности с 9-х по 11-е сутки концентрация CD8 лимфоцитов резко снижалась, но увеличивалось в сравнении с ФПБ содержание клеток с маркерами Т-хелперов, что сопровождалось существенным повышением ИРИ, характеризующим развитие иммуноконфликтной ситуации [14]. В этот же период значительно возрастал процент CD4-клеток в регионарных лимфоузлах, в которых при ФПБ соотношение регуляторных Т-клеток должно поддерживаться на определенном уровне [24]. Такого рода изменения являются закономерным следствием проявления активности вводимых КЭ, основным объектом иммунной агрессии для которых служат антигенные структуры отцовской линии, экспрессируемые на плаценте. Развитие классической иммуновоспалительной реакции в плаценте и дисфункционального ее состояния может быть предпосылкой ингибиции синтеза Т-супрессор-активирующих медиаторов, обусловливая снижение концентрации Т-супрессоров (CD8). Интригующими являются характеристики времени начала изменения концентрации регуляторных Т-лимфоцитов, а следовательно, и проявления активности КЭ в отношении цитокин-продуцирующей функции плаценты. Ранее мы показали [5, 6], что пик накопления Т-супрессоров ($CD8^+$-клеток) в селезенке "интактного" реципиента отмечается на 5–8-е сутки после введения ГПЧ. Если при введении КЭ снижение концентрации CD8-клеток действительно реализуется через ме-

CD8 (T-suppressors) of the control mice corresponded with the data reported by other authors [1]. At the end of the first trimester of the POP and even more so during the second trimester in the spleen, which is the base for the formation of the T-suppressors, there occurred re-distribution of the subpopulations towards increasing the concentrations of the CD8-cells and a considerable reduction in the immune-regulatory index (IRI), which at certain periods of time was similar to that in the regional lymphatic nodes and thymus. The EC, injected at the 7th day, greatly altered these features. In the spleen during the period of the pregnancy termination from the 9th till the 11th days the concentration of the CD8-lymphocytes was sharply reduced, though the content of the cells with the T-helper markers increased as compared with the POP, which was accompanied by a considerable rise in the IRI, characterizing the development of the immune-conflict situation [14]. At that period the portion of the CD4-cells was considerably increased in the regional lymphatic nodes, in which during the POP the ratio between the regulatory T-cells should be maintained at a certain level [24]. These changes are the normal consequence of the manifestation of the activity by the injected EC, the basic object for immune aggression of which are the antigen structures of the paternal line, expressed on the placenta. The development of a classic immune-inflammatory response in the placenta and its dysfunctional state, apparently, may be a pre-requisite of the inhibition of synthesis of the T-suppressor-activating mediators, thus providing for a reduction in the concentration of the T-suppressor s (CD8). The intriguing are the characteristics of the period of the start of changes in the concentration of the regulatory T-lymphocytes and, consequently, manifestation of the EC activity towards the cytokine-producing function of the placenta. Earlier the authors demonstrated [5, 6] that the peak of accumulation of the T-suppressors ($CD8^+$-cells) in the spleen of theintact recipient is reported at the 5–8th day after injection of the HPH. If a decrease in the concentration of the CD8-cells during administration of the EC is indeed realized via the mechanism of inhibition of the production of the T-suppressor-activating factors by the placenta, then it remains unclear why the concentration of the T-suppressors was sharply reduced already in two days after the injection of the EC. It cannot be excluded that during pregnancy the placental activators of the T-suppressive link realize their potential much faster as compared with the intact organism. Hence, a decrease in their production during the immune conflict will be accompanied by a faster reduction in the level of the content of the CD8-cells. Besides, it might be supposed that a rapid reduction in the content of the CD8-cells is due to a stress-induced situation of the EC injection. However, the fact that such a phenomenology was not observed under similar conditions but with an additional injection of the HPH, is

Матеріал, захищений авторським правом

ханизм ингибиции продукции плацентой Т-супрессор-активирующих факторов, то не ясно, почему концентрация Т-супрессоров резко снизилась уже через два дня после введения КЭ. Не исключено, что при беременности плацентарные активаторы Т-супрессорного звена реализуют свой потенциал значительно быстрее, чем в интактном организме. Следовательно, снижение их продукции при иммунном конфликте будет сопровождаться более быстрым падением уровня содержания CD8-клеток. Кроме того, можно было бы предположить, что быстрое падение содержания CD8-клеток обусловлено стрессиндуцированной ситуацией введения КЭ. Однако тот факт, что такая феноменология не наблюдалась в аналогичных условиях, но при дополнительном введении ГПЧ говорит о более вероятной ингибиции под действием КЭ иммунотропных плацентарных цитокинов. Действительно, после введения беременным мышам ГПЧ отмечалась как бы "репарация" такого рода функции их собственной плаценты. В селезенке ГПЧ, введенный за три дня до инициации срыва беременности, уже к 7-м суткам начинал создавать "плацдарм устойчивости" к действию КЭ. Так, увеличивалось содержание CD4- и CD8-клеток, однако динамика роста последних была выражена в значительно большей степени (табл. 2, рис. 2), т.е. подтверждается наше предположение о более быстрой активации Т-супрессоров под действием ГПЧ в организме беременных мышей (за три дня) в сравнении с "интактными". В результате уже к 13-м суткам ИРИ у мышей данной группы хотя и не достигал уровня ФПБ, но был значительно ниже, чем при срыве беременности (1,1 и 2,8 соответственно). Очевидно, в условиях конкурентного взаимодействия введенных КЭ и активируемого ГПЧ Т-супрессорного звена преобладающей является активность гомогената. Хотя, судя по показателям содержания CD4- и CD8-клеток, а также ИРИ, в период с 9-х по 13-е сутки иммуноконфликтная ситуация и на фоне введения ГПЧ полностью не устраняется (табл. 2). Обращает внимание факт, что КГПЧ обладал меньшим Т-супрессор-активирующим потенциалом в сравнении с НГПЧ.

Оценивая фенотипию клеток лимфатических узлов, трудно прийти к какому-то однозначному выводу о роли клеток этих органов на каждом этапе каскадно развивающихся событий при беременности. Известно, что беременность существенно изменяет структурно-функциональные показатели клеток регионарных к матке лимфоузлов [24, 27]. О высокой "заинтересованности" паховых лимфатических узлов в обеспечении физиологического течения беременности свидетельствуют и полученные нами результаты выраженного изменения клеточности органов на протяжении всего срока наблюдения (рис. 3). Наряду с этим меняется и содержание в них Т-хелперов и Т-супрессоров. Однако эти изменения носили выраженный динами-

indicative of a more probable EC-induced inhibition of the immunotropic placental cytokines. Indeed, injection of the HPH to the pregnant mice resulted in a what seemed likereparation of such a function of their own placenta. In the spleen the HPH, injected in 3 days prior to initiation of the termination of pregnancy, already by the 7th day started to create the "base of resistance" to the action of the EC. For example, the content of the CD4- and CD8-cells increased, however, the growth dynamics of the latter was manifested much stronger (Table 2, Fig. 2). That is the authors' assumption on the faster activation of the T-suppressors under the action of the HPH in the organisms of pregnant mice (for 3 days) as compared with "intact" animals was supported. Due to this already by the 13th day the IRI in the mice of the given group though did not achieve the level of the POP, but was considerably lower as compared with the termination of pregnancy (1.1 and 2.8, respectively). Apparently, that during a competitive interaction of the injected EC and HPH-activated T-suppressive link the activity of the homogenates is predominant. Though, as judged by the indices of the content of the CD4- and CD8-cells, as well as by the IRI, the immune-conflict situation is not eliminated even after injection of the HPH within the period of 9–11 days (Table 2). It should be mentioned that the CHPH possessed a lower T-suppressor-activating potential as compared with the native ones.

While evaluating phenotypic characteristics of the cells of the lymphatic nodes, it is difficult to draw unequivocal conclusion on the role of these cells at every stage of the cascade-like developing events during pregnancy. The pregnancy is known to significantly alter the structure-functional features of the cells of the regional nodes in the uterus [24, 27]. The authors received the data on the manifested changes of the cell compositions of the organs throughout a whole period of observation (Fig. 3), which indicate a high "interest" of the inguinal lymphatic nodes in providing for a physiological occurrence of pregnancy. Simultaneously the content of T-helpers (Th) and T-suppressors (Ts) changes in them. However, these changes were of a manifested dynamic nature with a high amplitude of scattering of indices (Table 2). It seems surprising, but by the 7th day the IRI during the POP was by nearly 3-fold higher as compared with the intact control. From the 9th till the 11th day due to a rapid reduction in the content of T-helpers this feature became significantly lower as compared with control but it again increased by the 13th day. During not a single period of observation the concentrations of T-suppressors did not even approach the control values and were by 2–3-folds lower. The termination of pregnancy was characterized not by a reduction in the concentration of the CD8-cells, but by an increase in the CD4-cells. It cannot be excluded that in the lymphatic nodes during development of the immune conflict the cells of the MPC increase production of the IL-1,

Матеріал, захищений авторським правом

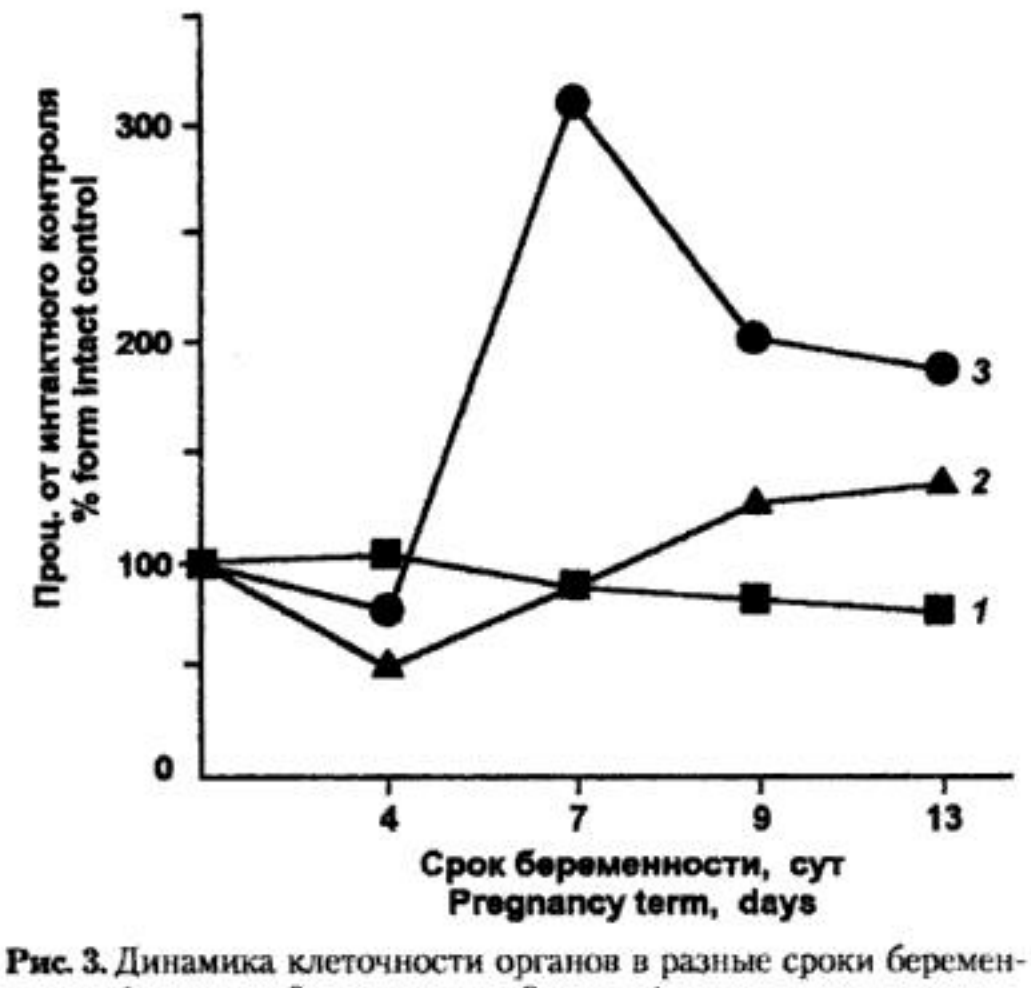


Рис. 3. Динамика клеточности органов в разные сроки беременности: *1* – тимус; *2* – селезенка; *3* – лимфоузлы.

Fig. 3. Dynamics of the cell composition of the organs at different terms of pregnancy: *1* – thymus; *2* – spleen; *3* – lymphatic nodes.

ческий характер с высокой амплитудой разброса показателей (табл. 2). Удивительно, но на 7-е сутки ИРИ при ФПБ был почти в три раза выше, чем в интактном контроле. С 9-х по 11-е сутки за счет резкого снижения содержания Т-хелперов этот показатель становился достоверно ниже контроля, но уже к 13-м суткам снова повышался. Ни в один из исследуемых сроков концентрация Т-супрессоров даже не приближалась к контролю и была в 2–3 раза ниже его. При срыве беременности наиболее характерным было не снижение концентрации CD8-клеток, а значительное повышение CD4-клеток. Не исключено, что в лимфоузлах в условиях развития иммунного конфликта клетки МФС повышают продукцию ИЛ-1, активируя Т-хелперы, и, как следствие, функцию собственных КЭ, реализующих общую с экзогенными КЭ функцию отторжения плода.

На примере лимфоузлов прослеживается универсализм иммунотропной активности ГПЧ. Как и в селезенке, препарат стимулировал экспансию и CD4-, и CD8-клеток. Однако коэффициент стимуляции каждой субпопуляции в сравнении с их содержанием при срыве беременности составлял в среднем соответственно 1,4 и 1,7. Преобладающей активности ГПЧ в отношении клеток супрессорного звена не отмечено в тимусе. Тем не менее способность плацентарных медиаторов модулировать степень экспрессии фенотипических маркеров на тимоцитах очевидна. В условиях инициации иммунного конфликта в тимусе накапливаются клетки с двойными фенотипическими маркерами, тогда как после введения ГПЧ суммарная величина CD4- и CD8-клеток не превышала 100%. Следовательно, продуцируемые плацентой цитокины все же способны конкурировать с собственными гормонами тимуса в регуляции структурно-функционального состояния тимоцитов. Указывалось на возможную

thus activating T-helpers and, consequently, function of their own EC, realizing a function of the fetus rejection, which is common for the exogenic EC also.

The lymphatic nodes illustrate the universal nature of the immunotropic activity of the HPH. Alike in the spleen, the preparation stimulated expansion of both CD4- and CD8-cells. However, the factor of stimulation of every subpopulation, as compared with their content during the termination of pregnancy, averaged to 1.4 and 1.7, respectively. There was no predominant activity of the HPH towards the cells of the suppressor links. Nevertheless, the ability of the placental mediators to modulate the extent of expression of the phenotypic markers on the thymocytes is evident. During initiation of the immune conflict the thymus accumulates the cells with dual phenotypic markers, while after injection of the HPH a summary value of the CD4- and CD8-cells did not exceed 100%. Hence, the placenta-produced cytokines are still capable to compete with the own hormones of the thymus in the regulation of the structure-functional state of the thymocytes. The authors speculated on the possible interregulation of the hormones of the thymus (thymopoietine, thymopentine) and adrenocorticotropic hormone [21, 22]. Hence, the chorionic adrenocorticotropic hormone, which is available in the HPH, may be directly or indirectly involved into the process of alteration of the phenotypic characteristics of the thymocytes. In other words, the immunotropic activity of the HPH cytokines during the threat of the pregnancy termination covers both peripheral and central organs of the immunity, bringing them closer to the state of the POP.

The data in Fig. 1 testify to the fact that the HPH modulating activity is not limited solely by the action on the immunocompetent sphere. Judging by the cell composition of the studied organs (at the above period), the pregnancy did not significantly change the medullary hemopoiesis, but activated it in the spleen. The extent of the myelocaryocyte proliferation was the same during the termination of pregnancy, while its manifested inhibition was reported in the spleen ($166.4 \cdot 10^6$ and $54.8 \cdot 10^6$ nucleated cells, respectively). A reduction in the amount of cells in the spleen cannot be accounted for by their stress-induced death, otherwise such a development of events would have been reported in the thymus, which responded to such situations in the strongest way [3]. Hence, termination of pregnancy during development of the immune-conflict situation, beside reducing production of the immunotropic (e.g. T-suppressor-activating) mediators, also results in the decrease in production of the hemopoietic stimulators by the placenta.

The authors believe that a manifested activation of hemopoiesis at the said terms of the POP in the spleen precisely and its inhibition during the immune conflict are the result of the peculiar features of the interaction of the placental cytokines with the hemopoietic structures, formed in the embryogenesis. At every stage of

Матеріал, захищений авторським правом

взаиморегуляцию гормонов тимуса (тимопоэтина, тимопентина) и адренокортикотропного гормона [21, 22]. Следовательно, хорионический адренокортикотропный гормон, присутствующий в ГПЧ, может прямо или опосредованно участвовать в процессе изменения фенотипических характеристик тимоцитов. Другими словами, иммунотропная активность цитокинов ГПЧ распространяется в условиях развития угрозы прерывания беременности как на периферические, так и центральные органы иммунитета, приближая их к состоянию ФПБ.

Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что модулирующая активность ГПЧ не ограничивается только влиянием на иммунокомпетентную сферу. Судя по клеточности исследованных в указанные сроки органов, беременность существенно не изменяла медуллярное кроветворение, но активизировала его в селезенке. Степень пролиферации миелокариоцитов была такой же и при срыве беременности, тогда как в селезенке отмечалась выраженная ее ингибиция ($166{,}4 \cdot 10^6$ и $54{,}8 \cdot 10^6$ ядерных клеток соответственно). Уменьшение количества клеток в селезенке нельзя объяснить стресс-индуцированной их гибелью, иначе подобное развитие событий было бы отмечено в тимусе, наиболее остро отвечающем на такие ситуации [35]. Следовательно, при срыве беременности на фоне развития иммуноконфликтной ситуации, помимо снижения продукции иммунотропных (Т-супрессор-активирующих, например) медиаторов, снижается и выработка плацентой стимуляторов гемопоэза.

Мы считаем, что выраженная активация кроветворения в указанные сроки ФПБ именно в селезенке и его ингибиция при иммунном конфликте являются результатом особенностей взаимодействия плацентарных цитокинов с формируемыми в эмбриогенезе гемопоэтическими структурами. На каждом этапе развития плацента вырабатывает стимуляторы гемопоэза для тех кроветворных плацдармов, которые формируются или уже сформированы в эмбриоплодных структурах к этому времени. Как видно из рис. 4, селезенка 12–13-суточных сроков гестации является таким плацдармом. Проявляя стимулирующее спленотропное действие в отношении эмбриональных тканей, плацентарные гемопоэтины могут аналогичным образом оказывать влияние и на соответствующие органы организма беременной. К концу беременности спектр гематотропных плацентарных цитокинов расширяется и они способны стимулировать кроветворение не только в селезенке, но и КМ плода. О такого рода способности свидетельствуют и приведенные результаты применения ГПЧ терминальных сроков беременности совместно с КМ. Действительно, ГПЧ стимулировал процесс клеточной пролиферации как в селезенке, так и КМ (см. табл. 1). Выраженная дуалистическая способность ГПЧ стимулировать гемопоэз в обоих органах про-

development the placenta produces the stimulators of hemopoiesis for those hemopoietic bases, which are being formed or have already been formed in the embryo-fetal structures by that time. It follows from the data in Fig. 4 that the spleen, aged 12–13 days of gestation, is such a base. While manifesting a stimulating splenotropic action on the embryonic tissues, the placental hemopoietins may similarly affect the corresponding organs of the pregnant organism. By the end of the pregnancy the spectrum of the hematotropic placental cytokines is expanded, and they are capable of stimulating hemopoiesis not only in the spleen, but also in the fetal BM. Such an ability is supported by the above results of applying the HPH of the terminal periods of pregnancy in combination with the BM. Indeed, the HPH stimulated the process of cell proliferation both in the spleen and in the BM (see Table 1). A manifested dual ability of the HPH to stimulate hemopoiesis in both organs is demonstrated during development of the immune conflict, termination of pregnancy, in particular.

By the 12–13th day after injection of the EC the largest reduction in the cell composition was reported in the spleen and lymphatic nodes. In the group of the pregnant mice, which were pre-injected with the HPH, the cell composition of the spleen increased by more than 3-fold, of the BM — by 1.6-fold, of the lymphatic nodes — by 2-fold. Taking into account the phenotypic characteristics of the ICC in the lym-

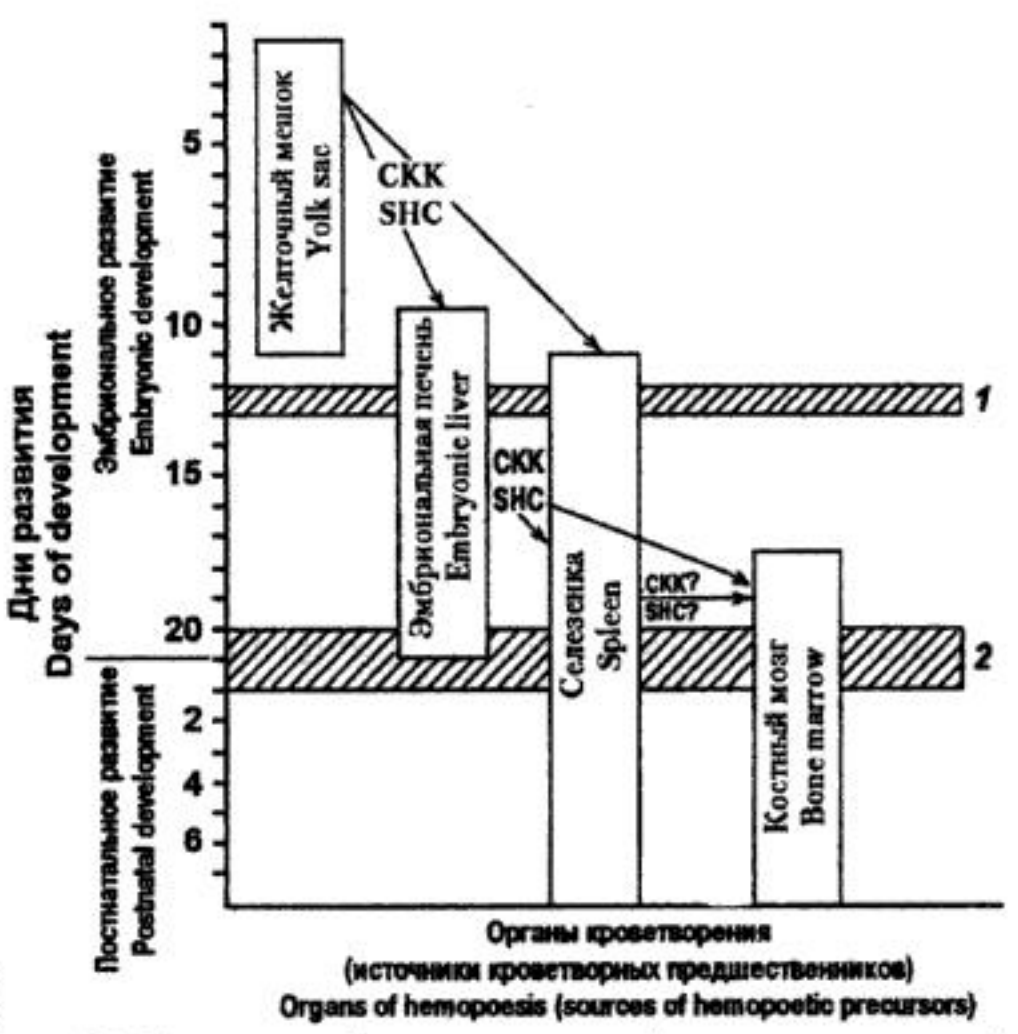


Рис. 4. Эмбриональный и постнатальный гемопоэз у мышей (цит. по [3], дополнено и обработано авторами): *1* — зона возможного влияния плацентарных гемопоэтинов данных сроков гестации на кроветворение в соответствующем органе; *2* — зона возможного влияния гемопоэтинов плаценты терминальных сроков гестации на кроветворение в соответствующем органе.

Fig. 4. Embryonic and postnatal hemopoiesis in mice: *1* — zone of possible action of the placental hemopoietins of the given terms of gestation on the hemopoiesis in the corresponding organs; *2* — zone of possible action of the placental hemopoietins of the terminal periods of gestation on the hemopoiesis in the corresponding organ.

Матеріал, захищений авторським правом

является и при развитии иммунного конфликта, в частности, при срыве беременности.

На 12–13-е сутки после введения КЭ наибольшее снижение клеточности отмечено в селезенке и лимфоузлах. В группе беременных мышей, которым предварительно вводили ГПЧ, клеточность селезенки увеличивалась в сравнении с предыдущей группой более чем в 3 раза, КМ в 1,6 раза, клеточность лимфоузлов в 2 раза. Учитывая фенотипические характеристики ИКК в лимфомиелоидных органах, становится ясно, что у мышей данной группы наряду со стимуляцией гемопоэза в селезенке увеличивается количественное содержание Т-супрессоров и, видимо, их функционального статуса, что подтверждается повышением процента сохранения беременности. Несколько иной лимфогематомодулирующий эффект оказывал ГПЧ на фоне ФПБ. Введение гомогената мышам с ФПБ также сопровождалось выраженными изменениями клеточности органов ЛГПК. Сохранялся эффект стимуляции медуллярного кроветворения (в 1,6 раза в сравнении с ФПБ), однако отмечалась некоторая ингибиция процесса пролиферации в селезенке. Одновременно наблюдалось существенное снижение в сравнении с ФПБ клеточности тимуса и лимфатических узлов, т.е. очевидно, что отклонение от "физиологического" уровня плацентарных цитокинов при ФПБ после введения экзогенного ГПЧ вызывает разнонаправленные изменения состояния ЛГПК беременных мышей, а именно стимуляцию гемопоэза в КМ и снижение клеточности лимфоидных органов. Данный факт свидетельствует о том, что помимо изменения спектра регуляторных плацентарных цитокинов в разные сроки беременности существует и дозозависимая регуляция ими состояния ЛГПК беременных мышей. Вместе с тем надо отметить, что и в этом случае гемо- и иммунотропный эффект КГПЧ, как и при применении в модели с пересадкой сингенного КМ, а также при предупреждении срыва беременности, был менее выраженным в сравнении с НГПЧ. Следовательно, подтверждается высказанное нами предположение о том, что, применяя ГПЧ, мы вводим в организм реципиента не только имеющиеся в нем в данный момент наработанные медиаторы, но и клетки, продуцирующие их после трансфузии [11]. Вполне вероятно, что в процессе криоконсервирования часть клеток с такого рода активностью погибает (снижает функциональный потенциал), что и обусловливает снижение лимфогематотропной активности КГПЧ в целом.

Таким образом, обобщая результаты наших предыдущих и выполненных в данной работе исследований по оценке влияния ПФПК на состояние ЛГПК реципиентов с различным исходным статусом, можно сделать следующие выводы:

1. Плацента помимо иммунотропных продуцирует гематотропные цитокины. Спектр плацентарных гемопоэтинов не ограничивается только идентифи-

phomyeloid organs, it becomes clear that in the mice of the given group together with the stimulation of hemopoiesis the quantitative content of the T-suppressors and, probably, their functional status, increase in the spleen, which is supported by a rise in the portion of the saved pregnancies. The HPH exercised a somewhat different lymphohematomodulating effect during the POP. Injection of the homogenate to the POP mice was also accompanied by the manifested changes in the cell compositions of the LHPC organs. The effect of stimulation of the medullary hemopoiesis was maintained (by 1.6-fold as compared with the POP), though a slight inhibition of the process of proliferation in the spleen was reported. Simultaneously there was observed a significant reduction in the cell compositions of the thymus and lymphatic nodes as compared with the POP, i.e. apparently, the deviation of the level of the placental cytokines from thephysiological level during the POP after injection of the exogenous HPH results in the antidromous changes in the state of the LHPC of the pregnant mice, namely: stimulation of hemopoiesis in the BM and reduction in the cell composition of the lymphoid organs. This fact indicates that beside the changes in the spectrum of the regulatory placental cytokines at different periods of pregnancy, they exercise a dose-dependent regulation of the LHPC state of the pregnant mice. It should be noted that in this case the hemo- and immunotropic effects of the CHPH, similarly to its application in the model with the transplantation of the syngenic BM, as well as during prevention of the termination of pregnancy, were less pronounced as compared with the native BM. Hence, the earlier assumption is supported that application of the HPH involves injection into the recipient organism of not only the currently available mediators, but also of the cells, which produce them after transfusion [11]. It seems likely that in the process of cryopreservation a part of cells with the activities of the type die (reducing the functional potential), thus providing for a reduction in the lymphohematotropic activity of the HPH as a whole.

Thus, summarizing the results of the authors' earlier and currently described experiments on the evaluation of the action of the PFPC on the state of the LHPC of the recipients with different statuses, one may conclude on the following.

1. The placenta, beside immunotropic hormones, also produces the hematotropic ones. The spectrum of the placental hemopoietins is not limited by the earlier identified stimulators of the committed progenitors (CFU-GM). The availability of the regulators of the functional status of the poorly differentiated hemopoietic progenitors (CFUc-8 and CFUc-12) in the HPH was verified.

2. The evaluation of the nature and extent of the HPH action on the hemopoiesis in the spleen and BM demonstrates that with the prolongation of the terms of pregnancy the placenta expands the spectrum of the

Матеріал, захищений авторським правом

цированными ранее стимуляторами коммитированных предшественников (КОЕ-ГМ). Доказано наличие в ГПЧ регуляторов функционального статуса малодифференцированных кроветворных предшественников (КОЕс-8 и КОЕс-12).

2. Оценка степени и характера влияния ГПЧ на кроветворение в селезенке и КМ показывает, что по мере пролонгации сроков беременности плацента расширяет спектр продуцируемых гемопоэтинов, запрос на которые определяется необходимостью регуляции вновь формируемых в эмбриогенезе гемопоэтических плацдармов.

3. Различная гемопоэзмодулирующая активность КЭП и ГПЧ в отношении селезеночного и медуллярного кроветворения может свидетельствовать о разном "наборе" (концентрации) в этих ПФПК цитокинов с такого рода активностью.

4. В модели развития АИЗ в виде РТПХ продемонстрирована способность ГПЧ реализовать одновременно гемопоэз- и иммуномодулирующую активность, проявляющуюся в восстановлении иммунологической толерантности после ее срыва и нормализации состояния гемопоэтического плацдарма.

5. Во всех выбранных модельных системах показано, что иммуно- и гематомодулирующая активность КГПЧ несколько ниже, чем НГПЧ. Такого рода особенности могут быть следствием изменения количественных (гибель) и качественных (снижение функциональной активности) параметров введенных цитокин-продуцирующих клеток плаценты после криоконсервирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Брондз Б. Д.* Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании.– М.: Наука, 1987.– 471 с.
2. *Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П.* Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства.– Киев.: Наук. думка, 1998.– 317 с.
3. *Галактионов В. Г.* Графические модели в иммунологии.– М.: Медицина, 1986.– 232 с.
4. *Гистология* / Под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева.– М.: Медицина, 1998.– 947 с.
5. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 4.– С. 3–16.
6. *Гольцев А. Н., Грищенко О. В., Кушниренко Н. Н., Опанасенко Е. В.* Патофизиологические основы изменения иммунореактивности организма после введения продуктов фетоплацентарного комплекса // Вестн. проблем биол. и мед.– 1997.– № 10.– С. 95–106.
7. *Гольцев А. Н.,Луценко Е. Д.* Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 1.– С. 3–13.
8. *Гольцев А. Н., Луценко Е. Д., Останкова Л. В. и др.* Возможности криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 2.– С. 3–10.
9. *Гольцев А. Н., Луценко Е. Д., Дубрава Т. Г. и др.* Экспериментальное обоснование возможности применения продуктов фетоплацентарного комплекса (ПФПК) для лечения аутоиммунных заболеваний // Імунологія та алергологія.– 1999.– № 3.– С. 47.
10. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности миелотрансплантата. II. Возможность сотрансплантации клеток эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 10–22.
11. *Гольцев А. Н.* Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти.– 2000.– № 1.– С. 22–37.

produced hemopoietins, the request for which is determined by the necessity to regulate the hemopoietic bases, newly formed in the embryogenesis.

3. Different hemopoiesis-modulating activities of the CEL and HPH towards the spleen and medullary hemopoiesis may indicate different "composition" (concentration) of the cytokines with such activities in the PFPC.

4. The model of the development of the AID in the form of the GVHR supports the ability of the HPH to simultaneously realize hemopoiesis and immune-modulating activity, which is manifested in the recovery of the immunologic tolerance following its disruption and normalization of the state of the hemopoietic base.

5. All the selected model systems demonstrate that immune- and hematomodulating activities of the CHPH are slightly lower as compared with those of the NHPH. These peculiarities may be a consequence of the quantitative (death) and qualitative (reduction in the functional activity) parameters of the injected placental cytokine-producing cells after cryopreservation.

REFERENCES

1. *Brondz B. D.* T-lymphocytes and their receptors in the immunological recognition.– M.: Nauka publ., 1987.– 471 p.
2. *Voznanov A. F., Butenko A. K., Zak K. P.* Cytokines. Biological and antitumor properties.– Kiev: Nauk. dumka publ., 1998.– 317 p.
3. *Galaktionov V. G.* Graphic models in immunology.– M.: Meditsina publ., 1986.– 232 p.
4. *Histology* / Ed by E. G. Ulumbekov and Yu. A. Chelysheva.– M.: Meditsina publ., 1998.– 947 p.
5. *Goltsev A. N., Dubrava T. G., Lutsenko E. D. et al.* A search for alternative to cryopreservation ways of modifying the immune reactivity of the allomyelograft // Probl. kriobiol.– 1996.– № 4.– P. 3–16.
6. *Goltsev A. N., Grischenko O. V., Kushnirenko N. N., Opanasenko E. V.* Pathophysiological bases of the changes in the immune reactivity of the organism following injection of the products of the fetoplacental complex // Vestn. problem biol. i med.– 1997.– № 10.– P. 95–106.
7. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D.* Cryopreservation as a possible method of evaluating the role of the component composition of the myelograft in manifesting functional activities of the hemopoietic cells // Probl. kriobiol.– 1994.– № 1.– P. 3–13.
8. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D., Ostankova L. V. et al.* Capabilities of cryobiology in solving the problems of immune conflicts during grafting of the histoincompatible bone marrow // Probl. kriobiol.– 1996.– № 2.– P. 3–10.
9. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D., Dubrava T. G. et al.* Experimental substantiation of a possible application of the products of the fetoplacental complex for therapy of the autoimmune diseases // Immunol. ta allergol.– 1999.– № 3.– P. 47.
10. *Goltsev A. N., Dubrava T. G., Lutsenko E. D. et al.* A search for alternative to cryopreservation ways of modifying the immune reactivity of the myelograft. Part II. A possibility of co-transplantation of the embryonic liver cells // Probl. kriobiol.– 2000.– № 1.– P. 10–22.
11. *Goltsev A. N.* Possible reasons for development of the autoimmune pathology and search for methods of its therapy // Probl. med. nauki ta osvity.– 2000.– № 1.– P. 22–37.
12. *Grischenko V. I., Morozova T. F., Vorotilin O. M. et al.* A method for preparation and storage of the cryopreserved placental suspension for clinical application.– Method. recommend.– Kharkiv, 1997.– 14 p.
13. *Yeger I.* Clinical immunology and allergology.– M.: Meditsina publ., 1996.– Vol. 2.– P. 288–293.

Матеріал, захищений авторським правом

12. *Грищенко В. І., Морозова Т. Ф., Воротилін О. М. та ін.* Приготування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: Метод. рекомендації.– Харків, 1997.– 14 с.
13. *Йегер И.* Клиническая иммунология и аллергология.– М.: Медицина, 1996.– Т. 2.– С. 288–293.
14. *Кушниренко Н. М.* Застосування тканинної терапії у лікуванні імуноконфліктної вагітності: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харків, 1997.– 19 с.
15. *Морозова Р., Козулина Е., Николенко И. и др.* Плацента — источник биологически активных веществ // Укр. біохім. журн.– 1999.– 74, № 4.– С. 21–29.
16. *Натан Д. Г., Зифф К. А.* Регуляция кроветворения // Гематол. и трансфузиол.– 1994.– 39, № 2.– С. 3–10.
17. *Сухих Г. Т., Богданова И. М., Малайцев В. В., Фисенко А. П.* Иммунологические аспекты трансплантации фетальных тканей // БЭБиМ.– 1998.– 128.– С. 178–181.
18. *Чеботарев В. Ф.* Современные представления о механизмах аутоиммунного процесса. Аутоагрессия и проблема иммунореабилитации при эндокринной патологии // Імунологія та алергологія.– 1998.– № 1.– С. 59–63.
19. *Чертков И. Л., Гуревич О. А.* Стволовая клетка и ее микроокружение.– М.: Медицина, 1984.– 234 с.
20. *Шевелев А. С.* Реакция "трансплантат против хозяина" и трансплантационная болезнь.– М.: Медицина, 1976.– 237 с.
21. *Ширшев С. В., Кеворков Н. Н.* Репродуктивные гормоны белково-пептидной природы как регуляторы иммунных реакций // Успехи совр. биол.– 1991.– 111, № 5.– С. 683–697.
22. *Ширшев С. В.* Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биол.– 1993.– 113, № 4.– С. 230–246.
23. *Ширшев С. В.* Цитокины плаценты в регуляции иммуноэндокринных процессов при беременности // Успехи совр. биол.– 1994.– 114, № 2.– С. 223–239.
24. *Щебникова Н. Е., Федоров Г. Н., Гулянский Л. Н.* Особенности клеточного иммунитета у матерей и потомков при системной реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ), индуцированной во время беременности // Тез. докл. 4 Всесоюз. симпоз. "Иммунология репродукции".– Киев, 1990.– С. 229–230.
25. *Antin J. Y., Ferrara J. L. M.* Cytokyne desregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 2964–2968.
26. *Berfoncello I., Kriegler A., Bradlen T.* The effect of interleukin 6 on hemopoietik stem cell subsets resolved by rodamine-123 // Exp. Hematol.– 1990.– 18, № 6.– P. 550–552.
27. *Chaonat J., Menu E., Athanassakis I.* Maternal T-cells regulate placenta size and fetal survival // Regional Immunol.– 1988.– 1.– P. 143–148.
28. *Ferrara J., Deeg H.* Graft-versus-host disease // N. Engl. J. Med.– 1991.– 324, № 3.– P. 667–673.
29. *McNiece I., Temeles D., Fuller K.* Furter characterization of human high proliferative potential colony forming cells // Exp. Hematol.– 1990.– 18, № 6.– P. 552–561.
30. *Padovan E., Casorati G., Delabona P. et al.* Dual receptor T-cells // Ann. Acad. Sci.– 1999.– № 195.– P. 66–70.
31. *Palathumpat V.,Dejbakhson-Jones S., Holm B.* Studies of CD4- CD8-ab bone marrow T-cells with supressor activity // J. Immunol.– 1992.– № 2.– P. 373–381.
32. *Piccinni M., Romagnani S.* Regullation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines // Immunol. Res.– 1996.– 15.– P. 141–150.
33. *Samlowski W. E., Daynes R. A.* Bone marrow engraftment efficiency is enhanced by competitive inhibition of the hepatic asialoglycoprotein receptor // Proc. Nath. Acad. Sci. USA.– 1985.– 82, № 8.– P. 2508–2513.
34. *Schad V.* T cell Tolerance: Model for clinical application to allergy and autoimmunity // Chemical immunology.– 1994.– 59.– P. 193–205.
35. *Schmidt-Wolf Z., Dejbakhson-Jones S., Jinzton N. et al.* T-cell subsets and supressor cells in human bone marrow // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3242–3250.

Поступила 11.04.2000

14. *Kushnirenko A. M.* Application of the tissue therapy for treatment of the immune-conflict pregnancy.– Abstr. Thesis Cand. Med. Sci.– Kharkov, 1997.– 19 p.
15. *Morozova R., Kozulina E., Nikolenko I. I. et al.* The placenta is a source of biologically active substances // Ukr. biokhim. zhurn.– 1999.– 74, № 4.– P. 21–29.
16. *Natan D. G., Ziff K. A.* Regulation of hemopoiesis // Gematol. i transfuziol.– 1994.– 39, № 2.– P. 3–10.
17. *Sukhikh G. T., Bogdanova I. M., Malaytsev V. V., Fisenko A. P.* Immunological aspects of grafting of fetal tissues // BEBiM.– 1998.– 128.– P. 178–181.
18. *Chebotarev V. F.* Current knowledge on the mechanisms of the autoimmune process. Autoaggression and the problem of immune rehabilitation during endocrine pathology // Immunol. ta allergol.– 1998.– № 1.– P. 59–63.
19. *Chertkov I. L., Gurevich O. A.* Stem cell and its microenvironment.– M.: Meditsina publ., 1984.– 234 p.
20. *Shevelev A. S.* The reaction "graft versus host" and transplantation disease.– M.: Meditsina publ., 1976.– 237 p.
21. *Shirshev S. V., Kevorkov N. N.* Reproductive hormones of the protein-peptide nature as the regulators of the immune responses // Uspekhi sovr. biol.– 1991.– 111, № 5.– P. 683–397.
22. *Shirshev S. V.* Proteins of the fetoplacental complex in the regulation of the immune responses // Ibid.– 1993.– 113, № 4.– P. 230–246.
23. *Shirshev S. V.* Placental cytokines in the regulation of the immune-endocrine processes during pregnancy // Ibid.– 1994.– 114, № 2.– P. 223–239.
24. *Schebnikova N. E., Fedorov G. N., Gulyansky L. N.* Peculiarities of the cell immunity in mothers and progeny during systemic reaction "graft versus host" (GVHR), induced during pregnancy // Abstr. Repts. 4 All-Union Symp. "Immunology of Reproduction".– Kiev, 1990.– P. 229–230.
25. *Antin J. Y., Ferrara J. L. M.* Cytokyne desregulation and acute graft-versus-host disease // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 2964–2968.
26. *Berfoncello I., Kriegler A., Bradlen T.* The effect of interleukin 6 on hemopoietik stem cell subsets resolved by rodamine-123 // Exp. Hematol.– 1990.– 18, № 6.– P. 550–552.
27. *Chaonat J., Menu E., Athanassakis I.* Maternal T-cells regulate placenta size and fetal survival // Regional Immunol.– 1988.– 1.– P. 143–148.
28. *Ferrara J., Deeg H.* Graft-versus-host disease // N. Engl. J. Med.– 1991.– 324, № 3.– P. 667–673.
29. *McNiece I., Temeles D., Fuller K.* Furter characterization of human high proliferative potential colony forming cells // Exp. Hematol.– 1990.– 18, № 6.– P. 552–561.
30. *Padovan E., Casorati G., Delabona P. et al.* Dual receptor T-cells // Ann. Acad. Sci.– 1999.– № 195.– P. 66–70.
31. *Palathumpat V.,Dejbakhson-Jones S., Holm B.* Studies of CD4- CD8-ab bone marrow T-cells with supressor activity // J. Immunol.– 1992.– № 2.– P. 373–381.
32. *Piccinni M., Romagnani S.* Regullation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines // Immunol. Res.– 1996.– 15.– P. 141–150.
33. *Samlowski W. E., Daynes R. A.* Bone marrow engraftment efficiency is enhanced by competitive inhibition of the hepatic asialoglycoprotein receptor // Proc. Nath. Acad. Sci. USA.– 1985.– 82, № 8.– P. 2508–2513.
34. *Schad V.* T cell Tolerance: Model for clinical application to allergy and autoimmunity // Chemical immunology.– 1994.– 59.– P. 193–205.
35. *Schmidt-Wolf Z., Dejbakhson-Jones S., Jinzton N. et al.* T-cell subsets and supressor cells in human bone marrow // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3242–3250.

Accepted in 11.04.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 617.713: 615.361.014.41

UDC 617.713: 615.361.014.41

Динамика активности НАД·H^2 и НАДФ·H^2 диафораз 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 Activity of NAD·H^2 and NADP·H^2-diaphorases in Cells of Growing and Renewing Epithelium of Cornea During its Hypothermic Storage

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 проведено исследование изменения активности НАД·H^2 и НАДФ·H^2 диафораз в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в зависимости от сроков ее гипотермического хранения.

Методами кількісної гістохімії і кількісного фотометричного аналізу досліджено зміни активності НАД·H^2 і НАДФ·H^2 діафораз у клітинах зростаючого і поновлюючого епітелію рогівки в залежності від термінів її гістотермічного зберігання.

The methods of quantitative histochemistry and quantitative photometric analysis were used for studying the changes in the activities of NAD·H^2 and NADP·H^2-diaphorases in the cells of growing and renewing epithelium of the cornea depending on the duration of its hypothermic storage.

При исследовании влияния охлаждения на клетки, ассоциированные в составе ткани, следует учитывать филогенетические особенности сложившейся системы гистологических элементов, объединенных общей структурой, функцией и происхождением [2, 3]. В этой связи изучение поведения ферментов различного профиля действия может обеспечить получение максимальной информации о структурно-функциональных перестройках, вызванных действием экстремальных факторов [1].

НАД·H^2-дегидрогеназа (К.Ф.1.6.99.3) служит общим показателем активности энергообеспечения клетки и локализуется как внутри митохондрий, так и во внемитохондриальном пространстве.

НАДФ·H^2-дегидрогеназа (К.Ф.1.6.99.1) является комплексным показателем НАДФ-зависимой системы дегидрогеназ и отражает уровень обеспечения энергией процессов синтеза, которые в клетках ассоциированы с мембранами эндоплазматической сети и цитоплазматическим матриксом.

Настоящее сообщение является продолжением исследования, описанного в [4].

В начальный период хранения роговицы активность НАД·H^2 в клетках переднего эпителия несколько выше активности фермента в клетках заднего эпителия ($66{,}6 \pm 0{,}40$ и $63{,}5 \pm 0{,}57$). К 1-м суткам хранения наблюдается небольшое увеличе-

When studying the effect of cooling on the cells, associated within the tissue, attention should be paid to the phylogenetic peculiarities of the established system of histological elements, united by the common structure, function and origin [2, 3]. In this respect a study of the behavior of the enzymes of different profiles of action may provide maximum information on the structure-functional re-arrangements, caused by the influence of the extreme factors [1].

NAD·H^2-dehydrogenase (K.P.1.6.99.3) serves as a general index of the activity of the energy-supply of the cell, and it is localized both inside mitochondria and outside them.

NADP·H^2-dehydrogenase (K.P.1.6.99.1) is a complex feature of the NADP-dependent system of dehydrogenases and reflects the level of the energy support of the processes of synthesis, which are associated in the cells with the membranes of the endoplasmic network and cytoplasmic matrix.

The given report continues the research, the results of which were reported elsewhere [4].

At the original period of storage of the cornea the NAD·H^2-activity in the cells of the anterior epithelium is higher as compared with the activity of the enzyme in the cells of the posterior epithelium (66.6 ± 0.40 and 63.5 ± 0.57). By the 1st day of storage there was observed a slight rise in the activity of the enzyme (71.8 ± 0.43 and 70.2 ± 0.71), followed by a

Матеріал, захищений авторським правом

ние активности фермента (71,8 ± 0,43 и 70,2 ± 0,71), после чего происходит ее резкий спад до уровня ниже исходного (45,7 ± 0,35 и 50,6 ± 0,57). Начиная со 2-х суток хранения, активность фермента в клетках заднего эпителия превышает ее уровень в клетках переднего эпителия, далее происходит плавный спад во всех клетках, достигая к 8-м суткам соответственно величин 41,1 ± 0,34 и 42,7 ± 0,70 (табл. 1). Динамика активности НАД·H^2 отображена на рис. 1.

Таблица 1

Динамика статистических показателей активности НАД·H^2

Срок хранения	Статистические показатели	Тип эпителиальных клеток	
		передний	задний
3 ч	$M \pm m$	66,6 ± 0,40	63,5 ± 0,57
	$V \pm v$	22,7 ± 0,40	19,6 ± 0,60
	$V' \pm v'$	5,2 ± 1,20	5,3 ± 1,20
1 сут	$M \pm m$	71,8 ± 0,43	70,2 ± 0,71
	$V \pm v$	22,7 ± 0,40	22,3 ± 0,70
	$V' \pm v'$	5,7 ± 1,30	6,6 ± 1,50
2 сут	$M \pm m$	45,7 ± 0,35	50,6 ± 0,57
	$V \pm v$	29,2 ± 0,50	25,1 ± 0,80
	$V' \pm v'$	6,4 ± 1,40	7,4 ± 1,70
4 сут	$M \pm m$	48,2 ± 0,35	50,4 ± 0,63
	$V \pm v$	27,5 ± 0,50	27,4 ± 0,90
	$V' \pm v'$	6,9 ± 1,50	8,0 ± 2,0
6 сут	$M \pm m$	44,5 ± 0,35	46,8 ± 0,66
	$V \pm v$	30,0 ± 0,60	30,7 ± 1,00
	$V' \pm v'$	8,1 ± 1,80	8,7 ± 2,20
8 сут	$M \pm m$	41,1 ± 0,34	42,7 ± 0,70
	$V \pm v$	31,4 ± 0,60	35,8 ± 1,20
	$V' \pm v'$	10,2 ± 2,30	10,5 ± 2,30

Динамика коэффициентов вариации активности ферментов в клетках и средней активности в клеточных слоях может быть описана монотонно возрастающими рядами регрессии (рис. 2).

Гистограммы распределения клеток по активности фермента на различных этапах хранения подчиняются нормальному закону распределения (рис. 3).

Время гипотермического хранения роговицы оказывает влияние на изменение активности фермента в клетках переднего эпителия в 41,0 ± 0,05% случаев, а в клетках заднего эпителия — в

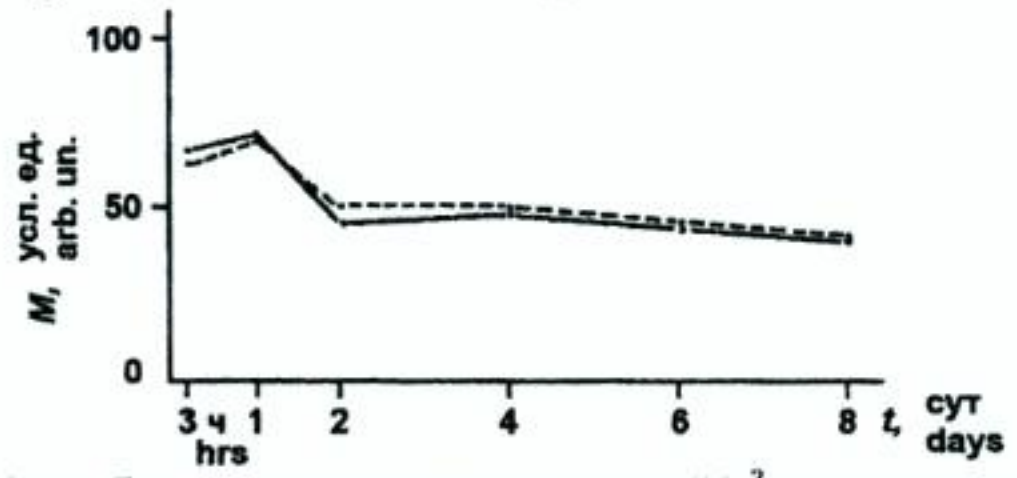


Рис. 1. Динамика удельной активности НАД·H^2 в клетках роговицы при ее гипотермическом хранении: —— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

rapid reduction in it below the original level (45.7 ± 0.35 and 50.6 ± 0.57). Starting from the 2nd day of storage the activity of the enzyme in the cells of the posterior epithelium exceeds its level in the cells of the anterior epithelium, followed by its smooth reduction in all the cells, reaching by the 8th day, respectively, the values of 41.1 ± 0.34 and 42.7 ± 0.70 (Table 1). The dynamics of the NAD·H^2 activity is shown in Fig. 1.

Table 1

Dynamics of statistical features of NAD·H^2 activity

Duration of storage	Statistical features	Type of epithelial cells	
		anterior	posterior
3 hrs	$M \pm m$	66.6 ± 0.40	63.5 ± 0.57
	$V \pm v$	22.7 ± 0.40	19.6 ± 0.60
	$V' \pm v'$	5.2 ± 1.20	5.3 ± 1.20
1 day	$M \pm m$	71.8 ± 0.43	70.2 ± 0.71
	$V \pm v$	22.7 ± 0.40	22.3 ± 0.70
	$V' \pm v'$	5.7 ± 1.30	6.6 ± 1.50
2 days	$M \pm m$	45.7 ± 0.35	50.6 ± 0.57
	$V \pm v$	29.2 ± 0.50	25.1 ± 0.80
	$V' \pm v'$	6.4 ± 1.40	7.4 ± 1.70
4 days	$M \pm m$	48.2 ± 0.35	50.4 ± 0.63
	$V \pm v$	27.5 ± 0.50	27.4 ± 0.90
	$V' \pm v'$	6.9 ± 1.50	8.0 ± 2.0
6 days	$M \pm m$	44.5 ± 0.35	46.8 ± 0.66
	$V \pm v$	30.0 ± 0.60	30.7 ± 1.00
	$V' \pm v'$	8.1 ± 1.80	8.7 ± 2.20
8 days	$M \pm m$	41.1 ± 0.34	42.7 ± 0.70
	$V \pm v$	31.4 ± 0.60	35.8 ± 1.20
	$V' \pm v'$	10.2 ± 2.30	10.5 ± 2.30

The dynamics of the factors of variability of the enzymes in the cells and mean activity in the cell layers may be described by monotonously increasing row of regression (Fig. 2).

The histograms of cell distribution by the activity of the enzyme at various stages of storage are regulated by the law of distribution (Fig. 3).

The time of hypothermic storage of the sclera affects the changes in the activity of the enzyme in the cells of the anterior and posterior epithelium in

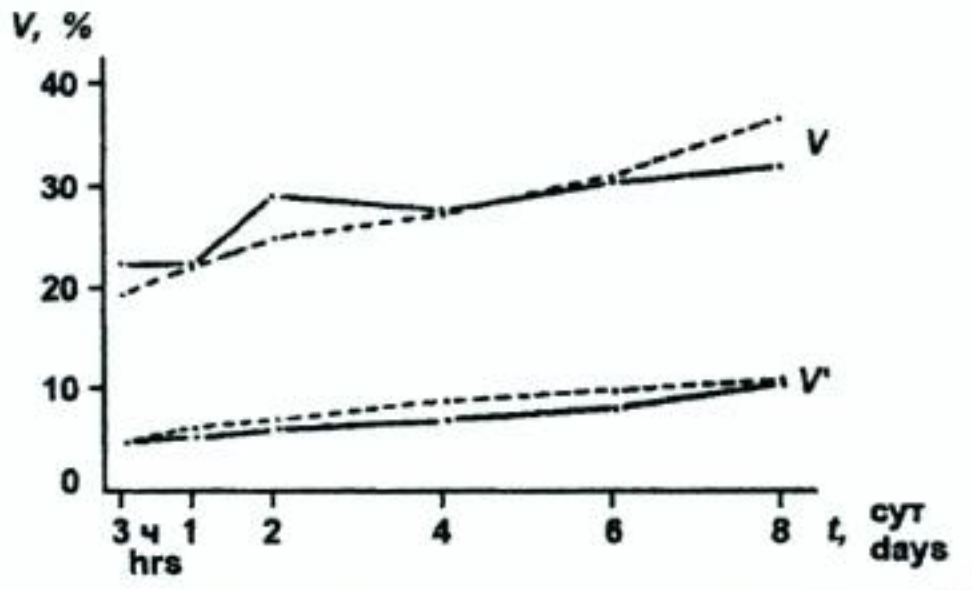


Рис. 2. Динамика коэффициентов вариации по первичным V и вторичным V' датам активности НАД·H^2: —— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

Fig. 1. Dynamics of specific activity of NAD·H^2 in the cells of the sclera during its hypothermic storage: —— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

Fig. 2. Dynamics of variation factors by the primary V and secondary V' periods of the NAD·H^2 activity: —— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

Матеріал, захищений авторським правом

31,9 ± 0,10%. Более сильное влияние этого фактора отмечается на изменении средней активности фермента в клеточных слоях роговицы: в слое обновляющегося эпителия — 92,1 ± 0,8, в слое растущего — 85,3 ± 1,4%. Этот факт отмечался при исследовании других окислительно-восстановительных ферментов в клетках роговицы [4].

Между активностью фермента в клетках двух слоев роговицы зафиксирована корреляционная связь средней силы, которая в процессе гипотермического хранения роговицы переходит в слабую (табл. 2).

Таблица 2

Изменение корреляционной связи между удельной активностью НАД·H^2 в клетках переднего и заднего слоев эпителия

Время хранения	Коэффициент корреляции $R \pm r$
3 ч	0,67 ± 0,26
1 сут	0,62 ± 0,28
2 сут	0,67 ± 0,26
4 сут	0,62 ± 0,28
6 сут	0,58 ± 0,29
8 сут	0,55 ± 0,30

Изменения активности фермента в клетках растущего и обновляющегося эпителия связаны между собой функционально ($r = 0,99 \pm 0,07$).

Активность НАДФ·H^2 в клетках переднего и заднего эпителия роговицы в процессе гипотермического хранения характеризуется постепенным ее понижением. Только на 1- и 6-е сутки хранения отмечается небольшое увеличение активности по отношению к предшествующему этапу хранения. Динамика активности фермента представлена в табл. 3 и на рис. 4.

Таблица 3

Динамика статистических показателей активности НАДФ·H^2

Срок хранения	Статистические показатели	Тип эпителиальных клеток	
		передний	задний
3 ч	$M \pm m$	32,5 ± 0,26	32,5 ± 0,22
	$V \pm v$	30,9 ± 0,60	15,1 ± 0,50
	$V' \pm v'$	5,4 ± 1,20	5,3 ± 1,20
1 сут	$M \pm m$	33,3 ± 0,28	26,8 ± 0,28
	$V \pm v$	26,8 ± 0,50	16,6 ± 0,50
	$V' \pm v'$	5,9 ± 1,30	5,9 ± 1,30
2 сут	$M \pm m$	30,9 ± 0,23	30,5 ± 0,26
	$V \pm v$	28,5 ± 0,50	18,7 ± 0,60
	$V' \pm v'$	7,5 ± 1,60	6,6 ± 1,50
4 сут	$M \pm m$	16,5 ± 0,17	18,5 ± 0,17
	$V \pm v$	39,4 ± 0,70	20,8 ± 0,70
	$V' \pm v'$	8,1 ± 1,80	7,5 ± 1,70
6 сут	$M \pm m$	18,1 ± 0,19	20,4 ± 0,22
	$V \pm v$	40,4 ± 0,70	23,2 ± 0,70
	$V' \pm v'$	9,3 ± 2,10	8,8 ± 2,00
8 сут	$M \pm m$	15,7 ± 0,18	17,3 ± 0,22
	$V \pm v$	43,2 ± 0,80	27,5 ± 0,90
	$V' \pm v'$	10,2 ± 2,30	9,5 ± 2,10

Коэффициенты вариации первичных и вторичных дат активности для всех исследуемых объектов увеличиваются в процессе хранения (рис. 5).

Распределение клеток по удельной активности фермента (рис. 6), как и препаратов по его средней

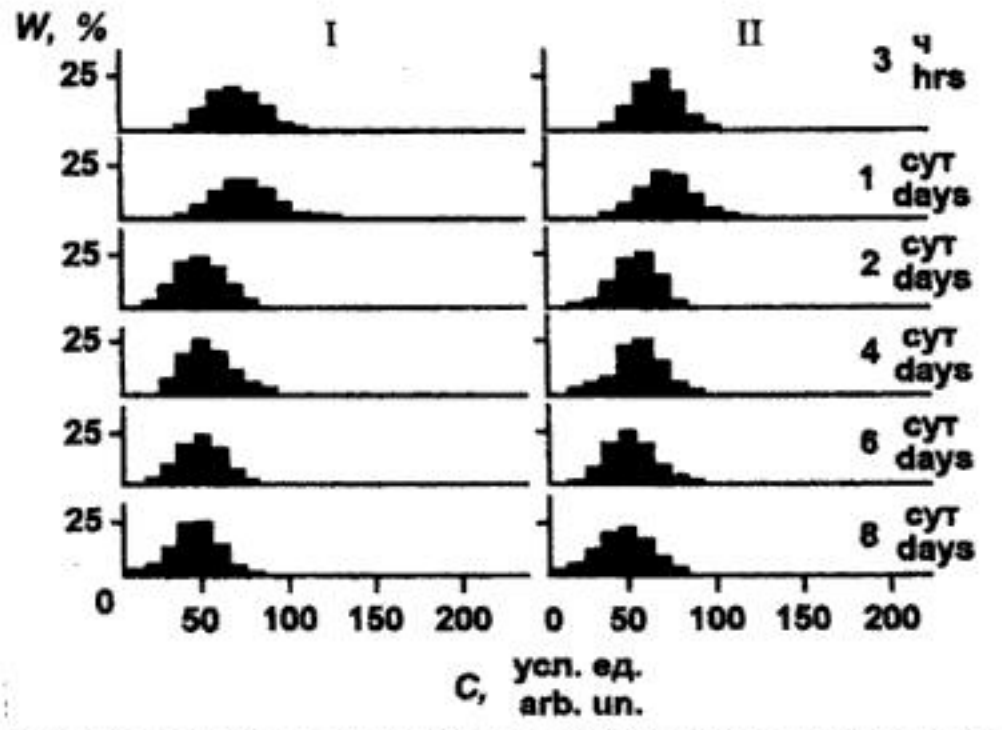


Рис. 3. Гистограммы распределения клеток по удельной активности в них НАД·H^2: I — клетки переднего эпителия; II — клетки заднего эпителия.

Fig. 3. Histograms of the cell distribution by the specific activity of NAD·H^2 in them: I — cells of the anterior epithelium; II — cells of the posterior epithelium.

41.0 ± 0.05% cases, and in the cells of the posterior epithelium — in 31.9 ± 0.10% cases. A stronger influence of this factor is reported on the changes in the mean activity of the enzyme in the cell layers of the sclera: in the layer of the renewing epithelium — 92.1 ± 0.8, in the layer of the growing epithelium — 85.3 ± 1.4%. This fact was reported when studying another oxidative-restoratory enzymes in the cells of the sclera [4].

Table 2

Changes in correlation between specific activity of NAD·H^2 in cells of anterior and posterior epithelium

Duration of storage	Correlation factor $R \pm r$
3 hrs	0.67 ± 0.26
1 day	0.62 ± 0.28
2 days	0.67 ± 0.26
4 days	0.62 ± 0.28
6 days	0.58 ± 0.29
8 days	0.55 ± 0.30

A moderate correlation was established between the activity of the enzyme in the cells of two layers of the sclera, which becomes weak and poor in the process of hypothermic storage of the latter (Table 2).

The changes in the activity of the enzyme in the cells of growing and renewing epithelium are functionally interrelated ($r = 0.99 \pm 0.07$).

The activity of NADP·H^2 in the cells of the anterior and posterior epithelium of the sclera during

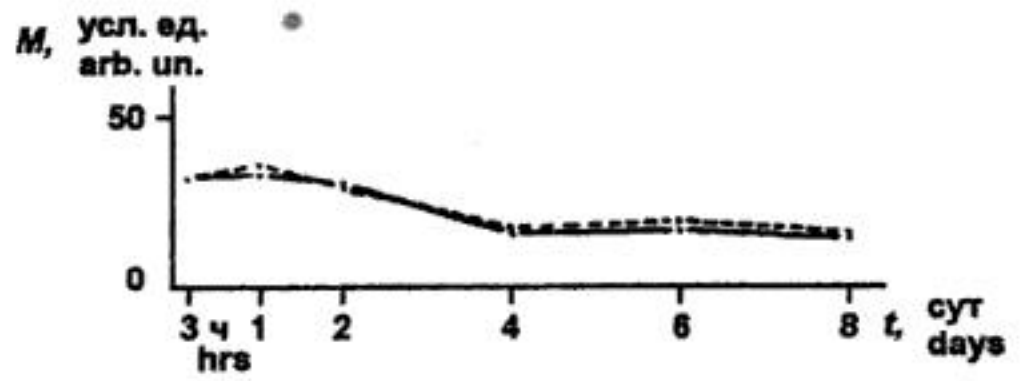


Рис. 4. Динамика удельной активности НАДФ·H^2 в клетках роговицы при ее гипотермическом хранении: —— — клетки переднего эпителия; - - - - - клетки заднего эпителия.

Fig. 4. Dynamics of specific activity of NADP·H^2 in the cells of the sclera during its hypothermic storage: —— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

Матеріал, захищений авторським правом

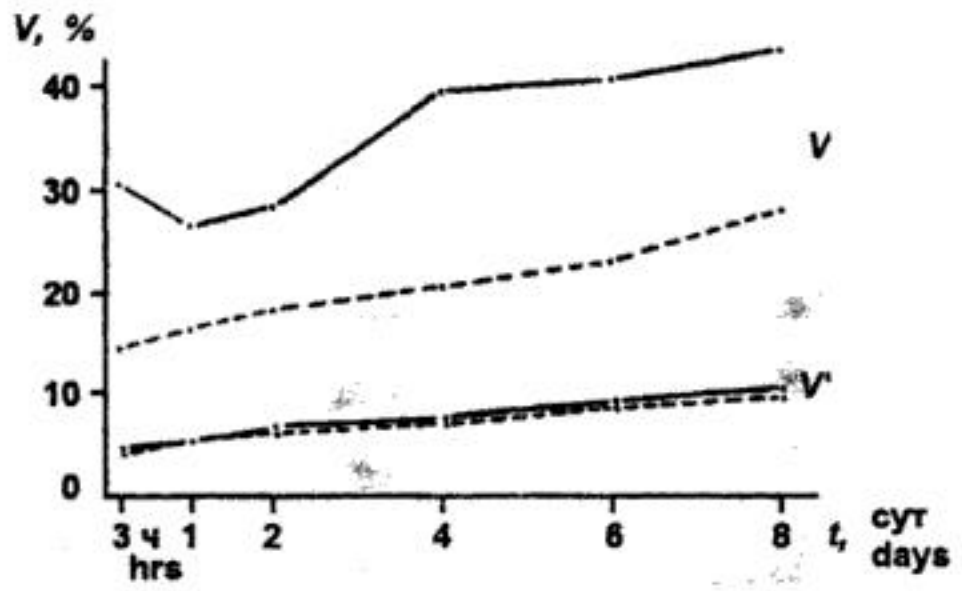


Рис. 5. Динамика коэффициентов вариации по первичным V и вторичным V' датам активности НАДФ·H^2: ——— — клетки переднего эпителия; - - - - — клетки заднего эпителия.

Fig. 5. Dynamics of variation factors by the primary V and secondary V' periods of the NADP·H^2 activity: ——— — cells of the anterior epithelium; - - - - — cells of the posterior epithelium.

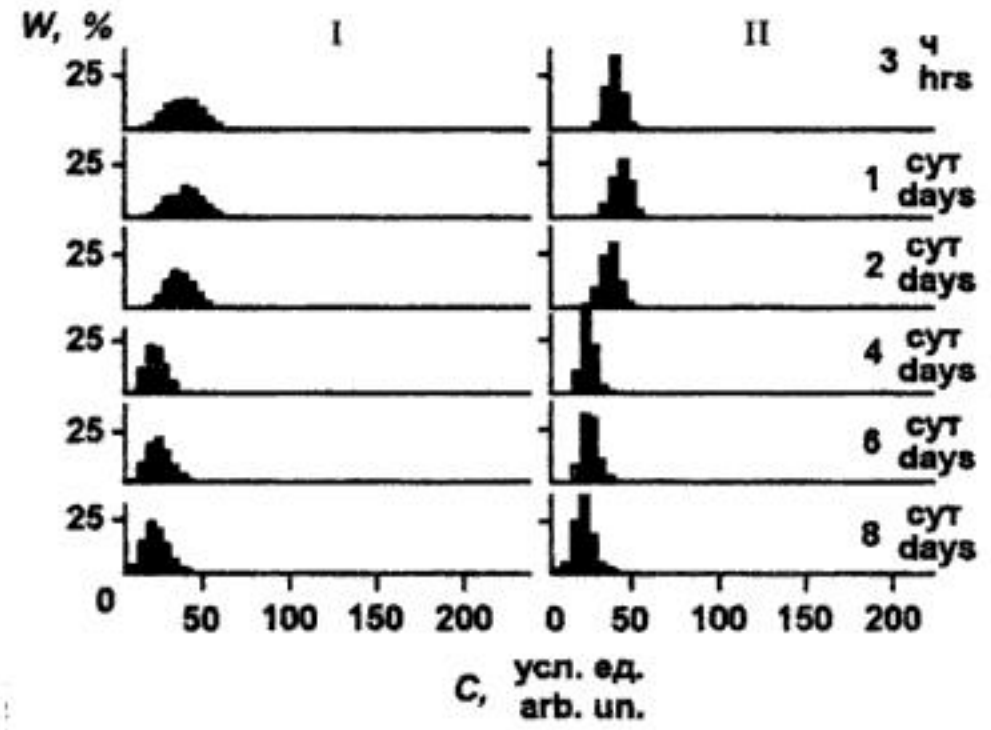


Рис. 6. Гистограммы распределения клеток по удельной активности в них НАДФ·H^2: I — клетки переднего эпителия; II — клетки заднего эпителия.

Fig. 6. Histograms of the cell distribution by the specific activity of NADP·H^2 in them: I — cells of the anterior epithelium; II — cells of the posterior epithelium.

активности, подчиняется распределению Гаусса–Лапласа.

Время хранения роговицы в условиях гипотермии оказывает влияние на изменение активности НАДФ·H^2 в клетках переднего эпителия на 45,9 ± 0,05, заднего — на 69,1 ± 0,05%. Более значительно выражено влияние фактора времени хранения на показатели средней активности фермента в клеточных слоях. Оно составляет для обновляющегося эпителия 95,5 ± 0,4, для растущего — 94,5 ± 0,5%.

Между активностью ферментов в двух слоях роговицы предполагается ($P < 0,95$) наличие

Таблица 4

Изменение корреляционной связи между удельной активностью НАДФ·H^2 в клетках переднего и заднего слоев эпителия

Время хранения	Коэффициент корреляции $R \pm r$
3 ч	0,48 ± 0,31
1 сут	0,45 ± 0,32
2 сут	0,42 ± 0,32
4 сут	0,45 ± 0,32
6 сут	0,42 ± 0,32
8 сут	0,40 ± 0,32

hypothermic storage is characterized by its gradual reduction. Only at the 1st and 6th days of storage there is reported a small increase in the activity with respect to preceding stage of storage. The dynamics of the activity of the enzyme is given in Table 3 and Fig. 4.

Table 3

Dynamics of statistical features of NAD-H^2 activity

Duration of storage	Statistical features	Type of epithelial cells	
		anterior	posterior
3 hrs	$M \pm m$	32.5 ± 0.26	32.5 ± 0.22
	$V \pm v$	30.9 ± 0.60	15.1 ± 0.50
	$V' \pm v'$	5.4 ± 1.20	5.3 ± 1.20
1 day	$M \pm m$	33.3 ± 0.28	26.8 ± 0.28
	$V \pm v$	26.8 ± 0.50	16.6 ± 0.50
	$V' \pm v'$	5.9 ± 1.30	5.9 ± 1.30
2 days	$M \pm m$	30.9 ± 0.23	30.5 ± 0.26
	$V \pm v$	28.5 ± 0.50	18.7 ± 0.60
	$V' \pm v'$	7.5 ± 1.60	6.6 ± 1.50
4 days	$M \pm m$	16.5 ± 0.17	18.5 ± 0.17
	$V \pm v$	39.4 ± 0.70	20.8 ± 0.70
	$V' \pm v'$	8.1 ± 1.80	7.5 ± 1.70
6 days	$M \pm m$	18.1 ± 0.19	20.4 ± 0.22
	$V \pm v$	40.4 ± 0.70	23.2 ± 0.70
	$V' \pm v'$	9.3 ± 2.10	8.8 ± 2.00
8 days	$M \pm m$	15.7 ± 0.18	17.3 ± 0.22
	$V \pm v$	43.2 ± 0.80	27.5 ± 0.90
	$V' \pm v'$	10.2 ± 2.30	9.5 ± 2.10

The factors of variability of the primary and secondary periods of activity for all the studied systems increase during storage (Fig. 5).

Distribution of the cells by the specific activities of the enzyme (Fig. 6), as well as of the preparations by its mean activity, observe the law of Gauss–Laplace.

The duration of storage of the sclera under hypothermic conditions affects the changes in the NADP·H^2 activity in the cells of the anterior epithelium by 45.9 ± 0.05%, and in the cells of the posterior epithelium — by 69.1 ± 0.05%. The duration of storage affects the features of the mean activity of the enzyme in the cell layers much stronger. For the renewing epithelium it is 95.5 ± 0.4%, and for the growing one — 94.5 ± 0.5%.

The availability of a weak correlation (P) is expected between the activities of enzymes in two layers of the sclera at the original stage of storage, which is reduced in the process of storage (Table 4).

However, the changes in the enzyme activity in two layers of the sclera are interlinked ($r = 0.99 \pm 0.07$) with a functional bond during hypothermic storage.

A study of the activity of NAD- and NADP-dehy-

Table 4

Changes in correlation between specific activity of NADP·H^2 in cells of anterior and posterior epithelium

Duration of storage	Correlation factor $R \pm r$
3 hrs	0.48 ± 0.31
1 day	0.45 ± 0.32
2 days	0.42 ± 0.32
4 days	0.45 ± 0.32
6 days	0.42 ± 0.32
8 days	0.40 ± 0.32

Матеріал, захищений авторським правом

слабой корреляционной связи на начальном этапе хранения, которая в процессе хранения уменьшается (табл. 4). Однако изменения активности фермента в двух слоях роговицы связаны между собой в процессе длительного гипотермического хранения функциональной связью ($r = 0{,}99 \pm 0{,}07$).

Изучение активности НАД- и НАДФ-дегидрогеназ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы показало, что имеются незначительные различия в реакции их клеток на гипотермическое хранение. Активность ферментов в обновляющемся эпителии несколько ниже, чем в растущем, но тенденция к ее изменению для различных сроков хранения в этих видах клеток одинакова.

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. *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 // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 3.– С. 21–26.

Поступила 26.10.99

drogenases in the cells of the growing and renewing epithelium of the sclera showed that there are insignificant differences in the cell response to hypothermic storage. The activity of enzymes in the renewing epithelium is lower as compared with the growing one, though the tendency towards its changing is similar for different terms of storage for these types of cells.

REFERENCES

1. *Histology* (Introduction into pathology) / E. G. Ulumbekov, Ya. A. Chebyshev, eds.– M.: GEOTAR publ., 1997.– 960 p.
2. *Klimov A. A., Grafova G. Ya., Khilova Yu. K. et al.* Cell-differone organization of tissue and the problem of wound healing // Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii.– 1990.– 98, № 4.– P. 5–23.
3. *Structural* bases of adaptation and compensation of the disturbed functions / Ed. by D. S. Sarkisov.– M.: Meditsina publ., 1987.– 448 p.
4. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.*. Dynamics of activity of α-GPDH in the cells of growing and renewing epithelium of the sclera during its hypothermic storage // Probl. kriobiologii.– 1999.– № 3.– P. 21–26.

Accepted in 29.10.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 551.322: 536.615: 361.018: 51.014.413

UDC 551.322: 536.615: 361.018: 51.014.413

Фазовый переход "лед–вода" в криоконсервированных суспензиях эритроцитов

Ю. В. КУЧЕРЕНКО, В. Д. ЗИНЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

A "Water–Ice" Phase Transition in Cryopreserved Suspensions of Red Cells

Yu. V. KUCHERENKO, V. D. ZINCHENKO

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

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии исследовали плавление льда в криоконсервированных суспензиях эритроцитов. Показано, что процесс плавления в гетерогенных клеточных системах более сложный, чем в криоконсервантах, и требует вклада конвективного потока в порах в теплопроводность образца. Проведен расчет теплопроводности для суспензий эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-ПД и ПЭГ-1500, и для соответствующих консервантов. Отмечено увеличение теплопроводности клеточных суспензий по сравнению с теплопроводностью криоконсерванта.

Методом диференціальної скануючої калориметрії досліджували плавлення льоду в кріоконсервованих суспензіях еритроцитів. Показано, що процес плавлення в гетерогенних клітинних системах більш складний, ніж у кріоконсервантах, і вимагає врахування внеску конвективного потоку в порах у теплопровідність. Проведено розрахунок теплопровідності для суспензій еритроцитів, консервованих з гліцерином, 1,2-ПД і ПЕГ-1500, і для відповідних консервантів. Відзначено збільшення теплопровідності клітинних суспензій у порівнянні з теплопровідністю кріоконсерванта.

Melting of ice in cryopreserved suspensions of red cells was studied with a method of differential scanning calorimetry. It was shown that the process of melting in heterogeneous cell systems is more complicated than in cryoprotective media, and it requires involvement of the convective flow in the pores into thermal conductivity of the sample. The authors calculated the values of thermal conductivity for the red cell suspensions, cryopreserved with glycerol, 1.2-PD and PEG-1500, and for corresponding media. There was reported a rise in thermal conductivity of cell suspensions as compared with thermal conductivity of the cryoprotective medium.

Для успешного решения проблемы защиты биообъектов от действия низких температур необходимо знать процесс теплопереноса в течение замораживания и отогрева биологического материала. При анализе переноса тепла в клетки и ткани часто используют уравнения и граничные условия, полученные для процесса затвердевания в гомогенных средах [3–5]. Биологический материал обычно моделируют объемами, заполненными водой (вода составляет от 60 до 90% веса ткани) или солевым раствором. Вместе с тем в [3] показано, что процесс замораживания в ткани существенно отличен от процесса замораживания в гомогенных растворах. Более того, анализ затвердевания в плотной ткани (печени) и пористой (легком) выявил отличие в распространении фронта замораживания в этих тканях из-за изоляционных свойств воздуха, который содержит легкое.

Ранее [1] на суспензиях эритроцитов был обнаружен эффект влияния концентрации клеток в образце на процесс плавления. В работе мы использовали данные для изучения закономерностей плавления в клеточных суспензиях.

Эксперименты проводили на донорской крови человека, консервированной на растворе "Глюгицир", со сроком хранения до 4-х суток при 4 °С. Эритроциты получали из цельной крови троекрат-

To successfully solve the problem of protecting biosystems against the action of low temperatures it is required to possess the knowledge on the process of heat transfer during freeze-thawing of a biological material. When analyzing the transfer of heat into cells and tissues, the equations and boundary conditions are often applied, which were obtained for the process of solidification in homogeneous media [3–5]. A biological material is normally modelled by the volumes, filled with water (water comprises 60–90% of the tissue weight) or saline solution. Still, elsewhere [3] it was reported that the process of freezing in the tissue significantly differs from that in homogeneous solutions. Moreover, the analysis of solidification in the solid (liver) and porous (lung) tissues revealed the differences in the propagation of the freezing front in these tissues due to the insulative properties of air, which is contained in the lung.

Earlier [1] it was reported that the concentration of red cells in the sample affects the process of melting. The authors made use of these data for studying the rules of melting in cell suspensions.

The experiments were done with human donor blood, preserved on a Glugizir solution, with a period of storage of up to 4 days at 4 °C. The red cells were obtained from the whole blood by triple centrifugation of equal amounts of blood and 0.9%-NaCl solution at

Матеріал, захищений авторським правом

ным центрифугированием равных объемов крови и 0,9%-го раствора NaCl при 1 200*g* в течение 10 мин с последующим отделением плазмы от плотной суспензии клеток (гематокритное число 0,8 ± 0,005 л/л).

В работе использовались следующие криозащитные среды: 1) 30%-й раствор ПЭГ-1500 на 0,9%-м NaCl; 2) криозащитная среда "Пропандиосахароль": 1,2-пропандиол (35%), сахароза (3%) и NaCl (0,6%) на дистиллированной воде (до 1 л); 3) криоконсервант на основе глицерина: глицерин (184 г), NaCl (7,9 г), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (0,59 г), Na_2HPO_4 (0,59 г), глюкоза (3,6 г) на бидистилляте (до 1 л).

Для приготовления образцов смешивали равные объемы отмытых эритроцитов и криозащитный раствор. После 30 мин инкубации эритромассу отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием при 1 200*g* в течение 10 мин. Образцы весом от 0,6 до 1,0 г замораживали в стальном калориметрическом стаканчике быстрым погружением в жидкий азот (клетки, консервированные с 1,2-ПД или глицерином) или в парах жидкого азота (эритроциты с ПЭГ-1500).

Калориметрические исследования проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном в ИПКиК НАНУ. Охлажденный калориметрический стаканчик с замороженным образцом переносили в калориметр, предварительно охлажденный до –120 °С. Скорости отогрева составляли 0,2 °С/мин (в диапазоне температур от –70 до –10 °С) и 0,075 °С/мин (в интервале температур от –10 до 0 °С.) Площади пиков плавления рассчитывали с учетом базовой линии.

На рис. 1 представлены термограммы плавления от –40 до 0 °С для суспензий эритроцитов, консервированных с 1,2-ПД, и для надосадочной жидкости. В отличие от бинарных систем процесс плавления льда в исследуемых системах происходит в широком интервале температур, что связано с присутствием неэлектролитов, сахаров, солей, белков, липидов и т.д. Полученные данные указы-

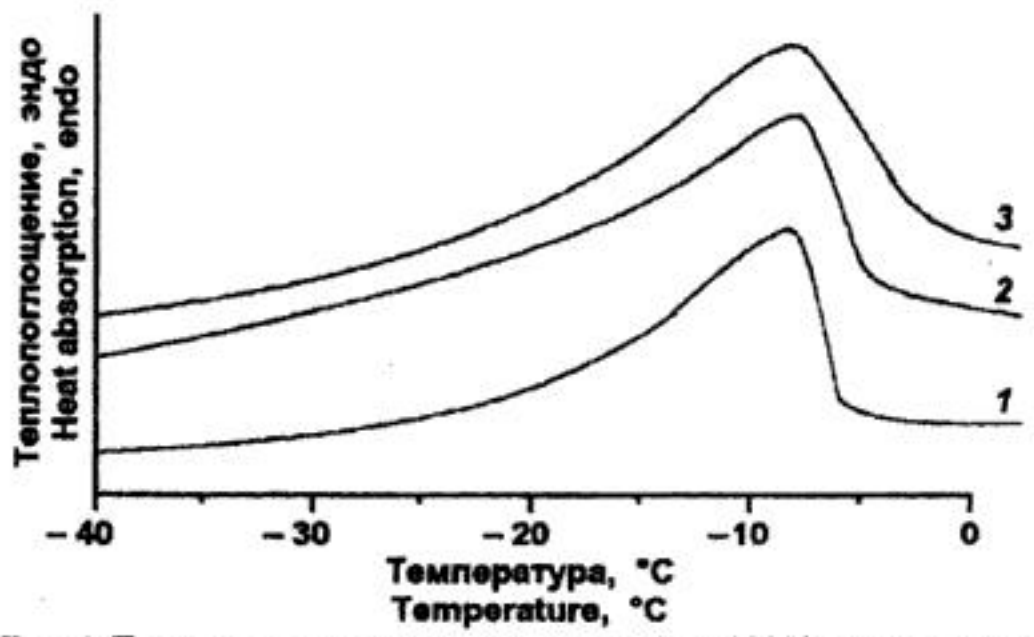


Рис. 1. Термограммы плавления льда: *1* – 100%-я суспензия эритроцитов, консервированных с 1,2-пропандиолом; *2* – эритроциты + надосадочная жидкость (50:50 по весу); *3* – криоконсервант на основе 1,2-пропандиола ("Пропандиосахароль").

Fig. 1. Thermograms of ice melting: *1* – 100%-suspension of red cells, preserved with 1.2-propanediol; *2* – red cells + supernatant (50:50 by weight); *3* – cryopreservative on the basis of 1.2-propanediol ("propanediosaccharole").

1 200*g* for 10 min with subsequent separation of the plasma from the dense suspension of cells (hematocrit was 0.8 ± 0.005 l/l).

The following cryoprotective media were used in the research: (i) 30%-solution of PEG-1500 on 0.9%-NaCl; (ii) cryoprotective medium "Propanediosaccharole": 1.2-propanediol (35%), sucrose (3%) and NaCl (0.6%) on distilled water (up to 1 l); (iii) cryopreservative on the basis of glycerol: glycerol (184 g), NaCl (7.9 g), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (0.59 г), Na_2HPO_4 (0.59 g), glucose (3.6 g) on the double-destilled water (up to 1 l).

For preparation of the samples the equal volumes of the washed-up red cells and a cryoprotective solution were mixed. Following 30-min incubation the erythromass was separated from the supernatant liquid by centrifugation at 1 200*g* for 10 min. The samples with the weights of 0.6–1.0 g were frozen in a steel-made calorimetric cell by fast immersion into liquid nitrogen (the cells, preserved with 1.2-PD or glycerol) or in the vapors above liquid nitrogen (the red cells with PEG-1500).

Calorimetric studies were done with a DCK scanning calorimeter, designed and developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov. A cooled calorimetric glass with a frozen sample was transferred into a calorimeter, pre-cooled down to –120 °C. The rates of thawing were 0.2 °C/min (within the temperature range of –70 ÷ –10 °C) and 0.075 °C/min (in the temperature range from –10 to 0 °C). The square areas of the peaks of melting were calculated assuming a base line.

Fig. 1 shows the thermograms of melting of the red cell suspensions, cryopreserved with 1.2-PD, and the supernatant liquid, from –40 to 0 °C. In contrast to the binary systems the process of ice melting in the studied systems occurs in a wide range of temperatures, which is related to the presence of non-electrolytes, sugars, salts, proteins, lipids, etc. The results obtained testify to the fact that in the samples with a high content of red cells the asymmetry of the melting curve increases due to a shift in its right portion to the low temperature region. It follows from the above that in the red cell suspensions, preserved with 1.2-PD, the duration of thawing is shortened as compared with the supernatant or cryoprotective solution. Such a rule is characteristic of the cells, preserved with glycerol (Fig. 2) and PEG-1500.

The following model was proposed to explain the peculiarities of an "ice–water" phase transition in cell suspensions. It was assumed that the difference in the ice melting in the red cell suspensions as compared with the supernatant or cryoprotective solution related to the dispersivity of the system. To examine the effect of the extent of the system dispersivity on the "ice-water" phase transition the experiment was staged, in which the system dispersivity was modelled artificially. A "propanediosaccharole" protective, di-

Матеріал, захищений авторським правом

вают на то, что в образцах с высоким содержанием эритроцитов увеличивается асимметрия кривой плавления за счет смещения ее правой ветви в низкотемпературную область. Из этого следует, что в суспензиях эритроцитов, консервированных с 1,2-ПД, уменьшается время оттаивания по сравнению с надосадочной жидкостью или криозащитным раствором. Подобная закономерность наблюдается и для клеток, консервированных с глицерином (рис. 2) и ПЭГ-1500.

Для объяснения особенностей фазового перехода "лед–вода" в клеточных суспензиях была предложена следующая модель. Предполагалось, что отличие в плавлении льда в суспензиях эритроцитов по сравнению с надосадочной жидкостью или раствором криоконсерванта связано с дисперсностью системы. Для проверки влияния степени дисперсности системы на характер фазового перехода "лед–вода" был проведен эксперимент, в котором дисперсность в системе искусственно моделировалась. В качестве контрольного образца использовали криоконсервант "Пропандиосахароль", разбавленный физиологическим раствором (1:1). В модельном образце в разбавленный раствор криоконсерванта добавляли кварцевый песок, что обеспечивало дисперсность системы. Поскольку состав среды и количество жидкости в обоих образцах были идентичны, можно предположить, что время плавления образца зависит от размера плавящихся частиц. Из рис. 3 видно, что в соответствии с нашим предположением процесс плавления льда в контрольном образце был более медленным, чем в модельном. В первом приближении процесс переноса тепла между контрольным образцом и калориметрическим стаканчиком может быть представлен двумя различными процессами: проводимостью и конвекцией у поверхности. Для дисперсной системы необходимо учитывать вклад конвекции в порах в баланс теплопереноса, который на начальном этапе плавления льда незначителен. Поток тепла вызывает увеличение молекулярной подвижности жидкой фазы, стимулируя образование конвективных потоков вблизи поверхности и в порах. Рост теплопроводности увеличивает тепловой поток через поверхность образца.

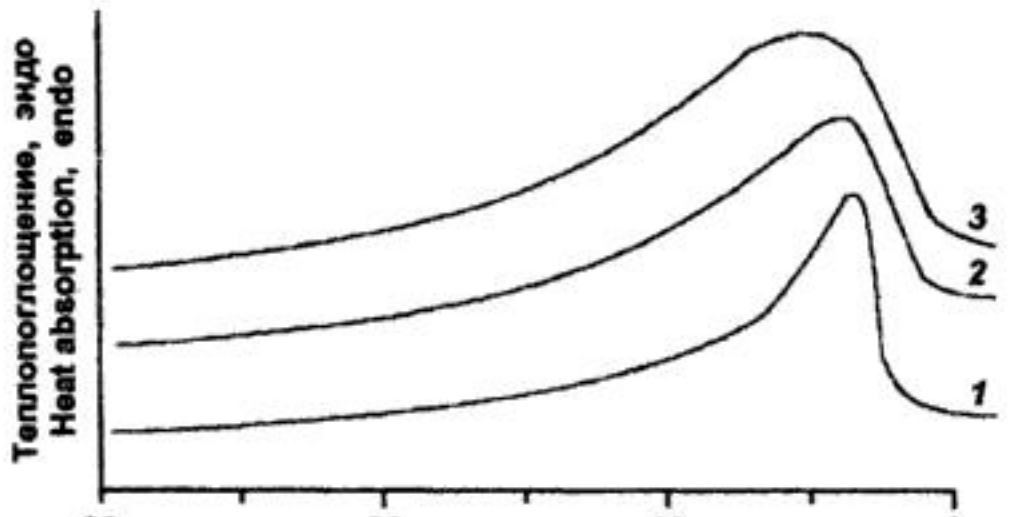


Рис. 2. Термограммы плавления льда: *1* – 100%-я суспензия эритроцитов, консервированных с глицерином; *2* – эритроциты + надосадочная жидкость (40:60 по весу); *3* – криоконсервант на основе глицерина.

Fig. 2. Thermograms of ice melting: *1* – 100%-suspension of red cells, preserved with glycerol; *2* – red cells + supernatant (40:60 by weight); *3* – cryoprotective medium containing glycerol.

luted with physiological saline (1:1, w/w solution), was used as a control sample. In the model sample quartz sand was added to the diluted cryoprotective solution, thus providing for the dispersivity of the system. Since the composition of the medium and the amount of liquid in both samples were identical, it may be supposed that the duration of melting of the sample depends on the dimensions of the particles being melted. It follows from Fig. 3 that in accordance with the above assumption the process of ice melting in the control sample was slower as compared with the model one. In the first approximation the process of heat transfer between the control sample and calorimetric cell may be represented by two different processes: conductivity and surface convection. For disperse system a contribution of convection in the pores into the balance of the heat transfer should be taken into account, which is insignificant at the initial point of ice melting. A flow of heat results in a rise in the molecular mobility of the liquid phase, thus stimulating formation of convective flows near the surface and in the pores. A growth in thermal conductivity increases a flow of heat through the surface of the sample.

Thermal properties of the samples are given in the Table. These data were used for calculation of heat conductivity for the red cell suspensions (λ_{rc}), preserved with glycerol, 1.2-PD and PEG-1500, as well as for corresponding protective media (λ_{cons}) according to the equation [2]:

$$\lambda = R^2 Q \rho / 4\tau (T - T_p),$$

where R is radius of the calorimetric cell; Q is a specific heat of melting; ρ is density; τ is duration of

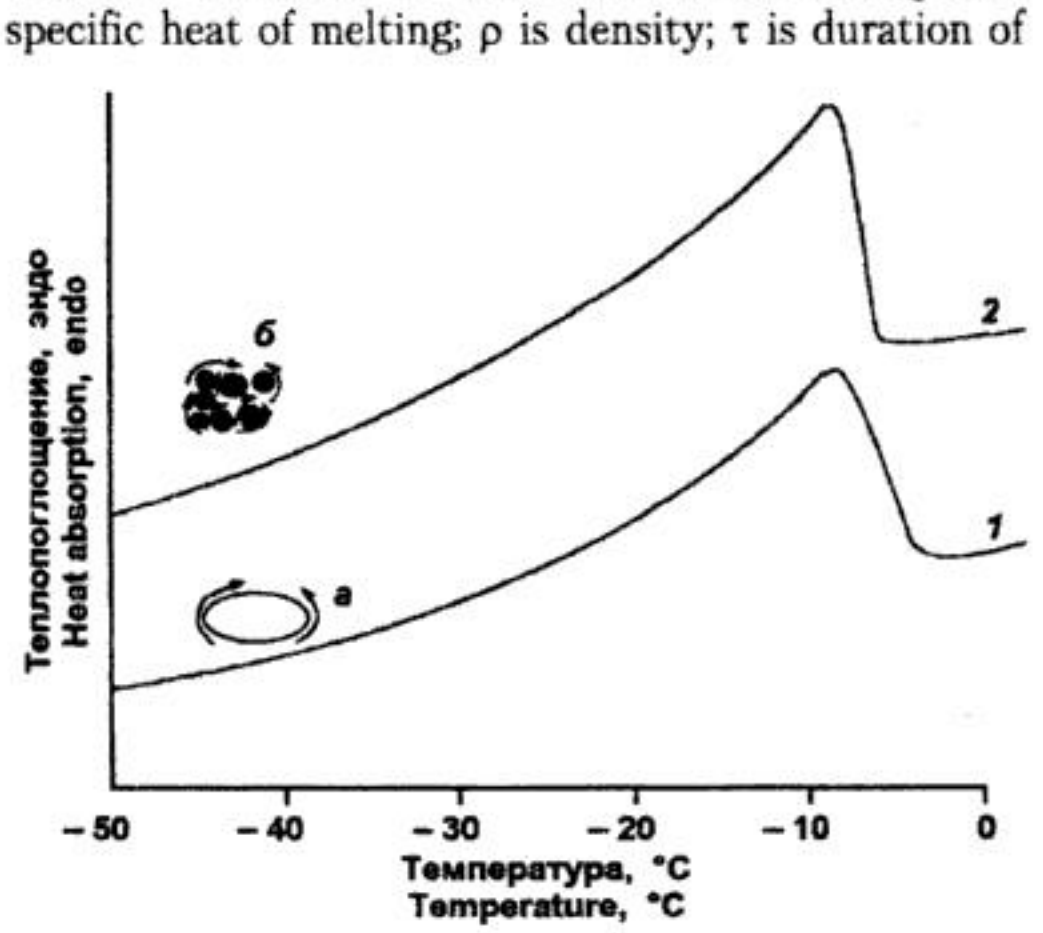


Рис. 3. Термограммы плавления льда для модельной системы: *а* – конвективные тепловые потоки в контрольном образце; *б* – конвективные тепловые потоки в модельном образце. *1* – криоконсервант на основе 1,2-пропандиола (контрольный образец); *2* – кварцевый песок + криоконсервант на основе 1,2-ПД (модельный образец).

Fig. 3. Thermograms of ice melting for the model system: *a* – convective heat flows in the control sample; *б* – convective heat flows in the model sample: *1* – cryoprotective medium containing 1.2-propanediol (control sample); *2* – quartz sand + cryoprotective medium containing 1.2-PD (model sample).

Матеріал, захищений авторським правом

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.811.013.014.413: 616-089.843

UDC 615.361.811.013.014.413: 616-089.843

Функциональное состояние фрагментов эмбриональной нервной ткани после гипотермического хранения и трансплантации реципиенту

Г. А. БАБИЙЧУК, В. В. ЛОМАКО, Л. И. ШУЛЯК, А. В. ШИЛО, И. И. ЛОМАКИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Functional State of Embryonic Nerve Tissue Fragments After Hypothermal Storage and Transplantation to a Recipient

G. A. BABIJCHUK, V. V. LOMAKO, L. I. SHULYAK, A. V. SHILO, I. I. LOMAKIN

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

Разработан способ гипотермического хранения (ГХ) эмбриональной нервной ткани (ЭНТ), обеспечивающий высокий процент приживления (90%) и восстановления утраченных функций после ее трансплантации реципиенту. Установлен оптимальный срок ГХ ЭНТ, биологическая полноценность которой определялась по способности синтезировать белок и ДНК, что может служить адекватным методом предварительной оценки жизнеспособности *in vitro* фрагментов ЭНТ. Показана возможность восстановления синаптических процессов, в частности, высокоаффинного обратного захвата нейромедиаторов (норадреналина, серотонина, Д-аспарагиновой кислоты) трансплантатом как нативной ЭНТ, так и после гипотермического хранения.

Розроблено спосіб гіпотермічного зберігання ембріональної нервової тканини (ЕНТ), що забезпечує високий відсоток приживлення (90%) і відновлення втрачених функцій після її трансплантації реципієнту. Установлено оптимальний строк ГЗ ЕНТ, біологічна повноцінність якої визначена за здатністю синтезувати білок та ДНК, що може служити адекватним методом попередньої оцінки життєздатності *in vitro* фрагментів ЕНТ. Показана можливість відновлення синаптичних процесів, зокрема, високоафінного зворотного захвату нейромедіаторів (норадреналіну, серотоніну, Д-аспарагінової кислоти) трансплантатом як нативної ЕНТ, так і після гіпотермічного зберігання.

The way of hypothermal storage (HS) of embryonic nerve tissue (ENT), providing a high retention percentage (90%) and lost functions recovery after its transplantation to a recipient, was elaborated. We have established an optimal term of ENT HS, whose biological integrity was determined according to the capability to synthesize protein and DNA, that can serve as an adequate method of viability in vitro preliminary estimation of ENT fragments. The possibility of synaptic processes recovery , in particular a highly affinic uptake of neuromediators (norepinephrine, serotonine, D-asparaginic acid) by a transplant of both native ENT and after hypothermal storage was demonstrated.

Анализ данных научной литературы по проблеме трансплантации ЭНТ в центральную нервную систему (ЦНС) животных и человека показал [3, 4, 6], что при соблюдении всех необходимых условий аллотрансплантаты в головном и спинном мозге, а также в периферическом нерве приживляются, развиваются и функционируют практически на протяжении всей жизни реципиента, по крайней мере у мелких лабораторных животных (крыс, мышей). При ксенотрансплантации отмечаются сходные, но менее успешные результаты. Применение иммунодепрессантов улучшает приживление трансплантата [20].

Инсульты, травмы головного и спинного мозга составляют значительную группу заболеваний, в лечении которых можно использовать трансплантации (имплантации) ЭНТ человека и животных. Последствия таких повреждений, как правило, необратимы, а результаты экспериментов на животных вселяют надежду на успешное использование этого метода для лечения заболеваний данной этиологии.

Показана принципиальная возможность лечения методом трансплантации ЭНТ таких патоло-

The analysis of scientific literature data on the problem of ENT transplantation into human and animal central nerve system (CNS) has shown [3,4,6], that when observing all necessary conditions the allotransplants in brain and spinal cord, as well as in a peripheric nerve are retained, develop and function practically during all recipient's life, at least in small laboratory animals (rats, mice). During xenotransplantation the similar, but less successful results are observed. The immune depressant application improves a transplant's survival [20].

Insults, brain and spinal cord traumas make a considerable group of diseases, where it is possible to use human and animal ENT transplantation (implantation). As a rule, the consequences of such damages are irreversibe, and the experiments' results instil hope for this method successful usage when treating the diseases of given etiology.

The treatment principle feasibility by ENT transplantation method of such CNS pathology, as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Korsakoff's syndrome, hereditary ataxia, some forms of epilepsy was demonstrated [3, 4, 8, 15].

Матеріал, захищений авторським правом

гий ЦНС, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром Корсакова, наследственная атаксия, некоторые формы эпилепсии и др. [3, 4, 8, 15].

При работе в клинике возникает необходимость в предварительном накоплении трансплантационного материала, его хранении и транспортировке. Например, при лечении болезни Паркинсона методом трансплантации ЭНТ одному больному следует ввести около 60 тыс. дофаминергических клеток, в то время как у одного 8-недельного эмбриона человека можно выделить всего 10–15 тыс. таких клеток, т.е. нужен одновременный забор или накопление такого материала от нескольких эмбрионов одного и того же срока развития. Поэтому разработка способов кратко- и долгосрочного хранения ЭНТ является актуальной задачей.

В работах по изучению влияния глубокого замораживания на сохранность ЭНТ крыс были использованы различные температурные режимы замораживания и разные питательные среды: среда Игла, раствор Рингера, амниотическая жидкость, раствор Хенкса и др. При этом каждая среда содержала 10% диметилсульфоксида (ДМСО). ЭНТ хранили в течение 6 ч, 7 и 130 сут. Затем размороженную ткань трансплантировали. Отмечают, что амниотическая жидкость была менее пригодна для использования ее при замораживании, так как она способствовала фрагментации ткани трансплантата [14]. Другие исследователи считают амниотическую жидкость с 10% ДМСО наиболее благоприятной средой для замораживания [2]. При пересадке в головной мозг новорожденных и взрослых крыс ЭНТ гиппокампа (нативной и после глубокого замораживания) было установлено, что в обоих случаях трансплантаты образуют афферентные и эфферентные связи с мозгом хозяина, причем холинергические волокна развиваются одинаково у новорожденных и взрослых реципиентов, а нехолинергические – лучше у взрослых хозяев. Было также показано, что при пересадке нативной ЭНТ и после криоконсервации трансплантаты от 16-дневных эмбрионов и новорожденных крыс не развиваются, а ткани от 18–21-дневных эмбрионов приживляются, причем нативная – в 88%, а после замораживания – в 28% [2, 14]. В работах [9, 12, 19] отмечено, что клетки, культивированные после длительной криоконсервации, были очень чувствительны к механическим и осмотическим воздействиям, а процент приживления трансплантатов после криоконсервирования был довольно низким. Следовательно, оптимальные методы хранения и параметры оценки жизнеспособности ткани окончательно не разработаны.

В нашей работе представлены результаты изучения функционального состояния, пролиферативной способности ЭНТ после ГХ, а также оценка ее жизнеспособности и степени приживления после трансплантации в мозг реципиента.

The necessity of a preliminary accumulation of a transplantational material, its storage and transportation occurs when working in a clinic. For example, when treating Parkinson's disease using ENT transplantation method, approximately 60 thousand of dophaminergic cells should be introduced to one patient, meanwhile in one 8-week human embryo one can isolate 10–15 thousand of such cells in the whole, i.e. a simultaneous procurement or accumulation of such material from several embryos with the same development term is necessary. That is why the development of the ways of ENT short- and long-term storage is an actual task.

In the works on the studying of deep freezing on rat's ENT integrity, the various temperature regimens of freezing and different cultural media, such as Eagl's medium, Ringer's solution, amniotic liquid, Henks's solution etc, were used. Thereat each medium contained 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO). ENT were stored within 6 hrs, 7 and 130 days. Then the frozen-thawed tissue was grafted. It has been noted, that an amniotic liquid was less suitable for its usage at freezing, because it contributed to a transplant's tissue fragmentation [14]. Other investigators consider an amniotic liquid with 10% DMSO as the most favourable medium for freezing [2]. When grafting the hippocamp ENT (native and after deep freezing) into the brain of newborn and adult rats it has been established, that in both cases the transplants form the afferent and efferent connections with a host's brain, thereat the cholinergic fibers develop by the same way both in newborn and adult recipients, but non-cholinergic ones develop better in adult hosts. It was also demonstrated, that when grafting native and after cryopreservation ENT, the transplants from 16-days embryos and newborn rats do not develop, but the tissues from 18–21 days embryos are retained, thereat a native one – in 88%, but after freezing – in 28% [2, 14]. In the [9, 12, 19] it was noted, that the cells, being cultured after a prolonged cryopreservation were very sensitive to mechanical and osmotic effects, but the percentage of transplant retention after cryopreservation was quite low. Thus, the optimal methods of storage and parameters for tissue viability evaluation have not finally developed.

The results of study of functional activity, ENT proliferative capability after hypothermal storage (HS), as well as the evaluation of its viability and the retention degree after transplantation into a recipient's brain are presented in our work.

The experiments are carried-out in Vistar line rats with 180–200 g mass, as the recipients. The animals made 7 experimental groups: 1 – the control group; 2 – the animals with anterior hypothalamus (AHT) destruction; 3 – the animals with a one-sided destruction of sensomotoric field of left hemisphere cortex; 4 – the animals with AHT destruction and cortex native ENT transplantation; 5 – the animals with cortrex destruction and cortex native ENT transplan-

Матеріал, захищений авторським правом

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар массой 180–200 г, служивших реципиентами. Животные составили 7 экспериментальных групп: 1 – контрольная группа; 2 – животные с разрушением переднего гипоталамуса (ПГТ); 3 – животные с односторонним разрушением сенсомоторной области коры левого полушария (КЛП); 4 – животные с разрушением ПГТ и трансплантацией нативной ЭНТ гипоталамуса; 5 – животные с разрушением КЛП и трансплантацией нативной ЭНТ коры; 6 – животные с разрушением ПГТ и трансплантацией ЭНТ гипоталамуса после ГХ; 7 – животные с разрушением КЛП и трансплантацией ЭНТ коры после ГХ. Разрушение структур головного мозга и трансплантацию ЭНТ производили по координатам стереотаксического атласа [10]. Для оценки функционального состояния трансплантата животных забивали декапитацией через 30 сут после трансплантации. Контролем служили нетравмированные области ПГТ и КЛП головного мозга крыс.

Выделенные фрагменты ЭНТ коры и гипоталамуса, взятые из головного мозга 16- и 17-дневных плодов белых крыс, служили донорским материалом и были инъецированы в предварительно разрушенные области ПГТ и КЛП крыс-реципиентов. Для исследования влияния ГХ на функциональное состояние фрагментов ЭНТ их помещали в питательную среду 199, содержащую 10% амниотической жидкости (*pH* 7,4), и хранили при температуре 4 °С в течение 1 и 5 сут.

Как известно, одним из критериев функциональной полноценности ткани является способность к митотическому делению и росту клеток, поэтому в образцах ЭНТ коры и гипоталамуса были исследованы биосинтез белка и ДНК (клеточные механизмы, обеспечивающие эти функции ткани) после гипотермического хранения.

Уровень биосинтеза белка и ДНК определяли радиоизотопным методом по включению ^{3}Н-лейцина и ^{3}Н-тимидина при инкубации (37 °С) с использованием стекловолокнистых фильтров GF/B (Watman). Величину захвата ^{3}Н-норадреналина (НА), ^{3}Н-серотонина (СТ) и ^{3}Н-Д-аспарагиновой кислоты синаптосомами оценивали также по радиоизотопному методу.

Результаты исследования интенсивности включения меченых предшественников в ДНК и белок ЭНТ сразу после забора (контроль) и ГХ в течение 1 и 5 сут представлены на рис. 1 и 2. Показано, что через сутки ГХ синтез ДНК в изучаемых структурах повышается. Через 5 сут хранения биосинтез ДНК в ткани ГТ и коре снижается до уровня неспецифической сорбции. Синтез белка в коре и ГТ через сутки после ГХ повышается практически в 2 раза, снижаясь к 5-м суткам.

Таким образом, на 5-е сутки ГХ клетки ЭНТ коры и гипоталамуса способны синтезировать белок, в то время как синтез ДНК к этому сроку

tation; 6 – the animals with AHT destruction and hypothalamus ENT transplantation after HS; 7 – the animals with cortex destruction and cortex ENT transplantation after HS. Brain structure destruction and ENT transplantation were carried-out according to the stereotaxic atlas coordinates [10]. For a transplant functional state evaluation the animals were decapitated in 30 days after transplantation. Rat AHT and brain cortex not-damaged areas served as the control.

Isolated fragments of cortex ENT and hypothalamus, taken from the brain of 16- and 17-days fetuses of white rats were the donor material and were injected into preliminarily destroyed areas of AHT and cortex of the rats-recipients. To investigate HS effect on ENT fragments functional state they were placed into a nutritive medium 199, containing 10% of amniotic liquid (*pH* 7,4) and stored under the temperature of 4 °C within 1 and 5 days.

As it is known, one of the criteria of tissue functional integrity is the capability to a mitotic fission and cell growth, that is why in the samples of cortex and hypothalamus ENT the protein and DNA biosynthesis (cellular mechanisms, providing these functions to a tissue) after hypothermal storage were investigated.

The level of protein and DNA biosynthesis was determined by means of radioisotopic method according to ^{3}H-leucine and ^{3}H-thymidine inclusion during incubation (37 °C) using GF/B (Watman) glass fibrous filters. The uptake value of ^{3}H-norepinephrine (NE), ^{3}H-serotonin (ST) and ^{3}H-D-asparaginic acid by synaptosomes was mesured using radioisotopic method too.

The investigation results of intensity of labelled precursors inclusion into DNA and ENT protein right after procurement (the control) and HS within 1 and 5 days are presented in Fig. 1 and 2. It has been shown, that in a day of HS the DNA synthesis in studied structures increases. In 5 days of storage DNA biosynthesis in HT and cortex tissue reduces down to the level of a non-specific sorption. Protein synthesis in cortex and HT in a day after HS increases practically in 2 times, decreasing by the 5th day.

Thus, on the 5th day of HS the cells of hypothalamus and cortex ENT are capable to synthesize protein, meanwhile the DNA synthesis by this term ceases. It is of common knowledge, that a maximum level of DNA synthesis precedes to a considerable strengthening of mitotic fission, that is important condition for a transplant successful survival, consequently, the studied structures of embryonic brain even in a day after HS at 4 °C preserve their proliferative capability.

In the next series of experiments we have evaluated a functional state of hypothalamus and cortex ENT fragments (native and after hypothermal storage within 1 and 5 days) by the transplantation to mature rats. The importance of the transplantation introduction into the stocks of actual scientific methods for

Матеріал, захищений авторським правом

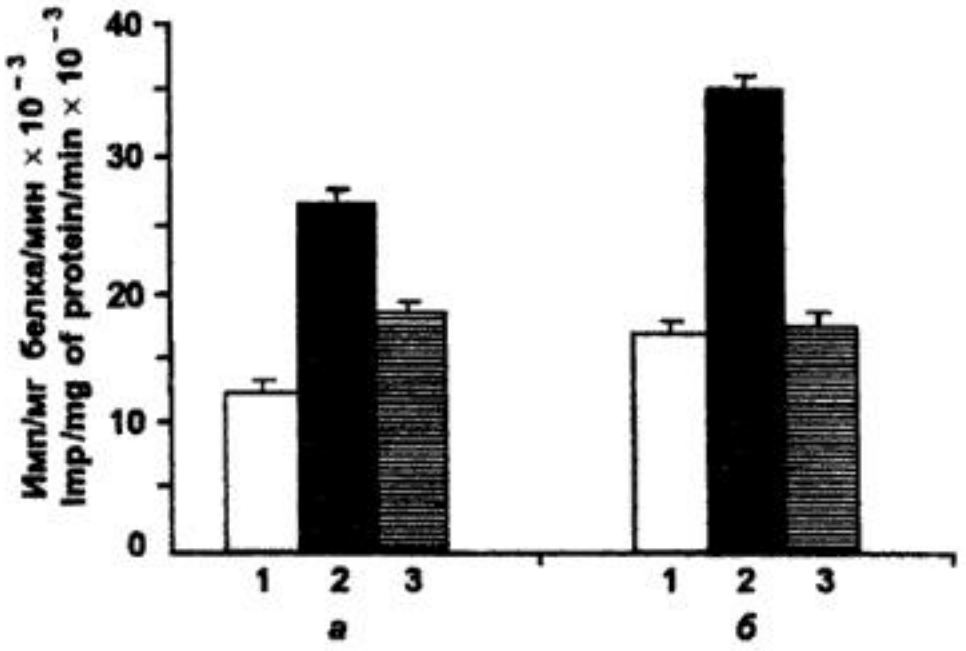


Рис. 1. Уровень синтеза белка в фрагментах ткани ЦНС 17-дневных эмбрионов крысы после гипотермического хранения: *а* — кора; *б* — гипоталамус; 1 — контроль; 2 — через сутки ГХ; 3 — через 5 сут ГХ.

Fig. 1. The level of protein synthesis in CNS tissue fragments of rat's 17-days embryos after hypothermal storage: *a* — cortex; *б* — hypothalamus; 1 — the control; 2 — in a day of HS; 3 — in 5 days of HS.

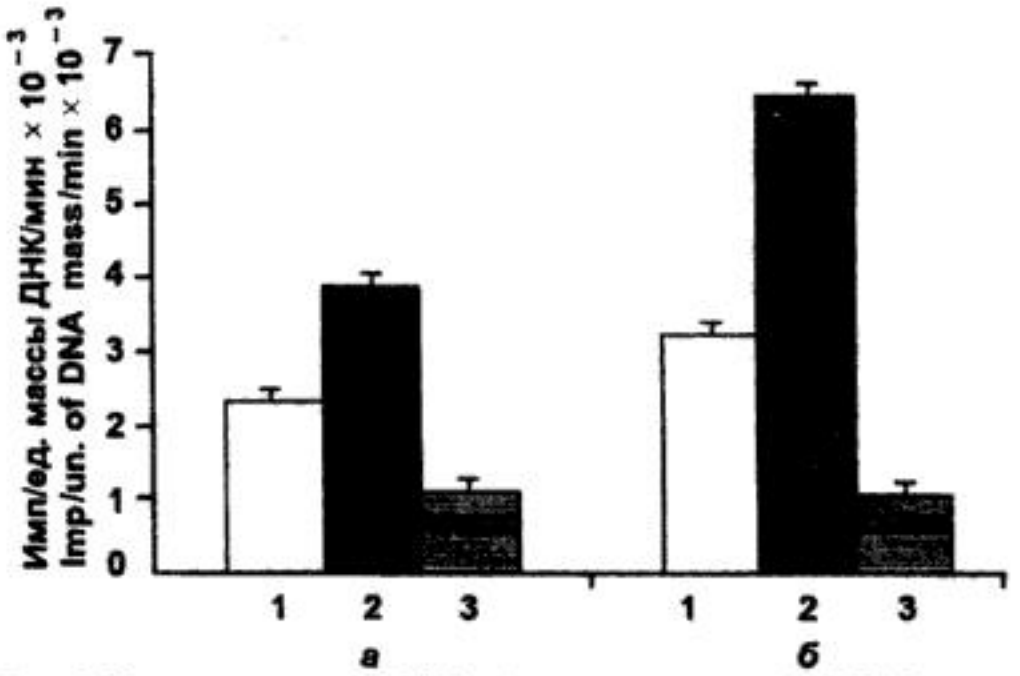


Рис. 2. Уровень синтеза ДНК в фрагментах ткани ЦНС 17-дневных эмбрионов крысы после гипотермического хранения: *а* — кора; *б* — гипоталамус; 1 — контроль; 2 — через сутки ГХ; 3 — через 5 сут ГХ.

Fig. 2. The level of DNA synthesis in CNS tissue fragments of rat's 17-days embryos after hypothermal storage: *a* — cortex; *б* — hypothalamus; 1 — the control; 2 — in a day of HS; 3 — in 5 days of HS.

прекращается. Известно, что максимальный уровень синтеза ДНК предшествует значительному усилению митотического деления, что является необходимым условием для успешного приживления трансплантата, следовательно, изучаемые структуры эмбрионального мозга и через сутки после ГХ при 4 °С сохраняют свою пролиферативную способность.

В следующей серии экспериментов нами было оценено функциональное состояние фрагментов ЭНТ коры и гипоталамуса (нативных и после гипотермического хранения в течение 1 и 5 сут) путем трансплантации половозрелым крысам. Значение введения трансплантации в арсенал современных научных методов для решения ряда важных теоретических вопросов очевидно. Не обладая аналитическими возможностями методов органотипических и диссоциированных структур нервной ткани, трансплантация удачно дополняет их, позволяя исследовать длительно живущие, изолированные от мозговых структур или взаимодействующие с ними нервные клетки. Этот метод позволяет подойти к проблеме изучения самоорганизации мозга, степени специфичности устанавливаемых связей, выявления генетически обусловленных и зависящих от внешних влияний факторов в развитии нервных структур. Метод дает возможность изучить динамику развития взаимодействий между зрелым мозгом и трансплантированной ЭНТ, оценить функциональное значение такого взаимодействия. Экспериментально была подтверждена возможность межвидовых трансплантаций нервной ткани в мозг с нормальным развитием, не ограниченным сохранением и функционированием нервных клеток трансплантата [4, 7].

Вероятно, существенную роль в выживании нервной ткани может играть ее способность восстанавливать при трансплантации гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Из данных [1, 5, 9] видно, что в трансплантатах нервной ткани, развивающихся в

solving a number of theoretical tasks is evident. Not possessing the analytic possibilities of the methods of organotypical and dissociated structures of nerve tissue, the transplantation successfully adds to them, allowing to investigate the living for a long time, isolated brain structures or interacting with them nerve cells. This method allows to approach to the problem of study of brain self-organization, the specificity degree of established relations, revealing the genetically stipulated and depending on external effects factors in the development of nerve structures. The method gives the possibility to study the development dynamics between mature brain and transplanted ENT, to estimate a functional value of such interaction. The possibility of nerve tissue transplantation between species into the brain with normal development, not limited by preserving and functioning a transpant's nerve cells [4, 7] was experimentally confirmed.

Probably, a considerable role in nerve tissue survival may play its capability to recover the blood brain barrier (BBB) during transplantation. It is seen from the data [1, 5, 9], that in nerve tissue transplants, developing in brain, the capillaries with all typical caracteristics of barier vessels are revealed. In the works, devoted to electrone microscopic investigations of ENT transplants in an anterior eye chamber [17, 18] it has been demonstrated that growing from iris of the eye capillaries in the central part of a transplant with a high density of nerve elements have all structural peculiarities of typical brain barrier: smooth-contour vessels, formed by tight adjacent and overlaping bodies and outgrowth of endotheliocytes with tight contacts between them, surrounded by a dense basal membrane and perivascular glia, deprived of an external collagenic membrane. In the cell aggregates of conjunctive tissue, that are formed at the base of the transplants in an anterior chamber of the eye, the vessels branching have the character of highly

Матеріал, захищений авторським правом

мозге, обнаруживаются капилляры со всеми типичными характеристиками барьерных сосудов. В работах, посвященных электронно-микроскопическим исследованиям трансплантатов ЭНТ в передней камере глаза [17, 18], показано, что в этом случае вырастающие из радужной оболочки капилляры в центральной части трансплантата с высокой плотностью нервных элементов имеют все структурные особенности типичных мозговых барьеров: гладкоконтурные сосуды, образованные тесно прилегающими и перекрывающимися телами и отростками эндотелиоцитов с плотными контактами между ними, окруженные плотной базальной мембраной и периваскулярной глией, лишенные внешней коллагеновой оболочки. В агрегатах клеток соединительной ткани, образующихся в основании трансплантатов в передней камере глаза, ответвления сосудов имеют характер высокопроницаемых периферических капилляров, а в краевой зоне трансплантата, где количественно доминируют глиальные клетки, капилляры обладают промежуточными характеристиками [4, 5, 13, 18].

При анализе данных [1, 5, 13] установлено, что пересадка тканей других органов в мозг приводит к формированию проницаемых капилляров периферического типа и сопровождается прорывом ГЭБ, в то время как пересаженная нервная ткань индуцирует восстановление барьера, по-видимому, создавая условия, препятствующие развитию афферентного звена иммунной реакции. Возможно, с этим связано приживление нейронов при аллотрансплантации в периферической ткани.

Трансплантация должна проводиться на стадии, когда ткань уже детерминирована. Ее развитие всегда идет соответственно происхождению, а не месту пересадки. В мозге реципиента трансплантированная ЭНТ дифференцируется, вступает в интегральную связь с нервной тканью хозяина [1, 4, 6]. Дифференциация нейробластов выражается в появлении нейрофибрилл, увеличении размеров ядра, в очень активном росте отростков и в ограничении способности к делению. Критерием дифференциации нейронов являются образование вещества Ниссля и синаптических контактов, миелинизация нервных волокон и появление биоэлектрической активности [1, 4, 11, 16, 17].

К настоящему времени в переднюю камеру глаза и головной мозг были трансплантированы почти все основные структуры головного мозга. При гистологическом изучении трансплантатов всегда выявляются нейроны, характеристики которых соответствуют типовым клеточным элементам структуры-донора. При электронно-микроскопическом исследовании трансплантатов в них обнаруживаются нормальные синаптические контакты различных типов. Наконец, нейроны сохраняют и воспроизводят свои биохимические характеристики: клетки locus coeruleus синтезируют норадреналин, клетки ядер шва — серотонин, клетки substan-

permeabile peripheric capillaries, but in the transplant edge zone, where glial cells quantitatively predominate, the capillaries have intermediate characteristics [4, 5, 13, 18].

When analyzing the data [1, 5, 13] it has been established that the transplantation of tissues of other organs into a brain results in the formation of peripheric type permeabile capillaries and is accompanied with BBB break, meanwhile the transplanted nerve tissue induces the barrier recovery, apparently by creating the conditions, preventing from the development of immune reaction afferent link. Probably the neurons survival at the allotransplantation in a peripheric tissue is related to this fact.

The transplantation should be accomplished at the stage, then the tissue has already been determined. Its development always occurs according to the origin, but not to the grafting place. In a recipient's brain the transplanted ENT is differentiated, starts to an integral interaction with a host' nerve tissue [1, 4, 6]. The neuroblast differentiation is manifested in neurofibrillae appearance, an increase in nucleus dimensions, very active outgrowths growing and the limitation of the capability to fission. The formation of Nissl substance and synaptic contacts, myelinization of nerve fibers and the appearance of bioelectrical activity are the criteria of neuron differentiation [1, 4, 11, 16, 17].

To the present time almost all main brain structures were transplanted into an anterior chamber of the eye and a brain. The neurons, whose characteristics correspond to the typical cellular elements of a structure-donor are always revealed at the transplants histological study. At the transplants electron and microscopical study, the normal synaptic contacts of different types are revealed in them. At last, neurons preserve and reproduce their biochemical characteristics — locus coeruleus cells synthesize norepinephrine, cells of nucleus raphe — serotonin, substantia nigra — dopamine, septum cells — acetylcholine, hypothalamus cells — vasopressin and other neuropeptides [2]. Thus, as it is noted in [1, 4, 6, 16, 18] the morphogenesis and transplanted ENT development mainly continue as it remained *in situ*.

It has been noted, that for synapsis normal functioning the system, providing a neuromediator effect rapid ceasing (ST and NE are removed from a synaptic slit by means of a uptake) is necessary. It is of common knowledge, that in hypothalamus the neurons, synthesizing ST and NE are absent, and all serotoninergic neurons come into a hypothalamus from a nucleus seam, but norepinergic ones — from a locus coeruleus. Therefore, in order to judge on specific interneuronal relationship recovery between a recipient's brain and ENT tranplanted site, the uptake level of labelled by tritium ST and NE by synaptosomes, isolated from a transplant, was studied. The experiments results have demonstrated, that the uptake of these neuromediators occurs (Fig. 3 and 4), in this case at the same level, that in the animals of the control group. The

Матеріал, захищений авторським правом

tia nigra — дофамин, клетки септума — ацетилхолин, клетки гипоталамуса — вазопрессин и другие нейропептиды [2]. Таким образом, как указано в [1, 4, 6, 16, 18], морфогенез и развитие трансплантированной ЭНТ в основном продолжается так, как будто она осталась *in situ*.

Отмечено, что для нормального функционирования синапса необходима система, обеспечивающая быстрое прекращение действия нейромедиатора на постсинаптическую мембрану (СТ и НА удаляются из синаптической щели путем обратного захвата). Известно, что в гипоталамусе отсутствуют нейроны, синтезирующие СТ и НА, и все серотонинергические нейроны поступают в гипоталамус из ядер шва, а норадренергические — из голубого пятна. Поэтому, чтобы судить о восстановлении специфических межнейрональных связей между мозгом реципиента и трансплантированным участком ЭНТ, был изучен уровень захвата меченых по тритию СТ и НА синаптосомами, выделенными из трансплантата. Результаты экспериментов показали, что захват этих нейромедиаторов происходит (рис. 3 и 4), причем на том же уровне, что и у животных контрольной группы. Добавление в среду инкубации ингибитора нейронального захвата СТ — имипрамина, а в случае НА — дезимипрамина приводит к существенному подавлению этого процесса, что свидетельствует о специфическом захвате ^{3}H-СТ и ^{3}H-НА синаптосомами. При разрушении ПГТ специфического захвата не наблюдалось (рис. 3 и 4). Следовательно, трансплантация участков гипоталамуса 17-дневных эмбрионов после ГХ в течение суток приводит к полной компенсации снижения захвата изучаемых нейромедиаторов. Трансплантация через 5 сут хранения ЭНТ способствовала восстановлению этого процесса на 30%.

Для изучения способности нейронов нативного трансплантата коры ЭНТ, а также после ГХ устанавливать специфические межнейрональные си-

addition into the incubation medium of ST neuronal uptake inhibitor — imipramine, and in the case of NE — desimipramine results in a considerably supression of this process, that festifies to a specific uptake of ^{3}H-ST and ^{3}H-NE by synaptosomes. At the AHT destruction a specific uptake was not observed (Fig. 3 and 4). Consequently, the transplantation of hypothalamus sites of 17-days embryos after HS within 1 day results in a complete compensation of a uptake decrease in studied neuromediators. The ENT transplantation in 5 days of the storage contributed to this process recovery by 30%.

For studying the capability of neurons of ENT cortex native transplant, as well as after HS to set specific interneuronal synaptic relations with a recipient's brain, the transplantation of ENT cortex sites into a destructed earlier area of a sensomotoric cortex of mature rats was accomplished.

At the destruction of brain sensomotoric cortex the impairment of neurochemical processes in striatum occurs, a sodium-dependent highly affinic process of glutamate and aspartate uptake by striatum synaptosomes reduces. The study of ^{3}H-D-asparaginic acid uptake by synaptosomes, isolated from srtiatum after ENT transplantation into the area of a destructed sensomotoric cortex allowed to evaluate the recovery degree of specific interneuronal relations between a transplant and a host's brain (Fig. 5).

The uptake of ^{3}H-D-asparaginic acid by synaptosomes, isolated from the striatum, that is ipsilaterally located to a destorted area ofa sensomotoric cortex, was 60% lower than the uptake level in the control striatum. The transplantation of both native ENT and after HS contributed to a complete compensation of a uptake decrease in ^{3}H-D-asparaginic acid, that points to the recovery of aspartate/glutamatergic transmission in a striatum.

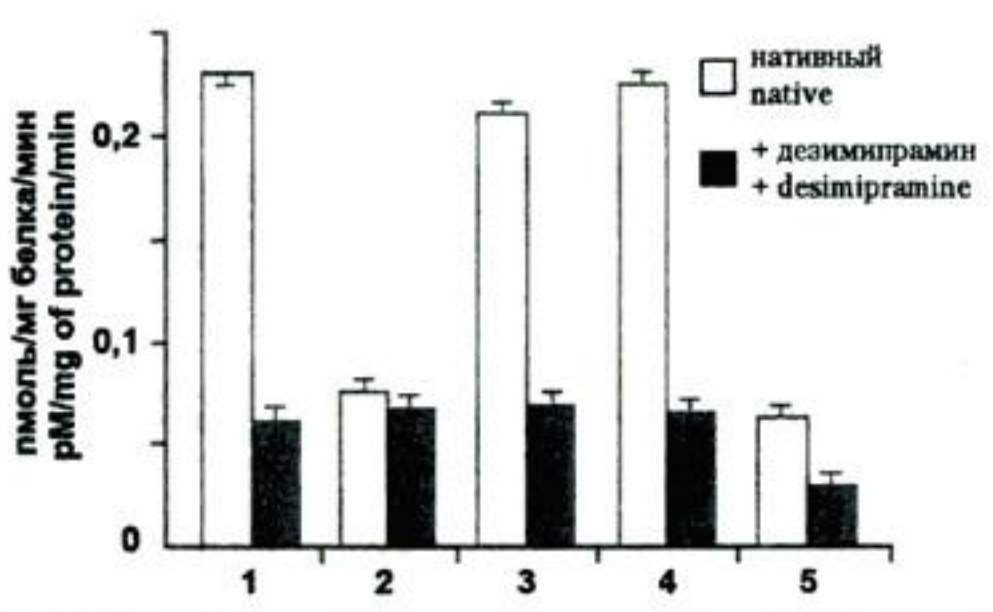


Рис. 3. Захват ^{3}Н-норадреналина синаптосомами ЭНТ гипоталамуса после гипотермического хранения и трансплантации: 1 — контроль; 2 — разрушение ПГТ; 3 — трансплантация нативной ЭНТ; 4 — трансплантация ЭНТ после суток ГХ; 5 — трансплантация ЭНТ после 5 сут ГХ.

Fig. 3. ^{3}H-norepinephrine uptake by synaptosomes of hypothalamus ENT after hypothermal storage and transplantation: 1 — the control; 2 — AHT destruction; 3 — native ENT transplantation; 4 — ENT transplantation after a day of HS; 5 — ENT transplantation after 5 days of HS.

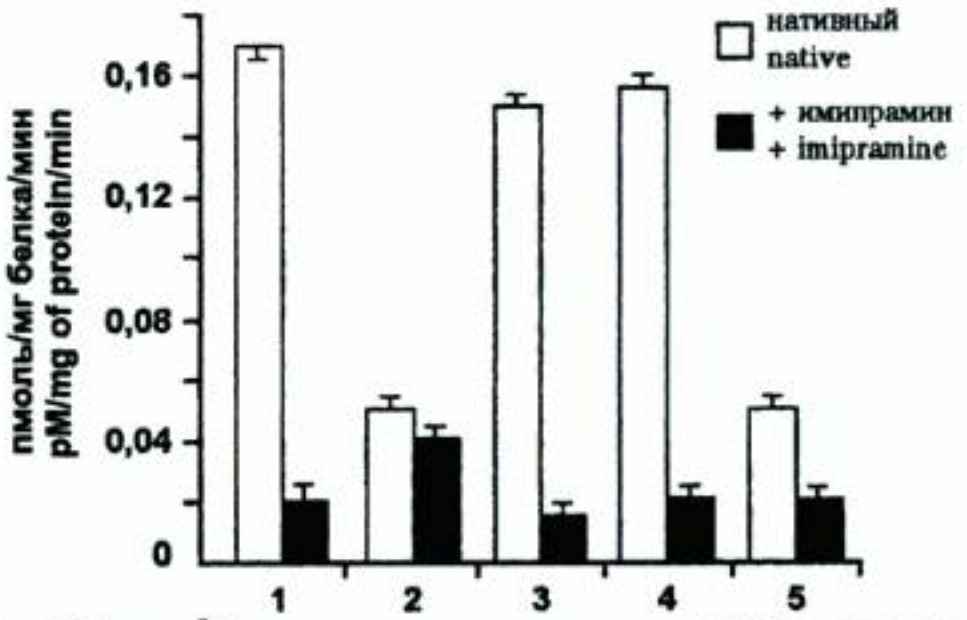


Рис. 4. Захват ^{3}Н-серотонина синаптосомами ЭНТ гипоталамуса после гипотермического хранения и трансплантации: 1 — контроль; 2 — разрушение ПГТ; 3 — трансплантация нативной ЭНТ; 4 — трансплантация ЭНТ после суток ГХ; 5 — трансплантация ЭНТ после 5 сут ГХ.

Fig. 4. ^{3}H-serotonine uptake by synaptosomes of hypothalamus ENT after hypothermal storage and transplantation: 1 — the control; 2 — AHT destruction; 3 — native ENT transplantation; 4 — ENT transplantation after a day of HS; 5 — ENT transplantation after 5 days of HS.

Матеріал, захищений авторським правом

наптические связи с мозгом реципиента была проведена трансплантация участков коры ЭНТ в ранее разрушенную область сенсомоторной коры половозрелых крыс.

При разрушении сенсомоторной коры головного мозга происходит нарушение нейрохимических процессов в стриатуме, уменьшается натрий-зависимый высокоаффинный процесс захвата глутамата и аспартата синаптосомами стриатума. Изучение захвата ^{3}Н-Д-аспарагиновой кислоты синаптосомами, выделенными из стриатума после трансплантации ЭНТ в область разрушенной сенсомоторной коры, позволило оценить степень восстановления специфических межнейрональных связей между трансплантатом и мозгом хозяина (рис. 5).

Захват ^{3}Н-Д-аспарагиновой кислоты синаптосомами, выделенными из стриатума, который расположен ипсилатерально разрушенной области сенсомоторной коры, был на 60% ниже уровня захвата в контрлатеральном стриатуме. Трансплантация как нативной ЭНТ, так и после ГХ способствовала полной компенсации снижения захвата ^{3}Н-Д-аспарагиновой кислоты, что указывает на восстановление аспартат/глутаматергической синаптической передачи в стриатуме.

Таким образом, трансплантация нативных и хранившихся при 4 °С в течение суток фрагментов коры и гипоталамуса 17-дневных эмбрионов крысы способствует восстановлению синаптической передачи в мозге крысы-реципиента после разрушения сенсомоторной области коры и переднего гипоталамуса. Процесс восстановления, по-видимому, идет за счет прорастания аксонов из трансплантата в мозг хозяина, а также за счет отростков на оставшихся неповрежденными аксонах под воздействием нейротрофических факторов, выделившихся при разрушении областей мозга.

Следовательно, разработанный способ гипотермического хранения (4 °С) ЭНТ обеспечивает высокий процент приживления (90%) и восстановления утраченных функций после ее трансплантации реципиенту. Установлен оптимальный срок хранения ЭНТ, биологическая полноценность которой определяется по способности синтезировать белок и ДНК, что может служить адекватным методом предварительной оценки жизнеспособности *in vitro* фрагментов ЭНТ. Впервые показана возможность восстановления синаптических процессов, в частности, высокоаффинного обратного захвата нейромедиаторов трансплантатом как нативной ЭНТ, так и после гипотермического хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Александрова М. А., Лосева Е. В., Ермакова И. В.* Поведение эмбриональных нервных клеток, трансплантированных в мозг // Онтогенез.– 1993.– 24, № 5.– С. 43–50.
2. *Аникин А. Ю., Козлова М. В., Блитченко Ю. А. и др.* Опиоидные пептиды увеличивают выживаемость нервной ткани плода человека после криопрезервации в

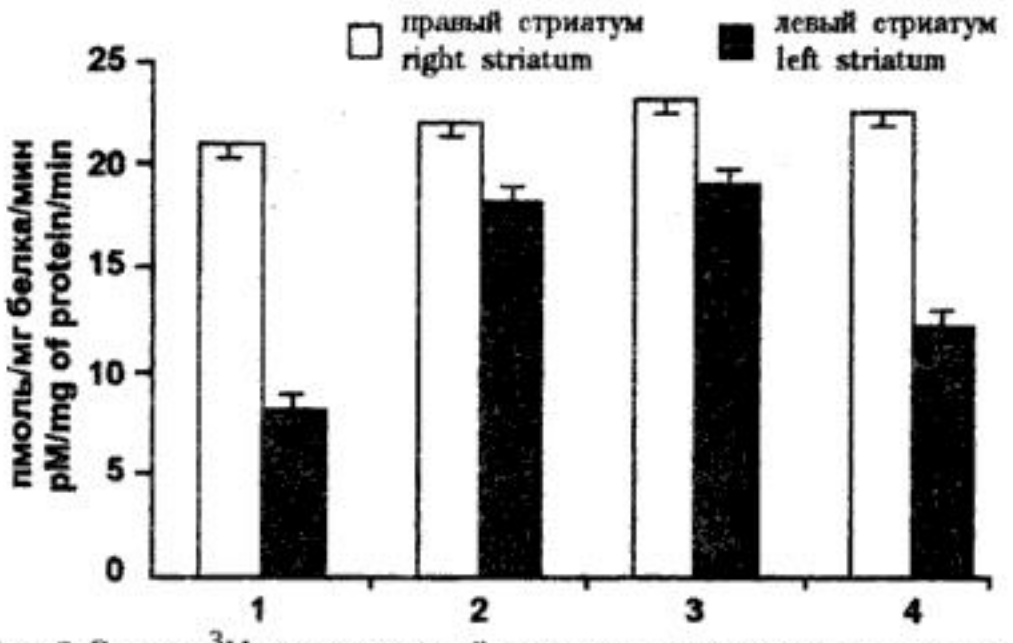


Рис. 5. Захват ^{3}Н-аспарагиновой кислоты синаптосомами, выделенными из стриатума после трансплантации ЭНТ в область разрушенной сенсомоторной коры, гипотермического хранения и трансплантации: 1 – разрушение сенсомоторной области коры; 2 – трансплантация нативной ЭНТ; 3 – трансплантация ЭНТ после суток ГХ; 4 – трансплантация ЭНТ после 4–5 сут ГХ.

Fig. 5. ^{3}H-asparaginic acid uptake by synaptosomes, isolated from striatum after ENT transplantation in the area of a destorted sensomotoric cortex, hypothermal storage and transplantation: 1 – destruction of the cortex sensomotoric area; 2 – native ENT transplantation; 3 – ENT transplantation after a day of HS; 4 – ENT transplantation after 4–5 days of HS.

Thus, the transplantation of native and stored at 4 °C within a day fragments of cortex and hypothalamus of 17-days rat's embryos contributes to the recovery of a synaptic transmission in a rat-recipient' brain after destruction of cortex and anterior hypothalamus sensomotoric area. The recovery process apparently occurs due to the axones growing up from a transplant into a host's brain, as well as due to the outgrowths in the axones, remained undamaged under the effect of neurothrophic factors, released during the brain area destruction.

Consequently, the developed method of ENT hypothermal storage (4 °C) provides a high percentage of retention (90%) and lost functions recovery after its transplantation to a recipient. An optimal term of ENT storage, whose biological integrity is determined according to the capability tp synthesize protein and DNA was established, that can serve as an adequate method of a preliminary evaluation of in vitro viability of ENT fragments. For the first time the possibility of synaptic processes recovery, in particular, a highly affinic uptake of neuromediators by a transplant of both native and after hypothermal storage ENT.

REFERENCES

1. *Aleksandrova M. A., Loseva E. V., Ermakova I. V.* Bihaviour of embryonic nerve cells, transplanted into a brain // Ontogenesis.– 1993.– 24, № 5.– P. 43–50.
2. *Anikin A. Yu., Kozlova M. V., Blitchenko Yu. A. et al.* Opioid peptides increase the survival of human fetus nerve tissue after cryopreservation in a culture // Bull. of experimental biology and medicine.– 1994.– № 4.– P. 408–411.
3. *Kulakov V. I., Sukhikh G. T., Molnar E. M.* Human fetal tissue transplantation: the problem state analysis and development perspectives // Human fetal tissue and cell transplantation.– M., 1996.– P. 5–9.
4. *Polezhayev L. V., Aleksandrova M. A., Vitvitskiy V. N., Cherkasova L. V.* Brain tissue transplantation in biology and medicine.– M., 1993.– 239 p.

Матеріал, захищений авторським правом

культуре // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1994.– № 4.– С. 408–411.
3. *Кулаков В. И., Сухих Г. Т., Молнар Е. М.* Трансплантация фетальных тканей человека: анализ состояния проблемы и перспективы развития // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека.– М., 1996.– С. 5–9.
4. *Полежаев Л. В., Александрова М. А., Витвицкий В. Н., Черкасова Л. В.* Трансплантация ткани мозга в биологии и медицине.– М., 1993.– 239 с.
5. *Сабурина И. Н.* Трансплантация эмбриональной нервной ткани ускоряет восстановление нарушенного после действия гипоксии гемато-энцефалического барьера крыс // Докл. АН СССР.– 1989.– 306, № 5.– С. 1242–1246.
6. *Савельев С. В.* Трансплантация эмбриональной ткани мозга // Архив патологии.– 1992.– 54, № 11.– С. 43–46.
7. *Савельев С. В., Корочкин Л. И., Иванов А. И. и др.* Трансплантация эмбриональных нервных клеток насекомых в мозг амфибий и млекопитающих // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1994.– № 4.– С. 364–368.
8. *Савельев С. В., Лебедев В. В., Войтына С. В. и др.* Трансплантация фетальной и ксеногенной нервной ткани при болезни Паркинсона // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1994.– № 4.– С. 369–372.
9. *Albert E. N., Das G. D.* Neocortical transplants in the rat brain: an ultrastructural study// Experentia.– 1984.– 40.– P. 294–298.
10. *Bures J., Petran M., Zachar J.* Electrophysiological methods in biological research.– N.Y.: Academic press, 1967.– 456 p.
11. *Goheen B. L., Kott J. N., Westrum L. E.* Tyrosine hydroxylase expression in rat olfactory bulb transplants: an electron microscope study // Synapse.– 1996.– 23, № 3.– P. 132–141.
12. *Humpel C., Bygdeman M., Olson L., Stromberg H.* Human fetal cortical tissue fragments survive grafting following one week storage at +4 degrees C // Cell Transplant.– 1994.– 3, № 6.– P. 475–479.
13. *Isenmann S., Brandner S., Kuhne G. et al.* Comparative *in vivo* and pathological analysis of the blood-brain barrier in mouse telencephalic transplants. // Neuropathol. Appl. Neurobiol.– 1996.– 22, № 2.– P. 118–128
14. *Jensen S., Sorensen T., Zimmer J.* Cryopreservation of fetal rat brain tissue later used for intracerebral transplantation // Cryobiology.– 1987.– 24, № 2.– P. 120–134.
15. *Kondoh T., Pundt L. L., Blount J. P. et al.* Transplantation of human fetal tissue from spontaneous abortions to a rodent model of Parkinson's disease // Cell Transplant.– 1996.– 5, № 1.– P. 69–75.
16. *Mahalik T., Finger T., Stromberg H., Olson L.* Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections// Comp. Neurology. - 1985.– 240.– P. 60-70.
17. *Morin F., Crevier C., Bouvier G. et al.* A fixation procedure for ultrastructural investigation of synaptic connections in resected human cortex // Brain Res Bull.– 1997.– 44, № 2.– P. 205–210.
18. *Olson L., Bjorklund H., Palmer M., Hoffer B.* Brain transplants in oculo: anatomical and physiological insights // Neural Graffing in the Mammalian CNS / Ed. by H. Bjorklund and U. Stenevi.– Elsevier Science Publ., 1985.– P. 365–387.
19. *Thajeb P., Ling Z. D., Potter E. D., Carvey P. M.* The effects of storage conditions and trophic supplementation on the survival of fetal mesencephalic cells // Cell Transplant.– 1997.– 6, № 3.– P. 297–307.
20. *Woerly S., Marassutti D. J.* New aspects of neurotransplantation // Neurosurg.– 1993.– 16, № 2.– P. 93–104.

Поступила 30.03.99

5. *Saburina I. N.* Embryonic nerve tissue transplantation accelerates the recovery of impaired after hypoxy effect rats' brain-blood-barrier // Reports of the Academy of Sciences of USSR.– 1989.– 306, № 5.– P. 1242–1246.
6. *Saveliev S. V.* Brain embryonic tissue transplantation // Pathology archives.– 1992.– 54, № 11.– P. 43–46.
7. *Saveliev S. V., Korochkin L. I., Ivanov A. I. et al.* Insect embryonic nerve cell transplantation into amphibian and mammalian brain // Bull. of experimenatal biology and medicine.– 1994.– № 4.– P. 364–368.
8. *Saveliev S. V., Lebedev V. V., Vojtyna S. V. et al.* Fetal and xenogenic nerve tissue transplantation at the Parkinson's diseas // Bull. of experimental biology and medicine.– 1994.– № 4.– P. 369–372.
9. *Albert E. N., Das G. D.* Neocortical transplants in the rat brain: an ultrastructural study// Experentia.– 1984.– 40.– P. 294–298.
10. *Bures J., Petran M., Zachar J.* Electrophysiological methods in biological research.– N.Y.: Academic press, 1967.– 456 p.
11. *Goheen B. L., Kott J. N., Westrum L. E.* Tyrosine hydroxylase expression in rat olfactory bulb transplants: an electron microscope study // Synapse.– 1996.– 23, № 3.– P. 132–141.
12. *Humpel C., Bygdeman M., Olson L., Stromberg H.* Human fetal cortical tissue fragments survive grafting following one week storage at +4 degrees C // Cell Transplant.– 1994.– 3, № 6.– P. 475–479.
13. *Isenmann S., Brandner S., Kuhne G. et al.* Comparative *in vivo* and pathological analysis of the blood-brain barrier in mouse telencephalic transplants. // Neuropathol. Appl. Neurobiol.– 1996.– 22, № 2.– P. 118–128
14. *Jensen S., Sorensen T., Zimmer J.* Cryopreservation of fetal rat brain tissue later used for intracerebral transplantation // Cryobiology.– 1987.– 24, № 2.– P. 120–134.
15. *Kondoh T., Pundt L. L., Blount J. P. et al.* Transplantation of human fetal tissue from spontaneous abortions to a rodent model of Parkinson's disease // Cell Transplant.– 1996.– 5, № 1.– P. 69–75.
16. *Mahalik T., Finger T., Stromberg H., Olson L.* Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections// Comp. Neurology. - 1985.– 240.– P. 60-70.
17. *Morin F., Crevier C., Bouvier G. et al.* A fixation procedure for ultrastructural investigation of synaptic connections in resected human cortex // Brain Res Bull.– 1997.– 44, № 2.– P. 205–210.
18. *Olson L., Bjorklund H., Palmer M., Hoffer B.* Brain transplants in oculo: anatomical and physiological insights // Neural Graffing in the Mammalian CNS / Ed. by H. Bjorklund and U. Stenevi.– Elsevier Science Publ., 1985.– P. 365–387.
19. *Thajeb P., Ling Z. D., Potter E. D., Carvey P. M.* The effects of storage conditions and trophic supplementation on the survival of fetal mesencephalic cells // Cell Transplant.– 1997.– 6, № 3.– P. 297–307.
20. *Woerly S., Marassutti D. J.* New aspects of neurotransplantation // Neurosurg.– 1993.– 16, № 2.– P. 93–104.

Accepted in 30.03.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 595.773.4: 577.112.083

UDC 57.043: 595.773.4: 577.112.083

Индукция стресс-белков в течение восстановительного периода после гипотермического воздействия у *Drosophila melanogaster*

А. А. ЦУЦАЕВА, Л. Г. СЕВРЮКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Induction of Stress-Proteins During Recovering Period After Hypothermic Effect in *Drosophila melanogaster*

A. A. TSUTSAYEVA, L. G. SEVRYUKOVA

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

Изучали влияние холодового шока на динамику синтеза стресс-белков в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *Drosophila melanogaster*. В спектр вновь синтезированных белков входили белки с молекулярной массой 70, 62, 57, 35, 15 кДа. Белок 70 кДа был минорным. Его синтез начинался через 20 мин после экспозиции в условиях нормотермии, максимум регистрировался на 40–50-й минуте, другие белки появлялись спустя 8 мин. Максимум синтеза белков 35, 15 кДа регистрировался через 35 мин, а 62 и 57 кДа — спустя 50 мин. Синтез белков, индуцированных гипотермическим воздействием, прекращался после 60 мин экспозиции в условиях нормотермии. Был проведен вестерн-блоттинг с последующим иммуноферментным анализом (ИФА). Обнаружен синтез белка из семейства БТШ70 с молекулярной массой 70 кДа в ответ на холодовой шок.

Вивчали вплив холодового шоку на динаміку синтезу стрес-білків у клітинах слинних залоз 5-добових личинок *Drosophila melanogaster*. До спектру новосинтезованих білків належали білки з молекулярною масою 70, 62, 57, 35, 15 кДа. Білок 70 кДа був мінорним. Синтез білка 70 кДа починався через 20 хв після експозиції в умовах нормотермії, а максимум реєструвався на 40–50-й хвилині, інші білки з'являлись після 8 хв. Максимум синтезу білків 35, 15 кДа реєструвався після 35 хв, а 62 і 57 кДа — після 50 хв. Синтез білків припинявся після 60 хв експозиції в умовах нормотермії. Було зроблено вестерн-блотінг з подальшим імуноферментним аналізом (ІФА). Виявлено синтез білка з родини БТШ70 з молекулярною масою 70 кДа у відповідь на холодовий шок.

The effect of cold shock on the dynamics of stress-proteins synthesis in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster* 5-days' larvae has been studied. Proteins with the 70, 62, 57, 35, 15 kDa molecular mass were in the spectrum of newly synthesized proteins. 70 kDa protein was minor. Its synthesis began in 20 min of the exposure under normothermia conditions, maximum was recorded to 40th min, other proteins appeared in 8 min. Synthesis maximum of 35, 15 kDa proteins was recorded in 35 min, and synthesis maximum of 62, 57 kDa ones — in 50 min. Synthesis of induced by hypothermic effect proteins ceasedin 60 min of exposure under normothermia conditions. Western-blotting with further immune-enzymic analysis (IEA) has been carried-out. Synthesis of 70 kDa protein of cold shock proteins (CSP) family in response to a cold shock has been revealed.

Белки теплового шока (БТШ) являются универсальным ответом биологических систем на многие стрессорные воздействия: гипотермию, тяжелые металлы и разные химические вещества [7, 11–13]. БТШ также синтезируются на ранних стадиях развития дрозофилы (при формировании клеточной бластодермы), морских ежей (при дроблении бластулы), мышей (на стадии морулы/бластоциста), лягушек (на стадии бластулы/ранней гаструлы) [7]. Синтезированные БТШ отличаются высокой степенью гомологичности у организмов с различным уровнем организации (микроорганизмы, растения, насекомые, млекопитающие) [5, 7, 11– 13].

Было показано, что в клетках *E. coli* и *Neurospora crassa* после криоконсервирования индуцируется синтез стресс-белков [6, 9, 14], после гипотермии обнаружен синтез БТШ70 и мРНК БТШ25 в неонатальных кардиомицетах крысы [10], БТШ72 и БТШ90 — в человеческих кератиноцитах [8], БТШ70 и БТШ83 — у *Drosophila auraria* в течение восстановительного периода после кратковременной гипотермии [15].

Цель данной работы — изучение динамики синтеза стресс-белков в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster* после воздействия

Cold shock proteins (CSP) are universal responses of biological systems to different stress effects: hypothermia, heavy metals and different chemical substances [7, 11–13]. CSP are synthesized also at different stages of development: in drosophila (when forming cellular blastoderm), in sea-urchins (during blastula fission), in mice (at the stage of morula/blastocyst), in frogs (at the stage of blastula/early gastrula) [7]. Synthesized CSP are characterized by a high homology level in organisms with different organizational level (microorganisms, plants, insects, mammalians) [5, 7, 11–13].

It has been shown, that stress-proteins synthesis is induced in *E. coli* and *Neurospore crassa* cells after cryopreservation [6, 9, 14], after hypothermia the synthesis of CSP70 and mRNA CSP25 in rat neonatal cardiomycetes has been found [10], and the synthesis of CSP72 and CSP90 has been revealed in human keratocytes [8], the synthesis of CSP70 and CSP83 was observed in *Drosophila auraria* during recovering process after short-term hypothermia [15].

The aim of the given work was to study the dynamics of stress-proteins synthesis in salivary gland cells of *D. melanogaster* 5-days' larvae after the effect

Матеріал, захищений авторським правом

холодового шока. В работе использовали *D. melanogaster* линии ВА из коллекции Л. З. Кайданова, отличающиеся повышенной половой активностью самцов и нормальной термоустойчивостью.

Контрольные личинки находились в пробирках при 25 °С. Опытных особей инкубировали при 0 °С в течение 17 ч. После этого их переносили в условия нормотермии (25 °С) и инкубировали в течение 120 мин. Через каждые 4 мин восстановительного периода из живых личинок в среде РМ-16 извлекали слюнные железы. Каждая проба содержала 4 пары слюнных желез. Мечение проводили 20 мин в 7 мкл среды РМ-16, содержащей либо ^{14}С-гидролизат белков, либо ^{35}S-метионин в дозе 1–2 мКu/мл или 10 мкКu на пробу.

Синтез стресс-белков в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster* определяли методом вертикального электрофореза в 12,5%-м полиакриламидном геле с ДДС-Na по Laemmly. На каждую дорожку наносили образец, содержащий 50–100 мкг белка и имеющий радиоактивность 10 мкКu.

Параллельно с образцами для определения молекулярной массы белков разгоняли ^{14}С метилированные маркеры или немеченые маркеры. Белки окрашивали кумасси синей. Гель высушивали на приборе 2000 SLAB GEL DRYER 6 ч. Высушенные гели экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 контактным способом. Авторадиограммы и гели денситометрировали на приборе "Bechman Model CDS-200".

По относительной подвижности (Rf) и молекулярной массе белков-маркеров строили калибровочные кривые (рис. 1), по которым определяли молекулярную массу вновь синтезированных белков [3]. Для их идентификации проводили вестерн-блоттинг и ИФА. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм) производили на приборе 2117 Multiphor II в течение 2 ч при 20 мВ и 6 Вт в комнате, охлаждаемой до 15 °С. Для ИФА использовали антитела I – Н7- и Н14-поликлональные антитела, полученные от кролика, к белкам семейства БТШ70, выделенным из клеток HeLa, которые реагируют с представителями семейства БТШ70 ряда млекопитающих и *D. melanogaster* (разводили 0,1 мл антител в 8–10 мл среды Хэнкса), и антитела II – антитела диагностические против иммуноглобулинов кролика, меченые пероксидазой хрена (коньюгат разводили 1:100 в среде Хэнкса). ИФА проводили по методике, описанной в [1, 2]. Субстратами ферментов выступал или 3,3-диаминобензидин тетрахлорид, или 4-хлоронафтол. Иммуноблоттограммы высушивали между листами фильтровальной бумаги и хранили в темноте.

После экспозиции в условиях гипотермии в течение 17 ч при 0 °С выживаемость личинок 5-дневного возраста составляла 98,67 ± 1,2%, а количество вылупившихся мух – 79 ± 1,5% (рис. 2).

После экспонирования в условиях нормотермии в слюнных железах личинок *D. melanogaster* в течение 8–60 мин отмечен синтез стресс-белков (рис. 3). В спектре вновь синтезированных белков определяли белки с молекулярной массой 70, 62, 57, 35, 15 кДа (рис. 1, 3). Синтез этих белков начинался неодновременно: белка 70 кДа с 20-й минуты нахождения в условиях нормотермии, максимум синтеза этого белка отмечался на 40–50-й минуте,

of cold shock. BA line *D. melanogaster* from L. Z. Kaydanov's collection, characterized by increased sexual activity in males and normal thermostability, were used in the work.

The control larvae were stored in tubes under 25 °C. Experimental ones were incubated under 0 °C during 17 hrs. Then they were transferred under normothermia conditions (25 °C) and incubated during 120 min. Salivary glands of alive larvae in PM-medium were taken in each 4 min of recovering process. Each sample contained 4 pairs of salivary glands. Labelling was carried-out during 20 min in the 7 μl PM-16 medium, containing ^{14}C-protein hydrolysate or ^{35}S-methionine in the dosage of 1–2 mKu/ml or 10 μKu per sample.

Stress-protein synthesis in salivary gland cells of 5-days' *D. melanogaster* larvae was evaluated by means of vertical electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel (PAAG) with SDS according to Laemmly. The sample, containing 50–100 μg of protein with 10 μKu radioactivity was put on each track. ^{14}C methylated markers or not labelled ones were divided in parallel with the samples for protein molecular mass evaluation. Proteins were stained by cumassie blue. Gel was dried by means of 2000 SLAB GEL DRIER device. Dried gels were exposed with PM-1 X-ray film by means of contact way. Autoradiograms and gels were densitometered by means of "Bechman Model CDS-200" device.

Calibrated curvatures (Fig. 1), according to those the molecular mass of newly synthesized proteins [3] was evaluated, were built according to relative mobility (Rf) and molecular mass of proteins-markers. Western-blotting and IEA were carried-out to indentify newly synthesized proteins. Protein transfer from gel to nitrocellulose filters (pores diameter is 0.45 μm) was conducted by means of 2117 Multiphor II during 2 hrs at 20 mV and 6 W in the room, cooled down to 15 °C. Antibodies I – H7 and H-14 polyclonal ones to CSP protein family, isolated from HeLa cells, obtained from rabbit, reacting with the representatives of the CSP70 family of different mammalians and *D. melanogaster* (0.1 ml of antibodies was diluted in 8–10 ml of Hanks' medium), and antibodies II – diagnostical antibodies against rabbit' immunoglobulin, labelled by horse-radish peroxidase (conjugate was

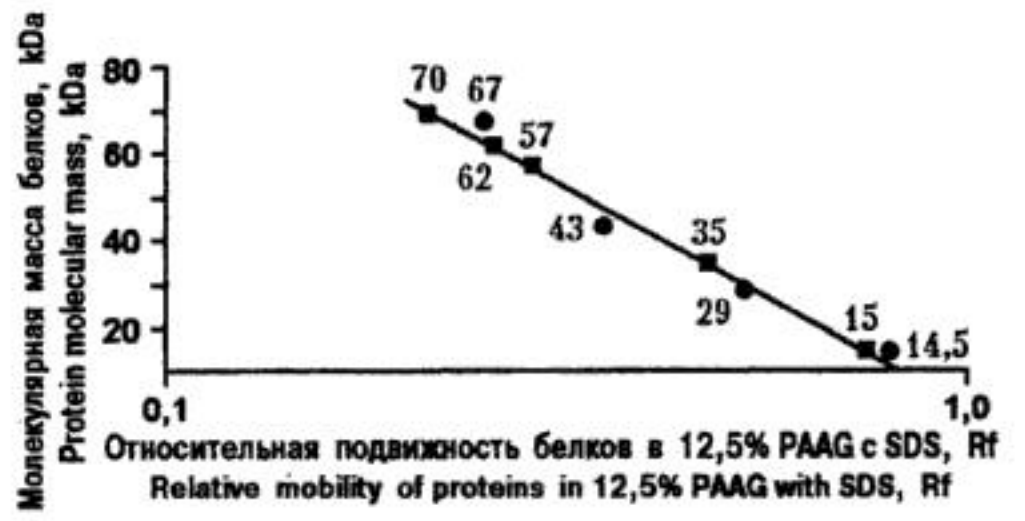


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения молекулярных масс вновь синтезируемых белков после гипотермии и периода репарации в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster*; ■ – белки, синтезированные *de novo*; ● – маркерные белки.

Fig. 1. Calibrative curvature for the evaluation of the molecular masses of newly synthesized proteins after hypothermia and reparation period in salivary gland cells of 5-days' *D. melanogaster* larvae: ■ – proteins synthesized *de novo*; ● – marker proteins.

Матеріал, захищений авторським правом

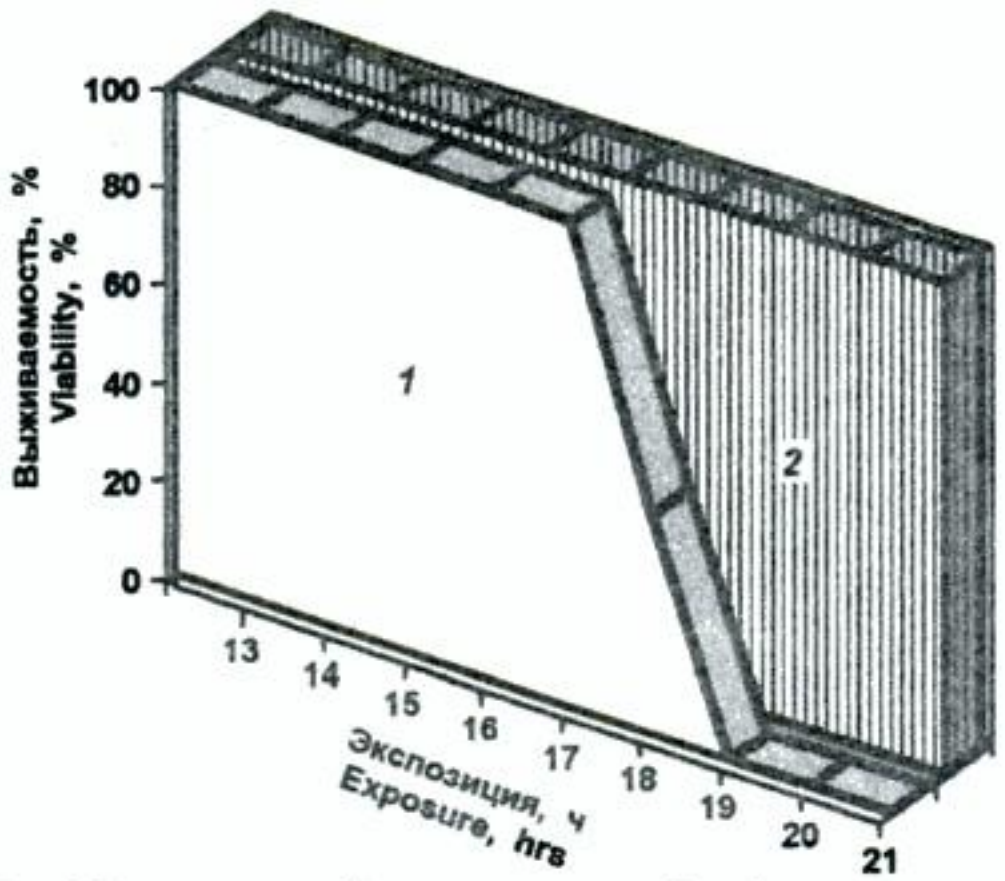


Рис. 2. Выживаемость 5-дневных личинок *D. melanogaster* линии ВА после экспозиции при 0 °С.

Fig. 2. Viability of 5-days' *D. melanogaster* larvae of BA line after the exposure under 0 °C.

спустя 60 мин этот белок в электрофоретическом спектре не определялся. Аналогичные результаты получены Burton [4], который показал, что БТШ 70 кДа синтезируется после холодового шока в слюнных железах 4-дневных личинок *D. melanogaster* спустя 20 мин после помещения их в условия нормотермии. Остальные вновь синтезированные белки появлялись после 8-й минуты экспонирования в условиях нормотермии и спустя 60 мин их синтез прекращался (рис. 3). Максимум синтеза белков 15 и 35 кДа отмечен спустя 35 мин экспонирования в условиях нормотермии, 57 и 62 кДа – спустя 50 мин. Все эти белки в спектре БТШ *D. melanogaster* не отмечаются (рис. 3).

Результаты вестерн-блоттинга с последующим ИФА показали, что в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster* белок семейства БТШ70, отмечаемый в спектре БТШ, синтезируется и под влиянием гипотермии, однако является минорным, тогда как при тепловом шоке эти белки мажорные (рис. 4).

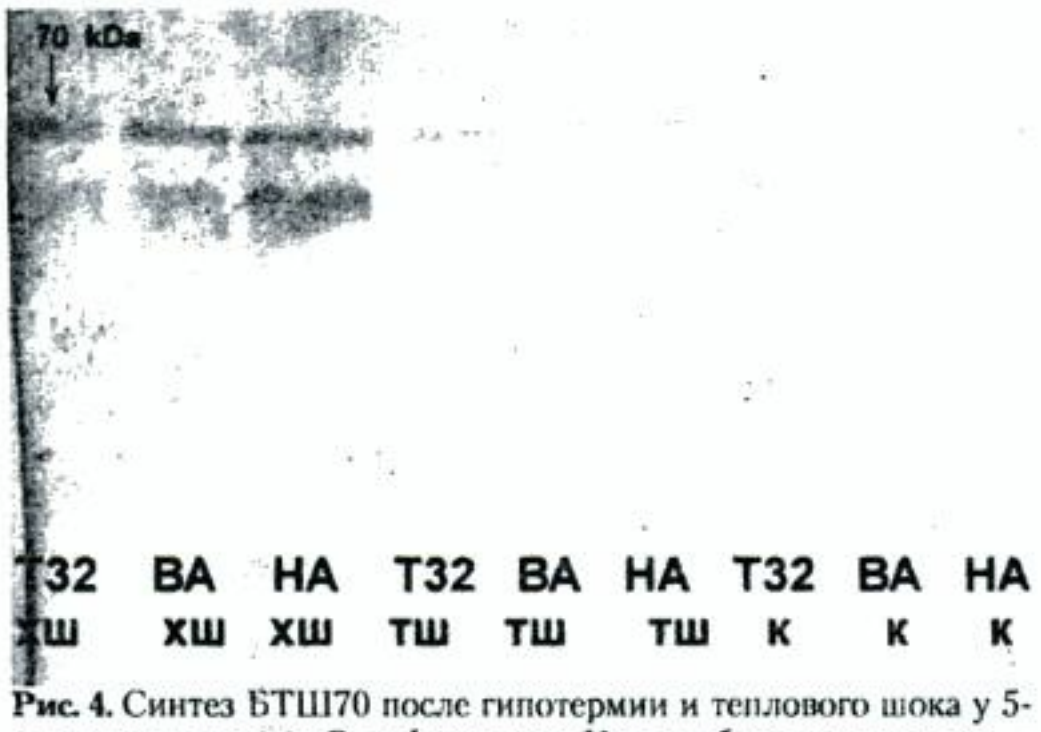


Рис. 4. Синтез БТШ70 после гипотермии и теплового шока у 5-дневных личинок *D. melanogaster*. Иммуноблотограмма. хш – холодовой шок; тш – тепловой шок; к – контроль при 25 °С.

Fig. 4. Synthesis of HSP70 after hypothermia and heat shock in 5-days' *D. melanogaster* larvae. Immunoblothogram. хш – cold shock; тш – heat shock; к – control under 25 °C.

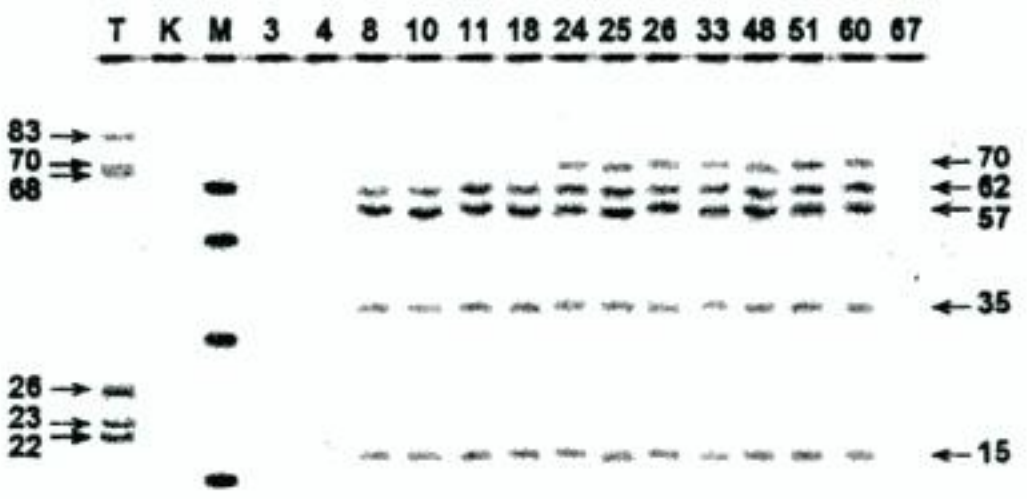


Рис. 3. Динамика синтеза стресс-белков в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster*. Авторадиограмма с геля. К – контроль при 25 °С; М – маркерные белки с известной молекулярной массой; Т – белки теплового шока; числа слева и справа – молекулярная масса вновь синтезируемых белков, кДа; числа вверху – время экспозиции в условиях нормотермии после гипотермии, мин.

Fig. 3. The dynamics of stress proteins synthesized in salivary gland cells of 5-days' *D. melanogaster* larvae. Autoradiogram. K – control under 25 °C; M – marker proteins with known molecular mass; T – heat shock proteins; numbers left and right – molecular mass of newly synthesized proteins, kDa; top numbers – exposure time under normothermia conditions after hypothermia, min.

diluted in the 1:100 ratio in Hanks' medium) have been used for IEA. IEA was conducted according to the method, described in [1, 2]. 3,3-diaminobenzydine tetrachloride or 4-chloronaphtole were enzyme substrates. Immune blottograms were dried between the sheets of filter paper and stored in a dark place.

After the exposure under hypothermia conditions during 17 hrs under 0 °C larvae viability of the third age made 98.67 ± 1.2%, and the number of hatched flies was 79 ± 1.5% (Fig. 2).

After the exposure under normothermia conditions in salivary glands of *D. melanogaster* larvae within 6–80 min CSP synthesis was noted (Fig. 3). In the spectrum of newly synthesized proteins the proteins with the molecular masses of 70, 62, 57, 35, 15 kDa (Fig. 1, 3) were determined. The synthesis of these proteins began within different time frames: 70 kDa protein synthesis began from the 20th minute of exposure under normothermia, synthesis maximum of the given protein was noted to 40–50th minutes, in 60 min this protein within electrophoresis spectrum was not determined. Burton [4] obtained analogous data, showing, that 70 kDa CSP is syntheiszed after a cold shock in salivary glands of 4-days' *D. melanogaster* larvae in 20 min after their introduction under normothermia conditions. Other newly synthesized proteins appeared after the 8th minute of exposure under normothermia conditions and in 60 min their synthesis ceased(Fig. 3). Synthesis maximum of 15 and 35 kDa proteins was noted in 35 min after the exposure under normothermia, synthesis maximum of 57 and 62 kDa ones was revealed in 50 min. All these proteins in the spectrum of *D. melanogaster* CSP are not revealed (Fig. 3).

Western-blotting results with the further IEA showed, that in salivary gland cells of 5-days' *D. melanogaster* larvae the protein of CSP70 family, being revealed in CSP spectrum, also is synthesized under hypothermia effect, but is minor one, while under a heat shock these proteins are major (Fig. 4).

Матеріал, захищений авторським правом

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что после холодового шока гибель личинок достоверно не отличается от гибели личинок в контроле, однако в клетках слюнных желез 5-дневных личинок *D. melanogaster* возникают нелетальные повреждения, которые проявляются на этапах их репарации. Индуцируется синтез семейства стресс-белков. При этом только белок с молекулярной массой 70 кДа является гомологом БТШ70, хотя он является минорным, тогда как после теплового воздействия этот белок мажорный. Остальные вновь синтезированные после гипотермического воздействия белки отличаются от семейства БТШ. Эти результаты позволяют высказать предположение, что характер нелетальных повреждений, индуцируемых под влиянием гипотермии, отличается от характера нелетальных повреждений, индуцируемых под влиянием теплового шока. Репарация нелетальных повреждений после гипотермического воздействия происходит поэтапно, чем можно объяснить определенную этапность индукции синтеза стресс-белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антитела*. Методы // Под ред. Д.Кэтти.– М.: Мир, 1991.– 1.– С. 230-237.
2. *Новое* в клонировании ДНК, -М.: Мир, 1989.– С.184-186.
3. *Электрофорез* в разделении биологических макромолекул / Пер. с англ. Под ред. В. И. Розенгарта.– М.: Мир, 1980.– С. 217–227.
4. *Burton V., Mitchell H. K., Young P.* Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Cell. Biol.– 1988.– 8, № 8.– P. 3550–3552.
5. *Graing E. A.*The heat shock response // Crit. Rev. Bioch.– 1985.– 18.– P. 239–280.
6. *Guy C. L., Vig N. P., Brambl R.* Heat shock protects germinating condiospores of *Neurospora crassa* against freezing injury // J. Bacteriol.– 1974.– 167, № 1.– P. 124–129.
7. *Heat* shock from bacteria to man / Ed. by M. J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres, 1982.– 467 p.
8. *Holland D. B, Roberts S. G., Wood E. J., Cunliffe W. J.* Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes // J. Invest Dermatol.– 1993.– 101, № 2.– P. 196–199.
9. *Jons P. G., VanBogelon R. A., Neldhardt F. C.* Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.– 1987.– 169.– P. 2092–2095.
10. *Laios E., Rebeyka I. M., Prody C. A.* Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes // Mol. Cell Biochem.– 1997.– 173, № 1–2.– P. 153–159.
11. *Lindquist S.*The heat-shock response // Ann. Rev. Bioch.– 1986.– 55.– P. 1151–1191.
12. *Petersen N. S., Mitchell H. K.* Heat shock proteins: comprehensive insect physiology, biochemestry and pharmacology // Biochemistry / Ed. by G. A. Kercut, L. I. Gilbert.– Elmsford–New-York: Pergamon Press Inc., 1985.– 10.– P. 347–366.
13. *Tissieres A., Mitchell H. K., Ttracy U. M.* Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs // J. Mol. Biol.– 1974.– 84.– P. 389–398.
14. *Tsutsaeva A. A., Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O.* The effect of cryostress on protein synthesis in *E. coli* // Cryo-Lett.– 1993.– 14.– P. 71–82.
15. *Yiangou M., Tsapogas P., Nikolaidis N., Scouras Z. G.* Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auraria* (Diptera: Drosophilidae) // Cytobios.– 1997.– 92:369.– P. 91–98.

Поступила 27.04.99

The data presented testify to the fact, that after a cold shock the larvae death statistically did not differ on larvae death in the control, but in salivary gland cells of 5-day' *D. melanogaster* larvae non-lethal damages, manifesting at the stage of their reparation, appear. The synthesis of stress-proteins family is induced. Thereat only the protein with the molecular mass of 70 kDa is CSP70 homologue, though it is minor one, while after a heat effect this protein is major. Other newly synthesized after hypothermic effect proteins differ on CSP proteins.

These results allow to suppose, that the character of non-lethal damages, induced under hypothermia effect, differs by the character of non-lethal damages, induced under the effect of heat shock. Reparation of non-lethal damages after hypothermal effect occurs stage by stage.

REFERENCES

1. *Antibodies*. Methods // Ed. by D. Catty.– M.: Mir, 1991.– P. 230–237.
2. *New* in DNA cloning.– M.: Mir, 1989.– P. 184–186.
3. *Electrophoresis* in division of biological macromolecules / Translated from English. Ed. by V. I. Rozengart.– M.: Mir, 1980.– P. 217–227.
4. *Burton V., Mitchell H. K., Young P.* Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster* // J. Mol. Cell. Biol.– 1988.– 8, № 8.– P. 3550–3552.
5. *Graing E. A.*The heat shock response // Crit. Rev. Bioch.– 1985.– 18.– P. 239–280.
6. *Guy C. L., Vig N. P., Brambl R.* Heat shock protects germinating condiospores of *Neurospora crassa* against freezing injury // J. Bacteriol.– 1974.– 167, № 1.– P. 124–129.
7. *Heat* shock from bacteria to man / Ed. by M. J. Schlesinger, M. Ashburner, A. Tissieres, 1982.– 467 p.
8. *Holland D. B, Roberts S. G., Wood E. J., Cunliffe W. J.* Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes // J. Invest Dermatol.– 1993.– 101, № 2.– P. 196–199.
9. *Jons P. G., VanBogelon R. A., Neldhardt F. C.* Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.– 1987.– 169.– P. 2092–2095.
10. *Laios E., Rebeyka I. M., Prody C. A.* Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes // Mol. Cell Biochem.– 1997.– 173, № 1–2.– P. 153–159.
11. *Lindquist S.*The heat-shock response // Ann. Rev. Bioch.– 1986.– 55.– P. 1151–1191.
12. *Petersen N. S., Mitchell H. K.* Heat shock proteins: comprehensive insect physiology, biochemestry and pharmacology // Biochemistry / Ed. by G. A. Kercut, L. I. Gilbert.– Elmsford–New-York: Pergamon Press Inc., 1985.– 10.– P. 347–366.
13. *Tissieres A., Mitchell H. K., Ttracy U. M.* Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs // J. Mol. Biol.– 1974.– 84.– P. 389–398.
14. *Tsutsaeva A. A., Mikulinsky Yu. E., Kotlyarov A. O.* The effect of cryostress on protein synthesis in *E. coli* // Cryo-Lett.– 1993.– 14.– P. 71–82.
15. *Yiangou M., Tsapogas P., Nikolaidis N., Scouras Z. G.* Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auraria* (Diptera: Drosophilidae) // Cytobios.– 1997.– 92:369.– P. 91–98.

Accepted in 27.04.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 611.013.11:615.014.41:547.426.1

UDC 611.013.11:615.014.41:547.426.1

Влияние быстрых и сверхбыстрых скоростей замораживания на сохранность спермиев человека

В. И. ГРИЩЕНКО, А. В. ДУНАЕВСКАЯ, Ю. В. КАЛУГИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Action of Rapid and Suprarapid Rates of Freezing on Survival of Human Spermatozoa

V. I. GRISCHENKO, A. V. DUNAYEVSKAYA, Yu. V. KALUGIN

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

Изучено влияние скорости охлаждения (1 000, 2 000, 2 500 и 10 000 °С/мин), осмолярности криозащитной среды и содержания в ней глицерина на показатели сохранности спермиев человека. Установлено, что максимальная выживаемость и сохранность осморегуляторной способности мембран спермиев в изучаемых диапазонах скоростей замораживания наблюдается при скорости охлаждения 2 500 °С/мин в оптимизированной криозащитной среде с умеренно повышенной осмолярностью и конечной концентрацией глицерина 4–5%.

Вивчено вплив швидкості охолодження (1 000, 2 000, 2 500 и 10 000 °С/хв), осмолярності кріозахисного середовища і вмісту в ній гліцерину на показники цілості сперміїв людини. Установлено, що максимальне виживання і цілість осморегуляторної здатності мембран сперміїв у діапазонах швидкостей заморожування, що вивчаються, спостерігаються при швидкості охолодження 2 500 °С/хв в оптимізованому кріозахисному середовищі з помірно підвищеною осмолярністю і кінцевою концентрацією гліцерину 4–5%.

The authors studied the action of the rates of cooling (1 000, 2 000, 2 500 and 10 000 °C/min), osmolarity of the cryoprotective medium and the content of glycerol in it on the survival of the human spermatozoa. It was found that maximum survival and maintenance of the osmoregulating ability of the spermatozoa membranes within the range of the studied rates of freezing are identified at the rate of cooling of 2 500 °C/min in the optimized cryoprotective medium with a moderately increased osmolarity and finite concentration of glycerol of 4–5%.

Причиной бесплодия у 30% семейных пар является мужское бесплодие. Сочетание мужского и женского бесплодия отмечено у 20% бесплодных пар. Тенденция снижения качества спермы у мужчин отмечается во всех странах мира [3, 6, 12]. В течение последних 5 лет наблюдается прогресс в лечении мужского бесплодия.

Бурное развитие вспомогательных репродуктивных технологий с использованием криоконсервированных сперматозоидов и создание криобанков спермы, в ряде случаев полученной хирургическим путем (эпидидимальные, тестикулярные спермии), требует более углубленного изучения влияния факторов криоконсервации на мужские гаметы.

Получение оптимального количества функционально полноценных спермиев всегда было целью программ криоконсервации спермиев человека. Вместе с тем все этапы консервации оказывают существенное влияние на структурно-функциональное состояние спермиев. Проявления повреждающего действия процесса криоконсервации многообразны и затрагивают различные уровни биологической организации клетки. Особое внимание при разработке методов криоконсервации спермиев уделяют составу разбавителя, природе криопротектора, скорости замораживания и отогрева. Большинство работ, связанных с криоконсервацией спермиев человека, проводились в диа-

Male sterility is the reason for infertility in 30% of cases. A combination of male sterility and female infertility was observed in 20% of cases. A tendency towards a decrease in the quality of spermatozoa in males is reported in all countries of the world [3, 6, 12]. Though in the last 5 years a progress in treating male sterility has been achieved.

Rapid development of the auxiliary reproductive technologies, using cryopreserved spermatozoa, and establishment of cryobanks of the spermatozoa, not infrequently collected with a surgical method, require a profound investigation of the action of the cryopreservation factors on male gametes.

Harvesting of the optimum amount of the functionally viable spermatozoa has always been the aim of the programs of cryopreservation of the human spermatozoa. At the same time, the stages of preservation exercise a significant influence on the structure-functional state of the spermatozoa. The manifestations of the damaging action of the cryopreservation process are diverse and involve various levels of the biological organization of the cell. When developing the methods of the spermatozoa cryopreservation particular attention is paid to the composition of the diluent, nature of the cryoprotectant, rates of freezing and thawing. Most research, dealing with cryopreservation of the human spermatozoa, were done in the range of low rates of freezing (up to 16–25 °C/min).

Матеріал, захищений авторським правом

пазоне низких скоростей замораживания (до 16–25 °С/мин). В 1986 году [1] была отмечена возможность применения замораживания спермиев человека со скоростью 85–95 °С/мин в полиэтиленовых подключичных катетерах, малый диаметр и большая длина которых способствовали равномерному распределению суспензии вдоль стенок, что позволило достичь сохранности 75% клеток. В [2] показана целесообразность криоконсервирования спермиев человека в условиях сверхбыстрого охлаждения со скоростью 3 000–5 000 °С/мин в среде полифункционального криоконсерванта, содержащего низкие концентрации криопротектора и мембраностабилизирующие соединения. При этом сохранность гамет составила 90%. Теоретические расчеты коэффициента проницаемости мембраны спермия человека для воды и энергии активации воды позволили определить оптимальную криозащиту этого типа клеток при скорости охлаждения 7 000 °С/мин [11], т.е. возможность использования сверхвысоких скоростей охлаждения при криоконсервации спермиев человека. Однако сохранность спермиев при скоростях охлаждения в диапазонах от 1 000 до 2 500 и свыше 6 000 °С/мин исследована недостаточно и требует дальнейшего изучения.

Цель данной работы — изучение влияния скорости охлаждения (1 000, 2 000, 2 500 и 10 000 °С/мин), осмолярности криозащитной среды и содержания в ней глицерина на сохранность спермиев.

Материалом исследований были образцы спермы здоровых мужчин. Эксперименты проводили на эякулятах, которые при оценке по критериям ВОЗ [13] соответствовали нормоспермии. После 30-минутной эквилибрации с криозащитной средой при комнатной температуре образец замораживали прямым погружением в жидкий азот в различных упаковках, чем достигали изучаемых скоростей охлаждения, которые определяли с помощью термопары, помещенной в идентичные упаковки.

В состав криоконсерванта входили глюкоза, натрий лимоннокислый, яичный желток и глицерин в различной концентрации. Через 24 ч после замораживания образцы отогревали в водяной бане при 40 °С. О сохранности спермиев судили по восстановлению подвижности и сохранности осморегуляторной способности мембраны (ОСМ) [13]. Подвижность спермиев и ОСМ изучали до эквилибрации с криозащитной средой, после эквилибрации и после замораживания-оттаивания. Восстановление подвижности — разность количества подвижных нативных спермиев и количества подвижных спермиев после криоконсервации в процентах. Аналогично определяли восстановление ОСМ спермиев.

Осморегуляторную способность цитоплазматической мембраны изучали с помощью теста гипоосмотического набухания (HOS-теста) [7], который позволяет определить толерантность мембран сперм

In 1986 there was reported freezing of the human spermatozoa with the rate of 85–95 °C/min in polyethylene subclavian catheters, the small diameters and large lengths of which provided for the uniform distribution of the suspension along the walls, thus making it possible to maintain 75% of cells in the viable states. Elsewhere [2] it was reported on the expediency of cryopreservation of the human spermatozoa during snap cooling with the rate of 3 000 – 5 000 °C/min in the medium of the polyfunctional cryopreservative, which contained low concentrations of the cryoprotectant and membrane-stabilizing compounds. Here the level of the gamete was 90%. Theoretical calculations of the factor of permeability of the human spermatozoon to water and the water activation energy allowed to identify the optimum cryoprotection of this type of cells to occur at the rate of 7 000 °C/min [11], i.e. it became possible to apply suprahigh cooling rates for cryopreservation of the human spermatozoa. However, survival of spermatozoa at the rates of cooling in the ranges of 1 000 – 2 500 and over 6 000 °C/min was studied insufficiently and requires further investigation.

The aim of the given research was to investigate the action of the rates of cooling (1 000, 2 000, 2 500 and 10 000 °C/min), osmolarity of the cryoprotective medium and the content of glycerol in it on the survival of spermatozoa.

The samples of the healthy male spermatozoa were used in the research. The experiments were done with the ejaculates, which corresponded to normospermia according to the WHO standards [13]. Following 30-min equilibration with a cryoprotective medium at room temperature the sample was frozen by direct plunging into liquid nitrogen in various packings, thus achieving the rates of cooling, which were determined with the help of a thermocouple, placed into identical packings.

A cryopreservative comprised glucose, sodium citrate, egg yolk and glycerol in different concentrations. In 24 hours after freezing the samples were thawed on water bath at 40 °C. The survival of spermatozoa was assessed by recovery of the motility and maintenance of the osmoregulating ability of the membrane (OSM) [13]. The motility of spermatozoa and OSM were studied prior to equilibration with a cryoprotective medium, after equilibration and following freeze-thawing. The recovery of the motility was determined as the difference between the amount of the motile native spermatozoa and the amount of the motile spermatozoa after cryopreservation, and expressed as percentage. The recovery of the spermatozoa OSM was determined in a similar manner.

Functional integrity of the cytoplasmic membrane was investigated with a test of hypoosmotic swelling (HOS-test) [7], which allows to determine the tolerance of the spermatozoa membrane to hypoosmotic stress. The basic principle of the hypoosmotic swelling test consists in the fact that when placing live sper-

Матеріал, захищений авторським правом

матозоидов к гипоосмотическому стрессу. Принцип HOS-теста состоит в том, что при помещении живых спермиев с нормально функционирующей мембраной в раствор с низкой осмолярностью (150 мОсм/л), содержащий цитрат натрия и фруктозу, вследствие притока в клетку воды по осмотическому градиенту, происходит набухание хвостов спермиев. Так как мембраны хвоста спермия менее плотно связаны с лежащими ниже структурами, чем мембраны головки спермия, хвосты спермиев более чувствительны к набуханию.

Известно, что степень повреждения клеток млекопитающих, подвергшихся криоконсервации, зависит от скорости замораживания и скорости отогрева [8–10]. Полагают [4, 5], что клеточные повреждения объясняются двумя основными факторами: "эффектом раствора", ассоциированным с низкой скоростью охлаждения, и внутриклеточным образованием льда, связанным с высокой скоростью охлаждения. Степень повреждающего действия этих факторов во многом зависит от скорости замораживания-отогрева и криозащитного действия криопротекторной среды, в том числе и от ее осмолярности. Оптимальная скорость замораживания клеток связана с проницаемостью мембран клеток для воды, их объемом, природой криопротектора.

Проведенные исследования позволили установить (рис. 1), что лучшую сохранность спермиев (выживаемость 63 ± 8,1%, HOS-тест 60 ± 9,2%) в температурных диапазонах от 1 000 до 2 500 и около 10 000 °С/мин в оптимизированной среде криоконсерванта с умеренно повышенной осмолярностью (350–430 мОсм/кг) и концентрацией глицерина 4–5% обеспечивает замораживание спермиев со скоростью около 2 500 °С/мин. При снижении скорости замораживания до 1 000 °С/мин сохранность гамет была существенно ниже, восстановление подвижности спермиев составляло 43 ± 6,2%, количество клеток с неповрежденной мембраной 37 ± 4,6%, что достоверно ниже ($p < 0,05$), чем при скорости замораживания 2 000 и 2 500 °С/мин. При увеличении скорости замораживания до 10 000 °С/мин выживают единичные спермии.



Рис. 1. Зависимость сохранности спермиев от скорости замораживания.

Fig. 1. Dependence of spermatozoa survival on the rate of freezing.

matozoa with normally functioning membranes into a solution with low osmolarity (150 mOsm/l), containing sodium citrate and fructose, the tails of the spermatozoa are swelling due to the inflow of water into the cells by the osmotic gradient. Since the membranes of the spermatozoon tail are more loosely bound with the underlying structures as compared with the membranes of the spermatozoon head, the tails of the spermatozoa are more susceptible to swelling.

The extent of injury to mammalian cells, exposed to cryopreservation, is known to depend on the rates of freezing and thawing [8–10]. It is believed [4, 5] that the injuries to the cells are due to the action of two basic factors: "solution effect", associated with low cooling rate, and intracellular nucleation, related with a high cooling rate. The extent of the damaging action of these factors depend on the rate of freeze-thawing and cryoprotective action of the cryoprotective medium, its osmolarity including. The optimum rate of freezing of cells relates to permeability of the cell membranes to water, their volumes, and the nature of the cryoprotectant.

The investigations conducted made it possible to conclude (Fig. 1) that the best survival of spermatozoa (63 ± 8.1%, HOS-test 60 ± 9.2%) within the temperature range of 1 000 – 2 500 and about 10 000 °C/min in the optimized medium of the cryopreservative with a moderately increased osmolarity (350–430 mOsm/kg) with the concentration of glycerol of 4–5%, is provided by freezing the spermatozoa at a rate of 2 500 °C/min. Slowing down of the rate of freezing down to 1 000 °C/min reduces their survival, recovery of the spermatozoa motility was 43 ± 6.2%, and the amount of the spermatozoa with intact membranes was 37 ± 4.6%, which is significantly lower ($p < 0.05$) as compared with that at the rates of freezing of 2 000 and 2 500 °C/min. Acceleration of the rate of freezing up to 10 000 °C/min brings about survival of only single spermatozoa.

Noiles et al. [11] determined the factor of hydraulic conductivity (water permeability L_p) and activation energy (changing of L_p with temperature) for human spermatozoa, and applied this factor for calculating dehydration as a function of the cooling rate. According to these calculations, human spermatozoa, cooled down with a rate, close to 10 000 °C/min, are capable of achieving the required level of dehydration prior to the process of intracellular freezing. However, the calculation of the rate of 10 000 °C/min for freezing was based on measuring Lp of spermatozoa in a physiological saline. Subsequently Noiles et al. reported on the presence of 1 M glycerol to reduce permeability of water by 33% at 22 °C, thus proportionally slowing down the rate critical cooling velocity to 7 000 °C/min, which did not fully correspond to the experimental data obtained. It seems likely that at lower temperatures during freezing the activation energy Lp is higher as compared with the calculated value. Apparently, the injuries to the cells, which are

Матеріал, захищений авторським правом

Noiles и др. [11] определили коэффициент гидравлической проводимости (проницаемость воды L_p) и энергию активации (изменение L_p с температурой) для спермиев человека и использовали этот коэффициент для расчета дегидратации как функции скорости охлаждения. Согласно этим расчетам спермии человека, охлажденные со скоростью, близкой к 10 000 °С/мин, способны достичь необходимого уровня дегидратации перед внутриклеточным замораживанием. Однако расчет скорости 10 000 °С/мин для замораживания базировался на измерении L_p спермиев в физиологическом растворе. Позже Noiles и др. отметили, что присутствие 1 М глицерина уменьшает проницаемость воды на 33% при 22 °С, а это снижает рассчитанную критическую скорость охлаждения пропорционально до 7 000 °С/мин, что не в полной мере согласуется с полученными экспериментальными данными. Возможно, при более низких температурах в процессе замораживания активация энергии L_p выше, чем значение, полученное при расчетах. Вероятно, повреждения клеток, наблюдаемые при скорости охлаждения 1 000 °С/мин, вызываются внутриклеточным образованием относительно крупных кристаллов льда. Кроме того, возможно повреждение цитоплазматической мембраны спермиев вследствие высокой скорости диффузии воды из переохлажденной клетки.

При скорости охлаждения 2 000 – 5 000 °С/мин, очевидно, образуется некоторое количество эндоцеллюлярного льда, но его кристаллы небольшие и имеют форму, совпадающую с внутренней архитектурой клетки. Несмотря на их большую поверхностную энергию, которая является механизмом запуска процесса рекристаллизации при быстром отогреве, они расплавляются с переходом в жидкую фазу. При скоростях, близких к 10 000 °С/мин, необратимые изменения проницаемости цитоплазматической мембраны и гибель клетки, видимо, происходят в результате иных причин.

Как видно из рис. 2, при выраженной гиперосмии криозащитной среды (600 мОсм/кг) существенно снижается выживаемость спермиев (13 ± 4,6%) и увеличивается повреждение ОСМ спермиев – количество спермиев с неповрежденной мембраной составило 7 ± 4,2%. Это, очевидно, обусловлено чрезмерной дегидратацией клеток, вызываемой гиперосмолярным раствором, что в свою очередь приводит к проявлению "эффекта раствора". В то же время изоосмолярная среда (280 мОсм/кг), возможно, не позволяет клетке достигнуть необходимого уровня обезвоживания и повреждающее действие в большей степени оказывает внутриклеточное образование льда. В этой среде при скорости замораживания 2 000 °С/мин восстановление подвижности и количество спермиев с сохранной цитоплазматической мембраной составили соответственно 47 ± 6,4 и 38 ± 5,9%.

observed at the rate of cooling of 1 000 °C/min, are due to the intracellular formation of large ice crystals. Besides, the cytoplasmic membranes of spermatozoa may be injured due to a high rate of water diffusion out of the supercooled cell.

The authors believe that at the rate of cooling of 2 000 – 5 000 °C/min a certain amount of the endocellular ice is formed, though its crystals are small and their shapes coincide with the inner architecture of the cell. In spite of high surfacial energy, which serves as the mechanism of triggering the process of re-crystallization during rapid thawing, they are melted with transition into a liquid phase. At the rates, close to 10 000 °C/min, the irreversible changes in the permeability of the cytoplasmic membrane and death of cells occur, apparently, due to the other reasons.

It follows from the data in Fig. 2 that during a manifested hyperosmia of the cryoprotective medium (600 mOsm/kg) there are observed a significant reduction in the spermatozoa survival (13 ± 4.6%) and an increase in the injuries to the OSM of the spermatozoa – the amount of spermatozoa with intact membranes was 7 ± 4.2%. Apparently, this is due to excessive dehydration of cells, caused by the hyperosmolar solution, which, in turn, results in the manifestation of the "solution effect". At the same time the isoosmolar medium (280 mOsm/kg), probably, does allow the cell to achieve the required level of dehydration, and in this case the damaging action is mostly due to the intercellular nucleation. In this medium at the rate of freezing of 2 000 °C/min the recovery of motility and the amount of spermatozoa with intact cytoplasmic membrane were 47 ± 6.4 and 38 ± 5.9%, respectively.

It follows from Fig. 3 that the survival of spermatozoa is greatly affected by the content of glycerol in the cryoprotective medium. At the rate of cooling of 2 000 °C/min and finite concentration of glycerol of 1.5 and 2.5% in the freezing medium the survival of spermatozoa was low: recovery of the spermatozoa motility was 9 ± 3.3 and 29 ± 4.5%, respectively, and the OSM survival was 14 ± 2.3 and 33 ± 5.1%, respec-

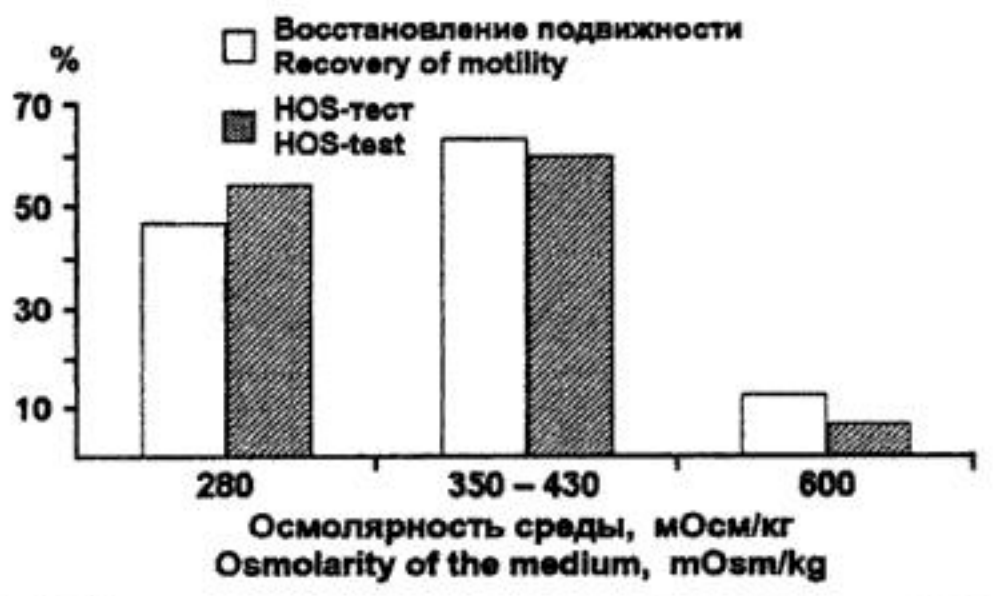


Рис. 2. Зависимость сохранности криоконсервированных спермиев от осмолярности криозащитной среды при скорости охлаждения 2 500 °С/мин.

Fig. 2. Dependence of survival of cryopreserved spermatozoa on the osmolarity of cryoprotective medium at the rate of cooling of 2 500 °C/min.

Матеріал, захищений авторським правом

Как видно из рис. 3, на сохранность спермиев существенное влияние оказывает содержание глицерина в криозащитной среде. При скорости охлаждения 2 000 °С/мин и конечной концентрации глицерина 1,5 и 2,5% в среде замораживания сохранность спермиев была низкой: восстановление подвижности спермиев 9 ± 3,3 и 29 ± 4,5% соответственно и сохранность ОСМ 14 ± 2,3 и 33 ± 5,1% соответственно. При конечной концентрации глицерина 4; 5 и 7,5% в среде криоконсервации сохранность спермиев (восстановление подвижности 62 ± 6,4, 63 ± 8,1, 71 ± 7,2% соответственно и сохранность ОСМ 58 ± 8,3, 60 ± 9,2, 68 ± 8,3% соответственно) была существенно выше, чем при концентрации глицерина 1,5 и 2,5% ($p < 0,05$). В то же время не было достоверных различий между показателями сохранности спермиев в средах, содержащих 4; 5 и 7,5% глицерина ($p > 0,05$).

Мы полагаем, что в исследуемом диапазоне скоростей охлаждения глицерин в концентрации 4–5% обеспечивает оптимальную криозащиту спермиев. С одной стороны, согласно полученным нами данным, снижение концентрации глицерина до 2,5% и ниже не обеспечивает необходимую криозащиту, с другой — при криообработке спермы глицерин в концентрации выше 5% может дестабилизировать мембрану акросом, формируя в ней каналы выхода акросомальных белков, в том числе и акрозина [2].

Важно отметить, что при изучении подвижности спермиев и сохранности их ОСМ мы обнаружили аналогичные повреждения при различных скоростях охлаждения. Это говорит о том, что эти параметры могут быть взаимозависимыми. Оценка осморегуляторной способности - важный аспект определения целостности мембраны. У спермиев с поврежденной мембраной не отмечали набухания хвоста. Поврежденные спермии со слабой осморегуляторной способностью набухали неконтролируемо, что быстро приводило к разрыву перерастянутой цитоплазматической мембраны. В то же время после отогрева не наблюдалось корреляции между результатами теста гипоосмотического набухания и подвижностью спермиев. Вероятно, на потерю подвижности в процессе криоконсервации влияет не только повреждение мембраны хвоста, но и ряд других факторов.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили установить, что максимальная выживаемость спермиев и сохранность их мембран, по данным HOS-теста, в диапазонах скоростей замораживания от 1 000 до 2 500 и около 10 000 °С/мин наблюдаются при скорости охлаждения 2 500 °С/мин в оптимизированной криозащитной среде с умеренно повышенной осмолярностью и концентрацией глицерина 4–5%.

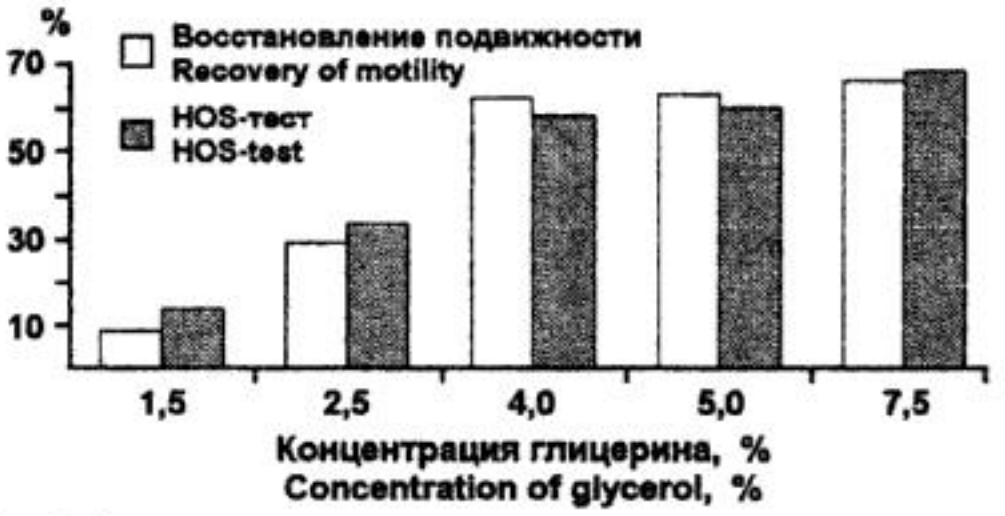


Рис. 3. Зависимость сохранности спермиев человека от концентрации глицерина в криозащитной среде при скорости охлаждения 2 500 °С/мин.

Fig. 3. Dependence of human spermatozoa survival on the concentration of glycerol in cryoprotective medium at the rate of cooling of 2 500 °C/min.

tively. At the finite concentrations of glycerol of 4, 5 and 7.5% in the cryopreservation medium the survival of spermatozoa (recovery of motility was 62 ± 6.4, 63 ± 8.1, 71 ± 7.2%, respectively, and the OSM survival of 58 ± 8.3, 60 ± 9.2, 68 ± 8.3%, respectively) was considerably higher as compared with the concentrations of glycerol of 1.5 and 2.5% ($p < 0.05$). At the same time there were no significant differences between the features of the spermatozoa survival in the media, containing 4, 5 and 7.5% glycerol ($p > 0.05$).

The authors believe that within the studied range of cooling rates glycerol in the concentrations of 4–5% provides for optimum cryoprotection of spermatozoa. On one hand, according to the data obtained, a reduction in the concentration of glycerol down to 2.5% and lower does not provide for the required cryoprotection. On the other hand, during cryoexposure of spermatozoa glycerol in the concentration over 5% may destabilize the acrosomal membrane, forming channels of the outflow of the acrosomal proteins in it, acrosine including [2].

It is worth mentioning that when studying the motility of spermatozoa and survival of their OSM the authors detected similar injuries at various rates of cooling. This is indicative of the fact that these parameters may be interdependent. Evaluation of the osmoregulating ability is an important aspect of determining the membrane integrity. Swelling of the tail was missing in the spermatozoa with the injured membranes. The injured spermatozoa with poor osmoregulating ability were swelling incontrollably, thus quickly resulting in the rupture of the overstretched cytoplasmic membrane. At the same time, there was no correlation between the yield of the test of hypoosmotic swelling and motility of spermatozoa. Probably, the loss of motility in the process of cryopreservation is affected not only by the injury to the tail membrane but by some other factors as well.

Thus, the experiments conducted made it possible to conclude that maximum survival of spermatozoa and intactness of their membranes, as judged by the yield of the HOS-test, within the ranges of freezing of 1 000 – 2 500 and about 10 000 °C/min, are observed

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М., Грищенко В. И., Паращук Ю. С.* Криоконсервация репродуктивных клеток.– Киев: Наук. думка, 1986.– 208 с.
2. *Грищенко В. И., Калугин Ю. В., Лучко Н. А.* Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии.– 1994.– № 2.– С. 29–37.
3. *Auger J., Kunstmann J. M., Czyglik F., Jouannet P.* Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years // NEJM.– 1995.– 332.– P. 281–282.
4. *Ansbacher R.* Artificial insemination with frozen spermatozoa // Fertil. Steril.– 1978.– 29, № 4.– P. 375–379.
5. *Barkay J., Zuckerman H.* Cryopreservation and pooling of spermatozoa // A treatment of male infertility.– Berlin: Springer, 1982.– P. 263–281.
6. *Carlson E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years // Brit. Med. J.– 1992.– 305.– P. 609–713.
7. *Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M. et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics // J. Reprod. Fertil.– 1984.– 70.– P. 219–228.
8. *Mazur P.* Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol.– 1974.– 247.– P. 125–142.
9. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res.– 1972.– 71.– P. 345–355.
10. *Miller R.H., Mazur P.* Survival of frozen-thawed human red cell as a function of cooling and warming velocities // Cryobiology.– 1976.– 13.– P. 404–414.
11. *Noiles E. E., Mazur P., Watson P. F.* Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its sctivation energy // Biol. Reprod.– 1993.– 48.– P. 99–109.
12. *Waeleghem K., Clercq N., Vermeulen L. et al.* Deterioration of sperm quality in young healthy Belgina men: Abstr. of the 10th Ann. Meeting of the Europ. Soc. of Human Reproduction and Embryology, Brussels, June 27–29th // Human reprod.– 1994.– 9 (Sup. 19. Abstract).– 178 p.
13. *World* Health Organization: Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: University press, 1992.– P. 3–27.

Поступила 14.12.99

at the rate of cooling of 2 500 °C/min in the optimized cryoprotective medium with a moderately increased osmolarity and glycerol concentration of 4–5%.

REFERENCES

1. *Belous A. M., Grischenko V. I., Paraschuk Yu. S.* Cryopreservation of reproductive cells.– Kiev: Naukova dumka publ., 1986.– 208 p.
2. *Grischenko V. I., Kalugin Yu. A., Luchko N. A.* Some aspects of cryopreservation of embryos and spermatozoa // Probl. kriobiol.– 1994.– № 2.– P. 29–37.
3. *Auger J., Kunstmann J. M., Czyglik F., Jouannet P.* Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years // NEJM.– 1995.– 332.– P. 281–282.
4. *Ansbacher R.* Artificial insemination with frozen spermatozoa // Fertil. Steril.– 1978.– 29, № 4.– P. 375–379.
5. *Barkay J., Zuckerman H.* Cryopreservation and pooling of spermatozoa // A treatment of male infertility.– Berlin: Springer, 1982.– P. 263–281.
6. *Carlson E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years // Brit. Med. J.– 1992.– 305.– P. 609–713.
7. *Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M. et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics // J. Reprod. Fertil.– 1984.– 70.– P. 219–228.
8. *Mazur P.* Freezing of living cells: mechanisms and implications // Am. J. Physiol.– 1974.– 247.– P. 125–142.
9. *Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y.* A two-factor hypothesis of freezing injury // Exp. Cell Res.– 1972.– 71.– P. 345–355.
10. *Miller R.H., Mazur P.* Survival of frozen-thawed human red cell as a function of cooling and warming velocities // Cryobiology.– 1976.– 13.– P. 404–414.
11. *Noiles E. E., Mazur P., Watson P. F.* Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its sctivation energy // Biol. Reprod.– 1993.– 48.– P. 99–109.
12. *Waeleghem K., Clercq N., Vermeulen L. et al.* Deterioration of sperm quality in young healthy Belgina men: Abstr. of the 10th Ann. Meeting of the Europ. Soc. of Human Reproduction and Embryology, Brussels, June 27–29th // Human reprod.– 1994.– 9 (Sup. 19. Abstract).– 178 p.
13. *World* Health Organization: Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: University press, 1992.– P. 3–27.

Accepted in 14.12.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.44/451

UDC 57.043: 612.44/451

Активность аденилатциклазы в плазматических мембранах тироцитов и кортикоцитов после действия замораживания и димексида

Л. Г. КАРПЕНКО, Н. Ф. ГУБИНА, В. А. ЩИРОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Adenylate Cyclase Activity in Plasmatic Membranes of Thyrocytes and Corticocytes After Dimexide and Freezing Effects

L. G. KARPENKO, N. F. GUBINA, V. A. SCHIROVA

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

Приведены данные о влиянии замораживания без криопротектора и с криопротектором — димексидом, а также димексида на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы и коры надпочечников. Показано, что при замораживании без криопротектора снижается чувствительность аденилатциклазы к специфическим регуляторам. Криозащитным эффектом обладает димексид в 5%-й концентрации для аденилатциклазы в ткани коры надпочечников и 10%-й — в щитовидной железе. Димексид в 5- и 10%-й концентрациях сохраняет функциональную активность аденилатциклазы в щитовидной железе и 10%-й — в адренокортикальной ткани.

Приведено дані про вплив заморожування без кріопротектора і з кріопротектором — димексидом, а також димексиду на активність аденілатциклази в мембранах клітин щитовидної залози і кори надниркової залози. Показано, що при заморожуванні без кріопротектора знижується чутливість аденілатциклази до специфічних регуляторів. Кріозахисний ефект має димексид у 5%-й концентрації для аденілатциклази в тканинах кори надниркової залози і 10%-й — у щитовидній залозі. Димексид у 5- та 10%-й концентраціях зберігає функціональну активність аденілатциклази в щитовидній залозі і 10%-й — в адренокортикальній тканині.

The data of freezing effect without cryoprotectant and with dimexide have been shown, as well as the dimexide effect on the adenylate cyclase activity in thyroid gland and adrenal cortex cell membranes. It has been demonstrated, that during freezing without cryoprotectant the adenylate cyclase sensitivity to specific regulators decreases. Dimexide has a cryoprotective effect under 5% concentration for adenylate cyclase in adrenal cortex tissue and 10% concentration in thyroid gland. Dimexide in 5 and 10% concentrations preserves the adenylate cyclase functional activity in thyroid gland and in 10% one — in adrenocortical tissue.

Аденилатциклаза (НФ 4.6.1) — мембранный фермент, синтезирующий из аденозинтрифосфата (АТФ) циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), который является "вторичным" мессенджером при действии агонистов (первичных мессенджеров), не проникающих в клетку. Представленные в [1, 3] данные свидетельствуют о том, что регуляция в клетках таких процессов, как прохождение кальция через кальциевые каналы мембраны, перекисное окисление липидов, активация протеинкиназ и фосфолипаз, фосфорилирование белков и многих других внутриклеточных превращений осуществляется при участии циклических аденозинмонофосфата (АМФ) и гуанозинмонофосфата (ГМФ).

Как показали исследования последних лет [8, 9], важная роль в механизме регуляции активности аденилатциклазы принадлежит G-белкам, которые принимают участие в сопряжении рецептора с агонистом и передаче сигнала от рецептора к эффектору.

Исследования системы аденилатциклаза–цАМФ могут быть использованы для оценки функции

Adenylate cyclase (NF 4.6.1) is a membrane enzyme, synthesizing from adenosine triphosphate (ATP) a cyclic adenosine monophosphate (cAMP), being a "secondary" messanger at agonists effects (primary messangers), not penetrating into a cell. The data presented in [1, 3] testify to the fact, that the regulation in cells such processes as the calcium passage through a membrane calcium channels, lipid peroxidation, protein kinase and phospholipase activation, phosphorilation of proteins and many other intracellular transformations is performed with the participation of cyclic adenosine monophosphate (AMP) and guanosine monophosphate (GMP).

As the recent investigations have shown [8, 9], an important role in the mechanism of adenylate cyclase activity regulation belongs to G-ptoteins, participating in the conjunction of a receptor with an agonist and in a signal transmission from a receptor to an effector.

Матеріал, захищений авторським правом

плазматических мембран клеток в условиях действия низких температур, а также для разработки эффективных методов криоконсервирования эндокринных тканей и оценки их пригодности для трансплантации.

Цель работы — изучение действия замораживания без криопротектора и с криопротектором — димексидом, а также димексида на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы быка и коры надпочечников свиньи. Железы были получены на Харьковском мясокомбинате, их очищали от жировой капсулы и ополаскивали охлажденным физиологическим раствором. Срезы тканей щитовидной железы и коры надпочечников массой 1 г замораживали со скоростями 1–3 и 85–100 °С/мин до –196 °С. Оттаивание образцов осуществляли на водяной бане при 37 °С. Инкубацию образцов тканей в растворах димексида производили при 25 °С в течение 30 мин, после чего их отмывали физраствором. Контролем служили незамороженные образцы. Плазматические мембраны выделяли из тканей по методу [6, 7]. Активность аденилатциклазы в препаратах плазматических мембран рассчитывали по содержанию цАМФ до и после инкубации в АТФ-буфере, в состав которого входили: 0,002 М трис-HCl буфера, 6 мМ $MgCl_2$, 3 мМ АТФ, 0,5 мМ теофиллина, 5 мМ фосфоэнолпирувата, 100 мкг/мл пируваткиназы, 0,1% альбумина человека. Инкубацию производили на водяной бане при температуре 37 °С в течение 30 мин. Использовали стимуляторы аденилатциклазы: неспецифический — NaF и специфические — тиреотропный гормон для щитовидной железы и синактен, синтетический аналог адренокортикотропного гормона, для коры надпочечников. Количество цАМФ определяли при помощи изотопного набора 3-НцАМФ производства ЧССР и "Amersham" (Англия). Радиоактивность проб подсчитывали на счетчике "Beckman".

Первая серия опытов была посвящена изучению влияния на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы и коры надпочечников 2-х режимов замораживания: медленного — 1–3 и быстрого — 85–100 °С/мин (табл. 1). После действия на щитовидную железу как медленного, так и быстрого замораживания было обнаружено незначительное увеличение базальной активности исследуемого фермента. Отмечено сохранение чувствительности аденилатциклазы к NaF. В щитовидной железе при быстром замораживании сохраняется чувствительность аденилатциклазы к тиреотропному гормону, но она ниже, чем в незамороженной ткани. При исследовании активности аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников после их медленного и быстрого замораживания было установлено, что фермент не теряет своей чувствительности к NaF. Сохраняет-

The investigations of adenylate cyclase system can be applied to evaluate the function of cell plasmatic membranes under low temperature effect, as well as to develop the efficient methods of endocrine tissue cryopreservation and their suitability estimation for transplantation.

The aim of the work was to study the effect of freezing without cryoprotectant and with dimexide, as well as the dimexide itself to the adenylate cyclase activity in bovine thyroid gland and pig's adrenal cortex cell membranes. Glands were obtained at Kharkov Slaughtering Plant, they were peeled from a fat caplsule and rinsed with a cooled physiological solution. The tissue sections of thyroid gland and adrenal cortex with 1 g mass were frozen with the rates of 1–3 and 85–100 °C/min down to –196 °C. The samples freeze-thawing was accomplished on a water bath at 37 °C. The incubation of tissue samples in dimexide solutions was performed at 25 °C during 30 min, after that they were washed out using physiological solution. Unfrozen samples served as the control. Plasmatic mambranes were isolated according to the method [6, 7]. Adenylate cyclase activity in plasmatic membrane preparations was calculated by cAMP content before and after incubation in ATP-buffer, that was composed by: 0.002 M of tris-HCl buffer, 6 mM of $MgCl_2$, 3 mM ATP, 0.5 mM of theophylline, 5 mM of phosphoenolpyruvate, 100 mcg/ml of pyruvate kinase, 0,1% of human albumin. The incubation was carried-out on a water bath under 37 °C temperature within 30 min. The following adenylate cyclase stimulators were used: non-specific — NaF and specific ones — thyrotropic hormone for thyroid gland and synacten — synthetic analogue of adrenocorticotropic hormone for adrenal cortex. The cAMP number was determined by means of 3-HcAMP isotopic kit (Szech Republic production) and "Amersham" (Great Britain). The samples radioactivity was calculated using "Beckman" counter.

Table 1

Freezing effect without cryoprotectant on adenylate cyclase activity in adrenal cortex and thyroid gland cell membranes

Experiment conditions	cAMP concentration, pM/mg of protein per min			
	Basal activity	NaF 40 mM	TTH 50 mUnit	Synacten 10 nM
Unfrozen thyroid gland	0.34 ± 0.05	1.81 ± 0.20*	0.95 ± 0.15*	—
Thyroid gland freezing with the rate, °C/min:				
85–100	0.58 ± 0.16	2.91 ± 0.68*	0.97 ± 0.23	—
1–3	0.57 ± 0.12	2.73 ± 0.59*	1.09 ± 0.23	—
Unfrozen adrenal gland	1.05 ± 0.10	4.56 ± 0.96*	—	2.74 ± 0.19*
Freezing adrenal gland with the rate, °C/min:				
85–100	1.55 ± 0.45	5.45 ± 0.85*	—	1.10 ± 0.20
1–3	2.03 ± 0.45	8.14 ± 1.42*	—	3.14 ± 0.90

Note: * statistically significant in respect to basal activity, $p < 0.05$.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1

Влияние замораживания без криопротекторов на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы и коры надпочечников

Условия эксперимента	Концентрация цАМФ, пМ/мг белка/мин			
	Базальная активность	NaF 40 мМ	ТТГ 50 мЕ	Синактен 10 нМ
Незамороженная щитовидная железа	0,34 ± 0,05	1,81 ± 0,20*	0,95 ± 0,15*	—
Замораживание щитовидной железы со скоростью, °С/мин:				
85–100	0,58 ± 0,16	2,91 ± 0,68*	0,97 ± 0,23	—
1–3	0,57 ± 0,12	2,73 ± 0,59*	1,09 ± 0,23	—
Незамороженный надпочечник	1,05 ± 0,10	4,56 ± 0,96*	—	2,74 ± 0,19*
Замораживание надпочечника со скоростью, °С/мин:				
85–100	1,55 ± 0,45	5,45 ± 0,85*	—	1,10 ± 0,20
1–3	2,03 ± 0,45	8,14 ± 1,42*	—	3,14 ± 0,90

Примечание. * достоверно к базальной активности, $p < 0,05$.

ся чувствительность аденилатциклазы к синактену при медленном замораживании на уровне более низком, чем в контроле, и отсутствует при быстром замораживании. Базальная активность фермента увеличивается при медленном замораживании и не изменяется при быстром. Повышение базальной активности фермента в мембранах коры надпочечников при медленном замораживании, возможно, связано с мембранными перестройками, происходящими при охлаждении [2]. Как показали исследования, в процессе охлаждения в меньшей степени сохраняется чувствительность аденилатциклазы к специфическим стимуляторам как в щитовидной железе, так и в коре надпочечников.

Были проведены исследования по изучению активности аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы после замораживания со скоростью 1–3 °С/мин с растворами димексида 1; 5 и 10%. Из табл. 2 следует, что при замораживании тиреоидной ткани с 1- и 5%-м димексидом не изменяется базальная активность фермента. Применение 10%-го димексида приводит к незначительному увеличению базальной активности

Таблица 2

Влияние замораживания с димексидом на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы

Условия эксперимента	Концентрация цАМФ, пМ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 мМ	ТТГ 50 мЕ
Интактная ткань	0,90 ± 0,90	3,20 ± 0,49*	1,77 ± 0,50*
Замораживание со скоростью 1–3 °С/мин с концентрацией ДМСО, %			
1	0,82 ± 0,05	2,37 ± 0,24*	0,92 ± 0,12
5	0,95 ± 0,06	3,55 ± 0,88*	1,29 ± 0,08
10	1,36 ± 0,11	5,13 ± 0,37*	2,08 ± 0,21*

Примечание. * достоверно к базальной активности, $p < 0,05$.

The first series of experiments was devoted to study the effect of 2 freezing regimens: slow – 1–3 and rapid one – 85–100 °C/min on adenylate cyclase activity in adrenal cortex and hyroid gland cell membranes (Table 1). After both slow and rapid freezing effects on thyroid gland a slight increase in basal acivity of studied enzyme has been revealed. The preservation of adenylate cyclase sensitivity to NaF was observed. In thyroid gland under rapid freezing the sensitivity of adenylate cyclase to thyrotropic hormone is preserved, but it is lower than in an unfrozen tissue. When investigating adenylate cyclase activity in adrenal cortex cell membranes after their slow and rapid freezing it has been established, that the enzyme does not loose its sensitivity to NaF. The sensitivity of adenylate cyclase to synacten at slow freezing is kept at a lower level, than in the control, and is absent during a rapid freezing. The enzyme basal activity increases at a slow freezing and does not change at a rapid one. An in crease in the enzyme basal activity in adrenal cortex membranes at slow freezing is, probably, related to membrane rearrangements, occuring under cooling [2]. As the investigations have demonstrated, during the cooling process the adenylate cyclase sensitivity to specific stimulators both in thyroid gland and adrenal cortex is preserved in lesser extent.

The investigations on studying adenylate cyclase activity in thyroid gland cell membrane after freezing with the rate of 1–3 °C/min with dimexide solutions of 1, 5 and 10% have been conducted. It is proceeded from the Table 2, that when freezing thyroid tissue with 1- and 5%-dimexide the enzyme basal activity does not change. The application of the 10% dimexide results in a slight increase in adenylate cyclase basal activity. The preservation of enzyme sensitivity to NaF when using all concentrations of cryoprotectant has been established. When freezing thyroid gland tissue with 1- and 5%-dimexide the enzyme sensitivity to a thyrotropic hormone is not kept, it causes a

Table 2

Freezing effect with dimexide on adenylate cyclase activity in thyroid gland cell membranes

Experiment conditions	cAMP concentration, pM/mg of protein per min		
	Basal activity	NaF 40 mM	TTH 50 mUnit
Intact tissue	0.90 ± 0.90	3.20 ± 0.49*	1.77 ± 0.50*
Freezing with the rate of 1–3 °C/min with DMSO concentration, %			
1	0.82 ± 0.05	2.37 ± 0.24*	0.92 ± 0.12
5	0.95 ± 0.06	3.55 ± 0.88*	1.29 ± 0.08
10	1.36 ± 0.11	5.13 ± 0.37*	2.08 ± 0.21*

Note: * statistically significant in respect to basal activity, $p < 0.05$.

Матеріал, захищений авторським правом

аденилатциклазы. Установлено сохранение чувствительности фермента к NaF при использовании всех концентраций криопротектора. При замораживании ткани щитовидной железы с 1- и 5%-м димексидом чувствительность фермента к тиреотропному гормону (ТТГ) не сохраняется, он оказывает стимулирующее действие только при использовании 10%-го димексида. Исследования аденилатциклазы в мембранах кортикоцитов показали увеличение ее базальной активности при замораживании адренокортикальной ткани с димексидом в концентрациях 1; 5 и 10% (табл. 3). Наблюдалось достоверное повышение активности аденилатциклазы, стимулируемой NaF, в условиях замораживания с 5- и 10%-м димексидом. Применение 1%-го димексида незначительно увеличивает активность фторидзависимой аденилатциклазы. Достоверно увеличивается активность аденилатциклазы, стимулируемая синактеном, в условиях замораживания адренокортикальной ткани с 5%-м димексидом. Использование 1- и 10%-го димексида не сохраняет чувствительности аденилатциклазы к синактену.

Таблица 3

Влияние замораживания с димексидом на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников

Условия эксперимента	Концентрация цАМФ, пМ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 мМ	Синактен 10 нМ
Интактная ткань	0,06 ± 0,01	0,66 ± 0,19*	0,19 ± 0,04*
Замораживание со скоростью 1–3 °С/мин с концентрацией ДМСО, %			
1	0,41 ± 0,15	0,76 ± 0,12*	0,15 ± 0,05
5	0,19 ± 0,03	1,01 ± 0,33*	0,46 ± 0,08*
10	0,21 ± 0,09	1,79 ± 0,47*	0,14 ± 0,01

Примечание. * достоверно к базальной активности, $p < 0,05$.

В настоящее время димексид широко применяется как криопротектор при замораживании биологических объектов [5], при этом он обладает широким диапазоном действия на биохимические процессы в клетках [4]. Нами были проведены исследования по изучению активности аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы и коры надпочечников после инкубации фрагментов тканей в растворах димексида (табл. 4). С увеличением концентрации димексида повышается базальная активность фермента. Сохраняется чувствительность аденилатциклазы к NaF после инкубации образцов ткани в 1-, 5- и 10%-м димексиде. Установлено достоверное увеличение активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ, после инкубации в 5- и 10%-м димексиде. Действие 1%-го димексида приводит к незначительному увеличению активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ. Исследование активности аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников показали, что применение всех концентраций димексида увеличивает базальную активность фермента. Сохраняется чувствительность аденилатциклазы к NaF при инкубации образцов ткани в 1-, 5- и 10%-м димексиде. Установлено достоверное увеличение активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ, после инкубации в 5- и 10%-м димексиде. Действие 1%-го димексида приводит к незначительному увеличению активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ. Исследование активности аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников показали, что применение всех концентраций димексида увеличивает базальную активность фермента. Сохраняется чувствительность аденилатциклазы к NaF при инкубации образцов ткани в 1-, 5- и 10%-м димексиде. Установлено достоверное увеличение активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ, после инкубации в 5- и 10%-м димексиде. Действие 1%-го димексида приводит к незначительному увеличению активности аденилатциклазы, стимулируемой ТТГ. Исследование активности аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников показали, что применение всех концентраций димексида увеличивает базальную активность фермента. Сохраняется чувствительность аденилатциклазы к NaF при использовании 1%-го димексида. Установлено сохранение чувствительности фермента к синактену при использовании 5%-го димексида. Использование 1- и 10%-го димексида не сохраняет чувствительности аденилатциклазы к синактену.

Table 3

Freezing effect with dimexide on adenylate cyclase activity in adrenal cortex cell membranes

Experiment conditions	cAMP concentration, pM/mg of protein per min		
	Basal activity	NaF 40 mM	Synacten 10 nM
Intact tissue	0.06 ± 0.01	0.66 ± 0.19*	0.19 ± 0.04*
Freezing with the rate of 1–3 °C/min with DMSO concentration, %			
1	0.41 ± 0.15	0.76 ± 0.12*	0.15 ± 0.05
5	0.19 ± 0.03	1.01 ± 0.33*	0.46 ± 0.08*
10	0.21 ± 0.09	1.79 ± 0.47*	0.14 ± 0.01

Note: * statistically significant in respect to basal activity, $p < 0.05$.

Nowaday dimexide is widely applied as cryoprotectant during biological object freezing [5], thereat it has a wide effect range on biochemical processes in cells [4]. We have accomplished the investigations on studying adenylate cyclase activity in thyroid gland and adrenal cortex cell membranes after tissue fragments incubation in dimexide solutions (Table 4). When augmenting dimexide concentration the enzyme basal activity increases. The adenylate cyclase sensitivity to NaF after the tissue samples incubation in 1, 5 and 10% dimexide is preserved. A statistical significant increase in adenylate cyclase activity, stimulated by TTH after incubation in 5- and 10%-dimexide has been established. The 1%-dimexide effect results in a slight augmentation of adenylate cyclase activity, stimulated by TTH. The investigations of adenylate cyclase activity in adrenal cortex cell membranes have demonstrated, that the application of dimexide all concentrations increases a basal activity of given enzyme, but in contrast to thyroid gland, its activity reduces when increasing the preparation concentration. An increase in adenylate cyclase activity, stimulated by fluoride when using 5- and 10%-dimexide solutions has been established. Dimexide in 1% concentration slightly increases the activity of fluoride-stimulated adenylate cyclase.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 4

Влияние димексида на активность аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной железы

Условия эксперимента	Концентрация цАМФ, пМ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 мМ	ТТГ 50 мЕ
Интактная ткань	0,39 ± 0,04	1,93 ± 0,11*	0,94 ± 0,09*
Димексид в концентрации, %			
1	0,41 ± 0,10	2,11 ± 0,41*	0,57 ± 0,17
5	0,54 ± 0,11	2,57 ± 0,27*	1,15 ± 0,15*
10	0,77 ± 0,13	1,81 ± 0,18*	1,68 ± 0,21*

Примечание. * достоверно к базальной активности, $p < 0,05$.

личивает базальную активность данного фермента, но в отличие от щитовидной железы ее активность снижается с увеличением концентрации препарата. Установлено увеличение активности аденилатциклазы, стимулируемой фторидом, при использовании 5- и 10%-го растворов димексида. Димексид в 1%-й концентрации незначительно увеличивает активность фторидстимулируемой аденилатциклазы. Чувствительность аденилатциклазы к синактену сохраняется только при использовании 10%-го димексида (табл. 5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие димексида на функцию аденилатциклазной системы в данных эндокринных тканях зависит от его концентрации, а также, очевидно, от особенностей структурной организации этих тканей.

Таблица 5

Влияние димексида на активность аденилатциклазы в мембранах клеток коры надпочечников

Условия эксперимента	Концентрация цАМФ, пМ/мг белка/мин		
	Базальная активность	NaF 40 мМ	Синактен 10 нМ
Интактная ткань	0,07 ± 0,01	0,74 ± 0,22*	0,20 ± 0,06*
Димексид в концентрации, %			
1	0,49 ± 0,10	0,75 ± 0,15*	0,35 ± 0,15
5	0,23 ± 0,05	0,60 ± 0,08*	0,29 ± 0,07
10	0,18 ± 0,06	0,67 ± 0,19*	0,41 ± 0,12*

Примечание. * достоверно к базальной активности, $p < 0,05$.

Таким образом, при замораживании фрагментов ткани щитовидной железы без криопротектора аденилатциклаза в препаратах плазматических мембран сохраняет свою чувствительность к специфическому регулятору — тиреотропному гормону на уровне более низком, чем в контроле. В коре надпочечников чувствительность аденилатциклазы к синактену при медленном замораживании сохраняется и отсутствует при быстром. Ее активность после действия NaF в этих тканях при данных условиях замораживания достаточно высокая. При замораживании исследованных нами эндокринных тканей с димексидом криозащитный эффект этого препарата проявляется в 10%-й концентрации для аденилатциклазы в мембранах клеток щитовидной

Table 4

Dimexide effect on adenylate cyclase activity in thyroid gland cell membranes

Experiment conditions	cAMP concentration, pM/mg of protein per min		
	Basal activity	NaF 40 mM	TTH 50 mUnit
Intact tissue	0.39 ± 0.04	1.93 ± 0.11*	0.94 ± 0.09*
Dimexide in concentration, %			
1	0.41 ± 0.10	2.11 ± 0.41*	0.57 ± 0.17
5	0.54 ± 0.11	2.57 ± 0.27*	1.15 ± 0.15*
10	0.77 ± 0.13	1.81 ± 0.18*	1.68 ± 0.21*

Note: * statistically significant in respect to basal activity, $p < 0.05$.

Adenylate cyclase sensitivity to synacten is kept only when using 10%-dimexide (Table 5). The obtained results testify to the fact, that dimexide effect on adenylate cyclase system function in given endocrine tissues depends on its concentration, as well as, obviously, on the peculiarities of these tissues structural organisation.

Table 5

Dimexide effect on adenylate cyclase activity in adrenal cortex cell membranes

Experiment conditions	cAMP concentration, pM/mg of protein per min		
	Basal activity	NaF 40 mM	Synacten 10 nM
Intact tissue	0.07 ± 0.01	0.74 ± 0.22*	0.20 ± 0.06*
Dimexide in concentration, %			
1	0.49 ± 0.10	0.75 ± 0.15*	0.35 ± 0.15
5	0.23 ± 0.05	0.60 ± 0.08*	0.29 ± 0.07
10	0.18 ± 0.06	0.67 ± 0.19*	0.41 ± 0.12*

Note: * statistically significant in respect to basal activity, $p < 0.05$.

Thus, when freezing thyroid gland tissue fragments without cryoprotectant,the adenylate cyclase in plasmatic membrane preparations keeps its sensitivity to a specific regulator — thyrotropic hormone at a lower level, than in the control. In adrenal cortex the adenylate cyclase sensitivity to synacten is preserved during slow freezing and is absent within the rapid one. Its activity after NaF effect in these tissues under given freezing conditions is quite high. During the freezing of studied by us endocrine tissues with dimexide, a cryoprotective effect of this preparation is manifested in 10% concentration for adenylate cyclase in thyroid gland cell membranes and in 5% for adrenal gland. The incubation of thyroid tissue in 5- and 10%- dimexide solutions increases the adenylate cyclase basal activity and keeps its sensitivity to stimulators. Dimexide in 10% concentration causes the same effect in adrenocortical tissue.

Матеріал, захищений авторським правом

железы и в 5%-й для коры надпочечников. Инкубация тиреоидной ткани в 5- и 10%-х растворах димексида увеличивает базальную активность аденилатциклазы и сохраняет ее чувствительность к стимуляторам. В адренокортикальной ткани аналогичное действие оказывает димексид в 10%-й концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белевич А. Э., Зима А. В., Харкун М. Л., Шуба М. Ф.* Роль цАМФ и цГМФ и протеинкиназы С в регуляции кальциевого тока через кальциевые каналы L-типа электровозбудимой мембраны гладкомышечных клеток // Нейрофизиология.– 1998.– 30, № 2.– С. 83–93.
2. *Белоус А. М., Бондаренко В. А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.– Киев: Наук. думка, 1982.– 255 с.
3. *Савченко А. В.* Взаимосвязь между перекисным окислением липидов, антиоксидантной системой, содержанием цАМФ и цГМФ в организме животных при гипоксическом синдроме с гипертермией // Укр. биохим. журн.– 1995.– № 6.– С. 102–105.
4. *Чуйко В. А., Утевский А. М.* Биохимия криоконсервированной щитовидной железы.– Киев: Наук. думка, 1985.– 213 с.
5. *Чуйко В. А.* Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология.– 1989.– № 1.– С. 3–10.
6. *Bech K., Madsen S. N.* Human thyroid adenylate cyclase in nontoxic goitre: sensitivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulines // J. Clin. Endocrinol.– 1978.– 8.– P. 457–466.
7. *Dazord A., Morera A. M., Bertan J., Saez J. M.* Prostaglandin receptors in human and bovine and renal glands: binding and stimulation of adenyl cyclase in subcellular preparations // Endocrinology.– 1974.– 95, № 3.– P. 352.
8. *Neez E. J.* Heterotrimeric G-proteins: organizers of transmembrane signals // Cell.– 1995.– 80.– P. 249–257.
9. *Spiegel A. M.* Receptor-effector coupling by G-proteins: Implications for endocrinology // Trends Endocr. Metab.– 1989.– 1, № 2.– P. 72–76.

Поступила 12.10.99

REFERENCES

1. *Belevich A. E., Zima A. V., Kharkun M. L., Shuba M. F.* Role of cAMP and cGMP and protein kinase C in regulation of calcium current through L-type calcium channels of smooth mucsle cell electroexcitable membrane // Neurofiziologia.– 1998.– 30, № 2.– P. 83–93.
2. *Belous A. M., Bondarenko V. A.* Structural changes of biological membranes during cooling.– Kiev: Nauk. Dumka, 1982.– 255 p.
3. *Savchenko A. V.* Interaction between lipid peroxidation, antioxidant system, cAMP and cGMP content in animals' organism during hypoxical syndrome with hyperthermia // Ukr. Biochem. J.– 1995.– № 6.– P. 102–105.
4. *Chujko V. A., Utevsky A. M.* Biochemistry of cryopreserved thyroid gland.– Kiev: Nauk. dumka, 1985.– 213 p.
5. *Chujko V. A.* Mechanism of cryoprotective efficiency and pharmacological properties of DMSO // Kriobiologiya.– 1989.– № 1.– P. 3–10.
6. *Bech K., Madsen S. N.* Human thyroid adenylate cyclase in nontoxic goitre: sensitivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulines // J. Clin. Endocrinol.– 1978.– 8.– P. 457–466.
7. *Dazord A., Morera A. M., Bertan J., Saez J. M.* Prostaglandin receptors in human and bovine and renal glands: binding and stimulation of adenyl cyclase in subcellular preparations // Endocrinology.– 1974.– 95, № 3.– P. 352.
8. *Neez E. J.* Heterotrimeric G-proteins: organizers of transmembrane signals // Cell.– 1995.– 80.– P. 249–257.
9. *Spiegel A. M.* Receptor-effector coupling by G-proteins: Implications for endocrinology // Trends Endocr. Metab.– 1989.– 1, № 2.– P. 72–76.

Accepted in 12.10.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.014.41: 591.463.1: 697.552.511

UDC 615.361.014.41: 591.463.1: 697.552.511

Криоконсервация спермы реофильной нерки

В. В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

С. В. ЖЕЛТОНОЖКО, В. В. ЖЕЛТОНОЖКО

Камчатский тихоокеанский научно-исследовательский институт рыболовства и океанологии, Петропавловск-Камчатский

Cryopreservation of Rheophylic Sock-Eyed Salmon Sperm

V. V. CHEREPANOV

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

O. V. ZHELTONOZHKO, V. V. ZHELTONOZHKO

Kamchatka Pacific Scientific-Research Institute of Fish Industry and Oceanography, Petropavlovsk-Kamchatsky

Изучено влияние различных криозащитных сред (КЗС), содержащих ДМСО или этиленгликоль в качестве криопротекторов, и режимов охлаждения на криоустойчивость спермиев нерки. Показано, что спермии нерки, замороженные в средах, содержащих ДМСО, по двухэтапной программе до –70 °С, после оттаивания оплодотворяют до 40% икры.

Вивчено вплив різних кріозахисних середовищ (КЗС), які містять ДМСО або етиленгліколь як кріопротектори, і режимів охолодження на кріостійкість спермій нерки. Показано, що спермії нерки, які заморожені в середовищах, що містять ДМСО, за двохетапною програмою до –70 °С, після розморожування запліднюють до 40% ікри.

The authors investigated the action of various cryoprotective media (CPM), containing DMSO or ethylene glycol as cryoprotectants, and modes of cooling on the cryoresistance of the sock-eyed salmon sperm. It was shown that the sperm of sock-eyed salmon, frozen in the DMSO-containing media with a 2-stage program down to –70 °C, fertilize up to 40% of the roe after thawing.

Нерка, или красная (*Oncorhynchus nerka Walbaum*), относится к роду тихоокеанских лососей *Oncorhynchus*, нерестится в реках и озерах Камчатского полуострова. Ценнейший вид для консервной промышленности. Стоимость улова нерки достигала 25% стоимости всего улова камчатских лососей, поэтому народнохозяйственное значение нерки очень велико, однако в настоящее время в результате ухудшения экологической обстановки и нерационального вылова рыбодобывающими предприятиями численность ее уменьшается. Количество вылавливаемой рыбы резко сократилось [11]. В связи с этим целесообразно в кратчайшие сроки сохранить генетическое разнообразие естественных популяций этого вида. Наиболее быстрым и дешевым решением данной задачи является замораживание спермы максимального количества популяций до температуры жидкого азота.

Особей реофильной формы нерки отлавливали в реке Паратунка Камчатской области в нерестовый период. Для получения качественной спермы использовали только зрелых самцов, имеющих выраженный брачный наряд, у которых сперма выливается из полового отверстия при извлечении их из воды или при легком надавливании брюшка. Для этого производителей отлавливали на нерестилищах с помощью сплавных сетей [5, 6].

Sock-eyed or red salmon (*Onchorhynchus nerka Walbaum*) belongs to the genus of Pacific salmons *Onchorhynchus*. It is spawning in the rivers and lakes of the Kamchatka peninsula. It is of extremely high value for cannery. The cost of the sock-eyed salmon catch made up 25% of the cost of the catch of the Kamchatka salmons. That is why the economic value of the sock-eyed salmon is very great, though currently its size is reducing due to aggravation of ecology and irrational catching by fishing enterprises. The amount of the fish being caught was greatly reduced [11]. In this respect it seems expedient to try to preserve the genetic diversity of the natural populations of this species, and do that as soon as possible. The quickest and cheapest solution of this task is freezing of the sperm of the maximum amount of populations down to the temperature of liquid nitrogen.

The species of the rheophylic form of the sock-eyed salmon were caught in the river Paratunka of the Kamchatsky region during their spawning period. To obtain the high-quality sperm only mature male species were used, which had bright wedding colors, and in which the sperm flows out of the sex foramen after taking them out of the water or after gentle pressing of the belly. For this purpose the producers were caught at spawning sites with the help of the floatable nets [5, 6].

Матеріал, захищений авторським правом

Производителей содержали в бассейнах с проточной термостабилизированной речной водой при 10 °С. Получение спермы и икры проводили по мере надобности в лаборатории камчатского криобанка, расположенной на территории Паратунского экспериментального лососевого рыборазводного завода в пос. Термальном. Самцов и самок содержали раздельно.

Сперму от каждого самца сцеживали непосредственно перед обработкой в отдельную сухую посуду и для охлаждения помещали в холодильник на 30 мин. Подвижность (процент клеток, движущихся прямолинейно, поступательно в поле зрения микроскопа) и время движения спермиев определяли визуально под микроскопом при увеличении ×200. Окончанием движения считали остановку 90% подвижных спермиев. В качестве активаторов использовали: речную воду, 1%-й раствор $NaHCO_3$, 10 мМ раствор трис-HCl, *pH* 8,0 и раствор Хаммора (75 мМ мочевины, 100 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$) [3]. Для замораживания использовали следующие среды: 1) среда Копейки (2,95 М этиленгликоля) [4]; 2) модифицированная среда Штайна 1 (130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,5 мМ $CaCl_2$, 20 мМ $NaHCO_3$, 3,4 мМ NaH_2PO_4, 1,7 мМ $MgSO_4$, 5 мМ глюкозы, 66 мМ глицина; 3) модифицированная среда Штайна 2 (130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 20 мМ $NaHCO_3$, 5 мМ глюкозы [11]; 4) модифицированная среда Отта и Хортона [10]. Среды содержали 1,41 М ДМСО и 12,5% желтка. Перед использованием среды хорошо перемешивали. В работе использовали реактивы фирмы "Sigma" (США).

Суспензию клеток разливали в полиэтиленовые ампулы объемом 1 мл и эквилибрировали с КЗС в течение 20 мин. Замораживание проводили по одной из программ: 1) в парах жидкого азота до –70 °С со скоростью 30 °С/мин с последующим погружением в жидкий азот (в полевых условиях в сосуде Дьюара термометром фиксировали расстояние над поверхностью азота в зоне с температурой –70 °С, на этой же высоте укрепляли при помощи подручных средств решетку с ампулами, наполненными спермой, разбавленной КЗС, и через 5 мин охлаждения опускали их в азот); 2) трехэтапная: 1-й этап от 0 °С до –15 °С со скоростью 1–2 °С/мин с кратковременной остановкой в зоне кристаллизации, 2-й этап от –15 до –70 °С со скоростью 15–20 °С/мин, 3-й этап от –70 до –196 °С погружением в жидкий азот.

Образцы отогревали на водяной бане при 40 °С. Скорость охлаждения и отогрева контролировали с помощью медьконстантановой термопары.

Осеменение икры проводили сухим способом при использовании активатора. Сперму (не менее 10^6 сперматозоидов на яйцеклетку) смешивали с икрой (около 500 икринок) и быстро приливали активатор. Икру перемешивали со спермой и через 30–40 с приливали немного воды, перемешивали и доливали водой. Все дальнейшие операции выпол-

The producers were kept in the pools with well-drained thermally stabilized river water at 10 °C. The sperm and roe was harvested in the laboratory of the Kamchatsky cryobank, situated at the site of the Paratunsky experimental salmon-breeding plant in the Thermalny settlement.

The sperm from every male fish was strained immediately before treatment into a separate dry vessel and placed into refrigerator for 30 min for cooling. The motility (portion of the cells, moving translationally and rectilinearly in the field of vision of the microscope) and duration of movement of the sperm were visually assessed with a microscope under a × 200 magnification. Stoppage of 90% of motile spermatozoa was considered as the termination of movement. The following was used as the activators: river water, 1%-solution of $NaHCO_3$, 10 mM solution of tris-HCl, *pH* 8.0, and Hammor's solution (75%-urea, 100 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$) [3]. The following media were used for freezing purposes: 1) Kopeika's medium (2.95 M ethylene glycol) [4]; 2) modified Stein's medium 1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 20 mM $NaHCO_3$, 3.4 mM NaH_2PO_4, 1.7 mM $MgSO_4$, 5 mM sucrose, 66 мМ glycine; 3) modified Stein's medium 2 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM $NaHCO_3$, 5 мМ sucrose [11]; 4) modified Ott's and Horton's medium [10]. Mediums contained 1.41 M DMSO и 12.5% yolk. Prior to usage the media were good mixed. The reagents made by Sigma were used in the work.

The suspension of cells were poured into polyethylene ampoules with the volumes of 1 ml and equilibrated with CPM for 20 min. Freezing was implemented according to one of the programs: (i) in vapors of liquid nitrogen down to –70 °C with the rate of 30 °C/min with subsequent plunging into nitrogen (in the field there was determined the range above the liquid nitrogen, using a thermometer, in which the temperature was –70 °C; then at that height a holder with the ampoules, filled with the diluted CPM, was fixed, and after 5-min cooling they were plunged into the liquid nitrogen; (ii) 3-stage program, the first stage – from 0 °C to –15 °C with the rate of 1–2 °C/min with a short temporary stop in the zone of nucleation, 2nd stage – from –15 °C down to –70 °C with the rate of 15–20 °C/min, 3rd stage – from –70 °C to –196 °C with plunging into the liquid nitrogen.

The samples were thawed on water bath at 40 °C. The rates of cooling and thawing were monitored with acopper-constantanthermocouple.

The roe was fertilized with a dry method using the activator. The sperm (in the amount of not less than 10^6 spermatozoa per oocyte) was mixed with the roe, and the activator was quickly added to it. The roe was mixed with the sperm in 30–40 sec a small amount of water was added, mixed and again the water was poured into the mixture. All further steps were done with a method of Smirnov [5]. The fertilized roe was spread over the frame and left for incubation. In control fertilization was done with fresh sperm.

Матеріал, захищений авторським правом

няли согласно методу Смирнова [2]. Оплодотворенную икру раскладывали на рамке и оставляли на инкубацию. В контроле оплодотворение проводили свежей спермой.

Оплодотворяющую способность спермы определяли в начале развития икры, как описано в [5]. С началом пигментации глаз неразвивающуюся, чаще неоплодотворенную икру отбирали.

Все эксперименты проводили в четырех–пяти повторностях. Статистическую обработку полученных результатов выполняли по методу Фишера–Стьюдента [1].

Подвижность нативных спермиев нерки на любом исследованном активаторе, кроме 10 мМ триса, составляла более 80%. В среде с 10 мМ трис буфером активировалось не более 60% спермиев. Время движения спермиев также было разное. В речной воде оно равнялось 15 ± 5 с, и было несколько меньше, чем в 1%-м растворе бикарбоната натрия (25 ± 6 с). В 10 мМ трис буфере время движения было ниже (38 ± 6 с), чем в активаторе Хаммора (52 ± 11 с). В активаторе Хаммора движение спермиев нерки происходило значительно дольше, чем в других активаторах. В связи с этим сравнение параметров спермы после эквилибрации с КЗС и криоконсервации проводили в активаторе Хаммора. Аналогичные результаты были получены нами на сперме кеты и чавычи [3]

Предварительные многофакторные эксперименты по изучению влияния лецитина и куриного желтка на сохранность спермиев нерки продемонстрировали необходимость их включения в КЗС. Разница между лецитином и куриным желтком была незначительной, что позволило остановиться на более дешевом и доступном компоненте – курином желтке. Концентрационная зависимость показала, что оптимальное содержание куриного желтка в КЗС равняется 12,5%.

Нативная сперма характеризовалась высокой подвижностью, а ее замораживание без применения КЗС приводило к повреждению всех клеток в суспензии. Смешивание спермы с криозащитной средой Штайна 1 не вызывало изменения количества подвижных клеток, но в 2 раза увеличивало время их движения. Эквилибрация в этой среде до 30 мин при 0 °С не влияла на количество подвижных клеток и время их движения. Увеличение времени эквилибрации спермиев до 60 мин приводило к угнетению подвижности на 35% и сокращало время их движения на 62%. Последующая эквилибрация вызывала дальнейшее снижение подвижности, что, очевидно, обусловлено токсическим действием криопротектора. Замораживание-отогрев спермиев нерки в среде Штайна 1 по трехэтапной программе без эквилибрации позволило сохранить подвижность лишь у 10–15% клеток. При этом время их движения составляло всего 5 с. Максимальное сохранение количества подвижных клеток (около 30%) наблюдалось только после 20–30 мин

The fertilizing activity of the sperm was determined at the start of the sperm development, as described elsewhere [5]. With the start of pigmentation of the eyes the non-developing, more frequently, the unfertilized, roe was collected.

All the experiments were staged in 4–5 sequences. The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher's method [1].

The motility of the sock-eyed salmon sperm with any of the used activators, beside 10 mM tris, was more than 80%. In the medium with the 10 mM tris-buffer not more than 60% of the sperm was activated. The duration of motility was also different. In the river water it was 15 ± 5 sec, and was slightly shorter as compared with 1%-sodium bicarbonate (26 ± 6 sec). In the 10 mM tris-buffer the duration of motility was shorter (38 ± 6 sec) as compared with the Hammor's activator (52 ± 11 sec). While in the Hammor's activator the motility of the sperm took much more time as compared with the other two activators. In this respect a comparison of the sperm parameters after equilibration with CPMs and cryopreservation was done in a Hammor's medium. Similar results were obtained with the sperm of chum salmon and king salmon [3].

Preliminary multifactor experiments on studying the effect of lecithin and egg yolk on the viability of the sperm of sock-eyed salmon demonstrated the necessity to incorporate them into the CPM. The difference between lecithin and egg yolk was insignificant, thus making it possible to choose a cheaper and easier available component – egg yolk. A concentration dependency showed that the optimum concentration of the egg yolk in the CPM is 12.5%.

The native sperm was characterized by high motility, and its freeze without application of CPMs resulted in the injury of all cells in the suspension. Mixing of the sperm with a Stein cryoprotective medium 1 did not result in the changes in the amount of the motile cells, but by 2-fold increased the duration of their movement. Equilibration in this medium up to 30 min at 0 °C did not affect the amount of the motile cells and duration of their movement. Prolongation of the time of the sperm equilibration up to 60 min inhibited their motility by 35%, and by 62% shortened the duration of their motility. Subsequent equilibration resulted in further reduction in motility, which is, apparently, due to the toxic action of the cryoprotectant. Freeze-thawing of the sperm of sock-eyed salmon in a Stein's medium 1 by a three-stage program without equilibration permitted to maintain motility only in 10–15% of cells. And the duration of their movement comprised 5 sec only. Maximum maintenance of the amount of the motile cells (about 30%) was observed only after 20–30 min equilibration with a CPM, which is, apparently, due to penetration of DMSO inside the cell. When equilibration of the sperm on a Stein's medium 1 exceeded 30 min, the motility and duration of movement of the sperm were

Матеріал, захищений авторським правом

эквилибрации с КЗС, что, вероятно, связано с проникновением ДМСО внутрь клетки. При эквилибрации спермы в среде Штайна 1 более 30 мин подвижность и время движения спермиев снижались и через 90 мин в поле зрения были лишь единичные качающиеся сперматозоиды. Количество подвижных спермиев при эквилибрации в среде Штайна 2 до замораживания-отогрева не отличалось от предыдущих. Вместе с тем после замораживания-отогрева максимальная подвижность спермиев, эквилибрированных в течение 10–30 мин, была достоверно выше, чем в среде Штайна 1. При этом время движения не изменялось. После 60 мин эквилибрации наблюдалось снижение количества подвижных клеток, но не уменьшение времени движения спермиев. Через 120 мин эквилибрации в среде Штайна 2 и замораживания-отогрева в препаратах встречались одиночные подвижные сперматозоиды.

Эквилибрация и замораживание спермиев нерки в среде Отта показало, что их качество остается таким же, как и в средах Штайна, но снижение подвижности происходит уже в первые 30 мин. Время активного движения спермиев, эквилибрированных в данной среде, на 30% больше, чем в среде Штайна 2. Максимальная подвижность спермиев, криоконсервированных в среде Отта, как и в предыдущих средах, наблюдается после эквилибрации 20–30 мин. При этом количество подвижных клеток, замороженных в среде Отта, на 35% меньше, чем в среде Штайна 2, при сравнимых по значению параметрах длительности активного движения спермиев. В сперме, эквилибрированной в этой среде более 60 мин, после замораживания-оттаивания обнаруживаются лишь одиночные подвижные сперматозоиды.

Разбавление спермы нерки средой Копейка приводило к снижению доли подвижных клеток на 17% по отношению к контролю и незначительному увеличению продолжительности движения. Количество подвижных клеток и время их движения сохранялись в процессе эквилибрации от 0 до 20 мин, а затем постепенно снижались. Замораживание спермы в среде Копейка оказалось малоэффективным: доля подвижных клеток не превышала 10% при оптимальном времени эквилибрации, а время движения было в 2,5–3 раза меньше, чем до криоконсервирования.

Приведенные результаты показывают, что время эквилибрации в КЗС имеет большое значение для сохранения жизнеспособности спермиев нерки при криоконсервации в любой из исследованных сред. Диапазон оптимального времени эквилибрации находится в интервале 10–30 мин. Такая эквилибрация не вызывает снижения подвижности спермиев до замораживания-отогрева и является достаточной для проникновения криопротекторов внутрь клетки, но еще не оказывает токсического эффекта. Сравнение КЗС показывает, что среды, содержащие ДМСО, лучше защищают

reduced, and 90 min later only single swinging spermatozoa were observed in the field of vision. The number of motile sperm during equilibration in a Stein's medium 2 did not differ from the others prior to freeze-thawing. At the same time after freeze-thawing maximum motility of the sperm incubated for 10–30 min was significantly higher as compared with that in a Stein's medium 1. The duration of motility did not change. Following 60-min equilibration the amount of motile cells was reduced, though the duration of motility remained unchanged. Following 120-min equilibration in a Stein's medium 2 and freeze-thawing the preparations evidenced single motile spermatozoa.

Equilibration and freezing of the sock-eyed salmon sperm in an Ott's medium showed that their quality remained the same as in the Stein's media, though reduction in motility occurred in the first 30 min already. The duration of the active movement of the sperm, equilibrated in the given medium, was by 30% higher as compared with that in a Stein's medium 2. Maximum motility of the sperm, cryopreserved in an Ott's medium, alike previous series, was registered after 20–30 min equilibration. Here the amount of the motile cells, frozen in an Ott's medium, was by 35% lower as compared with a Stein's medium 2, while the parameters of duration of the active movement of the sperm were comparable. In the sperm, equilibrated in this medium for more than 60 min, only single motile spermatozoa were evidenced after freeze-thawing.

Dilution of the sock-eyed salmon sperm with a Kopeika medium reduced the portion of the motile cells by 17% as compared with control, and insignificantly prolonged the duration of motility. The number of motile cells and duration of their movement were maintained in the process of 0–20-min equilibration, and then were gradually reduced. Freezing of the sperm in a Kopeika medium turned out to be ineffective: the portion of motile cells did not exceed 10% with the optimum duration of equilibration, while the duration of motility was by 2.5–3-times shorter as compared with that prior to cryopreservation.

The results submitted demonstrate that the duration of equilibration in a CPM is of great importance for maintaining the viability of the sock-eyed salmon sperm during cryopreservation in any of the studied media. The optimum duration of equilibration ranges from 10 to 30 min. Such equilibration does not result in the reduction of the sperm motility prior to freeze-thawing and is sufficient for penetration of the sperm inside the cell, but it does yet exercise a cryoprotective effect. A comparison of the CPMs shows that the DMSO-containing media better protect the sperm against the injury during freezing. Higher results of freezing the sperm on the DMSO-containing CPMs were obtained with a Stein's medium 2, while the duration of motility was maximum in an Ott's medium. That is why in their subsequent experiments the authors used these two media.

Матеріал, захищений авторським правом

спермии от повреждений при замораживании. Более высокие результаты при замораживании спермы на КЗС, содержащих ДМСО, были получены в среде Штайна 2, а время движения было максимальным в среде Отта. Поэтому в дальнейших исследованиях мы использовали эти две среды.

В описанных выше экспериментах охлаждение спермы проводили по классической трехэтапной программе. Однако такой режим трудно осуществлять в полевых условиях, в которых нам чаще всего приходится работать. В [8, 9] описано несколько режимов охлаждения спермы рыб, отличающихся скоростью охлаждения до температуры –70 °С, при которой завершаются процессы кристаллизации жидкой фазы. В связи с этим мы исследовали возможность применения двухэтапной программы замораживания, включающей охлаждение с различной скоростью до –70 °С с последующим погружением образцов в жидкий азот.

Эксперименты проводили в ампулах объемом 1 мл, используя криозащитную среду Штайна 2. Диапазон исследованных скоростей охлаждения составлял 1–50 °С/мин с интервалом 5 °С/мин. Скорости охлаждения до 20 °С/мин не позволяют сохранить подвижность спермиев после замораживания-отогрева больше 20%. В диапазоне скоростей охлаждения от 25 до 40 °С/мин доля подвижных клеток составляла более 20% и при последующем увеличении скорости охлаждения снова снижалась. Оптимальная скорость охлаждения до –70 °С находилась в диапазоне 30–35 °С/мин. Сохранность спермы нерки при использовании двухэтапного режима замораживания с такой скоростью охлаждения была лучше, чем при трехэтапном и проще в реализации.

В отдельной серии экспериментов проводили сравнение нескольких известных режимов замораживания в среде Штайна в зависимости от формы и объема проб. Установлено, что одноэтапное замораживание путем погружения суспензии спермы в гранулах или в контейнерах непосредственно в жидкий азот не позволяет получить подвижную сперму после отогрева. Этот факт свидетельствует о том, что сперма нерки обладает более высокой чувствительностью к низкотемпературному воздействию по сравнению со спермой солоноводных рыб, активность которых сохраняется даже после одноэтапного замораживания [2]. Замораживание спермы в виде гранул объемом 0,2 мл при использовании любого режима охлаждения не дало положительного результата — число подвижных спермиев не превышало 5%. Вероятно, такое низкое качество спермиев, замороженных в гранулах, связано не с режимом охлаждения или составом криозащитной среды, а с невозможностью адекватной оценки качества спермы при помощи визуального наблюдения под микроскопом, поскольку пробы отогревали непосредственно в активаторе,

In the above experiments freezing of the sperm was done by a classic three-stage program. However, such a regimen is difficult to be realized in the field, i.e. under the most often occurring conditions. Elsewhere [8, 9] several modes of cooling the fish sperm were described, differing in the rates of cooling down to the temperature of –70 °C, at which the processes of the liquid phase crystallization are completed. In this respect the authors investigated a possibility of applying a 2-stage freezing program, involving cooling with different rates down to –70 °C with subsequent plunging of the samples into liquid nitrogen.

The experiments were staged with the ampoules of a 1-ml volumes, using a Stein's cryoprotective medium 2. The range of the studied rates of cooling was 1–50 °C/min with the interval of 5 °C/min. The rates of cooling below 20 °C/min do not allow to maintain the viability of the sperm over 20% after freeze-thawing. In the range of cooling rates from 25 to 40 °C/min the portion of motile cells was more than 20%, and was reduced after subsequent acceleration of the rate of cooling. The optimum rate of cooling down to –70 °C was in the range of 30–35 °C/min. The viability of the sock-eyed salmon sperm was higher after applying a 2-stage mode of freezing with this rate as compared with a 3-stage program, and easier to be realized.

A separate series of experiments was staged for comparison of several known modes of freezing in a Stein's medium depending on the shape and volume of the samples. It was found that a 1-stage freezing by plunging the sperm suspension in the forms of granules or containers directly into liquid nitrogen did not allow to obtain the motile sperm after thawing. This is indicative of the fact that the sock-eyed salmon sperm possesses a higher resistance to low temperature exposure as compared with the sperm of salt-water fish, the activities of which are maintained even after a 1-stage freezing [2]. Freezing of the sperm in the form of granules with the volumes of 0.2 ml using any mode of cooling did not produce positive results — the number of motile sperm does not exceed 5%. Apparently, such a low quality of the sperm, frozen in the granules, relates not to the mode of cooling or composition of a cryoprotective medium, but to the impossibility of adequately evaluating the quality of the sperm by visual observation with a microscope, since the samples were thawed directly in the activator, thus initiating the sperm motility immediately after thawing. When thawing the sperm on the stage glass and subsequently activating it the authors failed to identify any motile cells. Probably, due to this Stein rejected the idea to test the quality of the sperm, frozen in the granules, by its motility, and evaluated the efficiency of cryopreservation only by its fertilizing ability [7].

Freezing of the sock-eyed salmon sperm in the ampoules using a 2-stage program demonstrated insignificant differences in the results irrespective of the

Матеріал, захищений авторським правом

что приводило к инициации подвижности сперми-ев сразу после оттаивания. При отогреве спермы на предметном стекле и последующей активации подвижных клеток мы не обнаруживали. Возможно, именно по этой причине Штайн отказался тестировать по подвижности качество спермы, замороженной в гранулах, и эффективность криоконсервирования оценивал только по оплодотворяющей способности [7].

Замораживание спермы нерки в ампулах при помощи двухэтапного режима показало недостоверные отличия в результатах независимо от объема использованных ампул (от 0,2 до 1,5 мл), подвижность оттаянной спермы составляла 20–40%.

При определении эффективности криоконсервирования по оплодотворяющей способности необходимо учитывать, что на практике после оттаивания спермы, замороженной в ампулах, и до оплодотворения проходит определенный период, необходимый для отогрева большого количества ампул, их открытия и смешивания содержимого с соответствующим количеством икры.

Нативная свежеполученная сперма нерки (контроль), характеризующаяся высокой активностью, оплодотворяла более 95% икры. При этом выклев личинки составлял 60–70%. После оттаивания криоконсервированной спермы ее подвижность равнялась $25 \pm 5\%$, а время движения 48 ± 7 с. Сперма с этими параметрами после отогрева оплодотворила $33 \pm 10\%$ яйцеклеток. Хранение ампул с оттаянной спермой на льду в течение 5 мин, моделировавшее условия типичного эксперимента по осеменению икры, не оказывало существенного влияния на подвижность и оплодотворяющую способность спермы нерки, но приводило к резкому уменьшению выклева личинок. Увеличение времени хранения оттаянной спермы перед оплодотворением до 10 мин вызывало значительное угнетение всех исследуемых параметров, а выклев личинки отсутствовал. Через 15 мин хранения деконсервированная сперма была практически полностью неактивной. Приведенные результаты указывают на необходимость максимально быстро использовать криоконсервированную сперму нерки для оплодотворения.

В таблице представлены результаты по оплодотворяющей способности спермы нерки, криоконсервированной по двухэтапной программе, с начальной скоростью охлаждения 30 °С/мин в двух исследованных КЗС. Видно, что нативная сперма нерки обладала высокой оплодотворяющей способностью (96%). Сперма, замороженная в обеих КЗС, после оттаивания оплодотворяла до 40% подвижных клеток, из которых выклюнулось около 15% личинок при 67% в контроле. До-

Влияние криозащитных сред на оплодотворяющую способность оттаянной спермы нерки

Среда	Оплодотворение, %	Выклев, %
Контроль	96 ± 12	67 ± 6
Отта	29 ± 7	15 ± 3
Штайна 2	37 ± 3	16 ± 4

volumes of the ampoules used (from 0.2 to 1.5 ml), and the motility of the thawed sperm was 20–40%.

When determining the efficiency of cryopreservation by the fertilizing ability it should be taken into account that in practice it takes some time from thawing of the sperm, frozen in the ampoules, to its fertilization, which is required for thawing of a large amount of ampoules, their opening and mixing of their contents with the corresponding amounts of the roe.

The native freshly collected sock-eyed salmon sperm (control), which is characterized by high activity, fertilized more than 95% of the sperm. Formation of the larvae comprised only 60–70%. After thawing of the cryopreserved sperm its motility was $25 \pm 5\%$, and duration of motility – 48 ± 7 sec. The sperm with these parameters immediately after thawing fertilized $33 \pm 10\%$ of the oocytes. Storage of ampoules with the thawed sperm on ice for 5 min, modelling the conditions of a routine experiment on fertilization of the roe, did not affect the motility and fertilizing ability of the sock-eyed salmon sperm, but resulted in a rapid reduction in the pecking out of the larvae. Prolongation of the duration of storage of the thawed sperm prior to fertilization up to 10 min produced considerable inhibition of all the studied parameters, and pecking out of the larva was missing. After 15 min of storage the thawed sperm was almost completely inactive. The results submitted testify to the necessity of quickly using the fertilized sock-eyed salmon sperm for fertilization.

The Table shows the results on the fertilizing ability of the sock-eyed salmon sperm, cryopreserved with a 2-stage program, with the initial rate of 30 °C/min in the two studied CPMs. It follows from Table 1 that the native sperm of the sock-eyed salmon possessed a high fertilizing ability (96%). The sperm, frozen in both CPMs, fertilized up to 40% of the motile cells after thawing, out of which 15% of larvae pecked out as compared with 67% in control. No significant differences were revealed in the fertilizing ability of the sperm, cryopreserved in the given CPMs.

The effect of cryoprotective media on the fertilizing ability of the thawed sperm of sock-eyed salmon

Medium	Fertilization, %	Pecking out, %
Control	96 ± 12	67 ± 6
Ott's	29 ± 7	15 ± 3
Stein's 2	37 ± 3	16 ± 4

Subsequently the authors managed to successfully freeze on a Stein's medium 2 and put into a cryobank the sperm of pink salmon (*Onchorychus gorbuscha Walbaum*), Crimean brook trout (*Salmo trutta morpha fario L.*), transient form of Baltic salmon (*Salmo salar L.*), living form of lake salmon (*Salmo salar L.*), rainbow trout (*Salmo irideus Gibbons*) and Donaldson's trout (*Salmo gairdneri*).

The investigations conducted indicate that good fertilization of the thawed sperm of sock-eyed salmon may be achieved when observing the following conditions: (i) equilibration of the sperm in a modified Stein's me-

Матеріал, захищений авторським правом

стоверных отличий в оплодотворяющей способности спермы, криоконсервированной в данных КЗС, выявить не удалось.

В дальнейшем на среде Штайна 2 мы смогли удачно заморозить и заложить в криобанк сперму горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha Walbaum*), крымской ручьевой форели (*Salmo trutta morpha fario L.*), проходную форму балтийского лосося (*Salmo salar L.*), жилую форму озерного лосося (*Salmo salar L.*), радужной форели (*Salmo irideus Gibbons*) и форели Дональдсона (*Salmo gairdneri*)

Проведенные исследования показывают, что хорошего оплодотворения оттаянной спермой нерки можно добиться при соблюдении следующих условий: 1) эквилибрация спермы в модифицированной среде Штайна 2, содержащей 12,5% желтка и 1–1,2 М ДМСО, в течение 20–30 мин на льду; 2) замораживание спермы со скоростью 30 °С/мин до –70 °С; 3) отогрев на водяной бане при 40 °С; 4) оплодотворение в растворе Хаммора в течение не более 5 мин после отогрева.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бейли Н.* Статистические методы в биологии.– М.: Мир, 1964.– 271 с.
2. *Дрокин С. И., Копейка Е. Ф., Грищенко В. И.* Различия в устойчивости к криоконсервированию и специфика липидных составов сперматозоидов морских и пресноводных видов рыб // Докл. АН СССР.– 1989.– 304, № 6.– С. 1493–1496.
3. *Желтоножко О. В., Желтоножко В. В., Черепанов В. В., Петренко А. Ю.* Криоконсервация спермы тихоокеанских лососей Камчатки чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha*) и кеты (*Oncorhynchus keta*) // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 3.– С. 30–34.
4. *Копейка Е. Ф.* Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа.– М.: Изд-во ВНИПРХ, 1986.– С. 9.
5. *Смирнов А. И.* Инструкция по искусственному разведению тихоокеанских лососей.– М.: Рыбное хоз-во, 1963.– 24 с.
6. *Смирнов А. И.* Биология, размножение и развитие тихоокеанских лососей.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1975.– 336 с.
7. *Штайн Г.* Криоконсервация гамет рыб // Пробл. криобиологии.– 1991.– № 3.– С. 42–45.
8. *Leibo S. P., Farrant J., Mazur P. et al.* Effect of freezing on marrow cells suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol // Cryobiology.– 1970.– 6, № 3.– P. 315–332.
9. *Mazur P.* Cryobiology: the freezing of biological objects // Science.– 1970.– 168, № 3934.– P. 939–949.
10. *Ott A. G., Horton H. F.* Fertilization of steelhead trout (*Salmo guairdneri*) eggs with cryopreserved sperm // J. Fish. Res. Board. Can.– 1971.– 28, № 12.– P. 1915–1918.
11. *Stein H., Barle H.* Cryoconservation of the sperm of some freshwater teleosta // Ann. biol. anim. biochem., biophys.– 1978.– 18, № 4.– P. 1073–1076.

Поступила 23.03.99

dium 2, containing 12.5% yolk and 1–1.2 M DMSO for 20–30 min on ice; (ii) freezing of the sperm with the rate of 30 °C/min down to –70 °C; (iii) thawing on water bath at 40 °C; (iv) fertilization in a Hammor's solution for no more that 5 min after thawing.

REFERENCES

1. *Bayley N.* Statistical methods in biology.– M.: Mir publ., 1964.– 271 p.
2. *Drokin S. I., Kopeika E. F., Grischenko V. I.* Differences in resistance to cryopreservation and specific features of lipid compositions of the sperm of seawater and freshwater fish // Dokl. AN SSSR.– 1989.– 304, № 6.– P. 1493–1496.
3. *Zheltonozhko O. V., Zheltonozhko V. V., Cherepanov V. V., Petrenko A. Yu.* Cryopreservation of the sperm of Pacific salmons Onchorychus tshawytscha and Onchorychus keta // Probl. kriobiol.– 1996.– № 3.– P. 30–34.
4. *Kopeika E. F.* Instruction on low temperature preservation of carp sperm.– M.: VIPRH publ., 1986.– P. 9.
5. *Smirnov A. I.* Instruction on artificial breeding of Pacific salmons.– M.: Rybnoye khoz. publ., 1963.– 24 p.
6. *Smirnov A. I.* Biology, reproduction and development of Pacific salmons.– M.: Moscow univer.publ., 1975.– 336 p.
7. *Stein H.* Cryopreservation of fish gametes // Probl. kriobiol.– 1991.– № 3.– P. 42–45.
8. *Leibo S.P., Farrant J., Mazur P. et al.* Effect of freezing on marrow cells suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose or glycerol // Cryobiology.– 1970.– 6, № 3.– P. 315–332.
9. *Mazur P.* Cryobiology: the freezing of biological objects // Science.– 1970.– 168, № 3934.– P. 939–949.
10. *Ott A. G., Horton H. F.* Fertilization of steelhead trout (*Salmo guairdneri*) eggs with cryopreserved sperm // J. Fish Res. Board Can.– 1971.– 28, № 12.– P. 1915–1918.
11. *Stein H., Barle H.* Cryoconservation of the sperm of some freshwater teleosta // Ann. Biol. Anim. Biochem., Biophys.– 1978.– 18, № 4.– P. 1073–1076.

Accepted in 23.03.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612.112.3.014.41

UDC 612.112.3.014.41

Свойства макрофагов мыши в зависимости от методов криоконсервирования

Н. П. ЛОБАСЕНКО, Л. А. ХАНИНА, А. В. ЩЕГЛОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Properties of Mice Macrophages Depending on the Cryopreservation Methods

N. P. LOBASENKO, L. A. KHANINA, A. V. SCHEGLOV

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

Представлены сравнительные данные по изучению сохранности морфологии и функциональной активности моноцитарно-макрофагальных клеток (ММК) мышей после их криоконсервирования с помощью различных криопротекторов (ПЭО-400, ДМСО, ОЭ АцЭА). Полученные результаты позволили сделать вывод о более высоком криопротекторном эффекте использования оксиэтилированного ацетилэтаноламина (ОЭ АцЭА) в качестве криозащитного вещества.

Представлено порівняльні дані щодо вивчення цілості морфології і функціональної активності моноцитарно-макрофагальних клітин (ММК) мишей після їх кріоконсервування за допомогою різних кріопротекторів (ПЕО-400, ДМСО, ОЕ АцЕА). Отримані результати дозволили зробити висновок про більш високий кріопротекторний ефект використання оксиетильованого ацетилетаноламіну (ОЕ АцЕА) як кріозахисної речовини.

Comparative data on the investigation of the integrity of morphology and functional activity of mice monocytic-macrophagal cells (MMC) after their cryopreservation by means of different cryoprotectants (PEO-400, DMSO, OE AcEA) are presented. The obtained results allowed to conclude a higher cryoprotective effect when using oxyethylated acetylethanolamine (OE AcEA) as a cryoprotective substance.

Моноцитарно-макрофагальные клетки являются популяцией клеток, входящих в состав компонентов микроокружения костного мозга. Определение их криоустойчивости в зависимости от способов криоконсервирования, используемых для кроветворных клеток, позволит прогнозировать количество жизнеспособных ММК при криоконсервировании гетерогенной по составу популяции клеток костного мозга. Сведения о сохранности морфологии и функции криоконсервированных клеток весьма противоречивы, что можно объяснить применением криопротекторов различной химической природы, их концентрацией в консервирующей среде, а также вариабельностью режимов замораживания [4, 10–13].

Цель данной работы – сравнительное изучение криоустойчивости популяции ММК в зависимости от используемых криопротекторов: диметилсульфоксида (Me_2SO) интрацеллюлярного действия, полиэтиленоксида (ПЭО-400) смешанного действия и оксиэтилированного ацетилэтаноламина, синтезированного в ИПКиК НАН Украины, также смешанного действия.

Адукты ОЭ АцЭА с оксидом этилена синтезировали на установке с дискретной подачей оксида этилена при температуре 80–120 °С, давлении 4–6 атм с гидроксидом калия в качестве катализатора. Узкие фракции получены дистилляцией этоксилата в глубоком вакууме (10^{-4}–10^{-5} мм рт. ст.) и температуре 95–140 °С. Молекулярно-массовое распределение

Monocyte and macrophage cells are cell population, included to the content of bone marrow microenvironment components. Evaluation of their cryostability depending on the ways of cryopreservation, being used for hemopoietic cells, will allow to forecast the number of viable MMC when cryopreserving heterogenous by its content cell population of bone marrow. The data on the integrity of morphology and cryopreserved cell function are quite contradictory, that may be explained by the application of cryoprotectants of different chemical nature, their concentration in a preserving medium, as well as variability of freezing regimens [4, 10–13].

Comparative study of cryostability of MMC population depending on the cryoprotectants, being used: dymethylsulphoxide (Me_2SO) with intracellular effect, polyethyleneoxide (PEO-400) with a mixed effect and oxyethylated acethylethanolamine also with a mixed effect, being synthesized at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine was the aim of the given work.

OE AcEA aducts with ethylene oxide were synthesized by means of the device with the discrete supply of ethylene oxide under the temperature of 80–120 °C, pressure of 4–6 atm with hydroxide potassium as a catalizer. Thin fractions were obtained by ethoxylate distillation under a deep vacuum (10^{-4} – 10^{-5} mm of merc. col.) and under the temperature of 95–140 °C. Molecular and mass redistri-

Матеріал, захищений авторським правом

олигомеров определяли методом газожидкостной хромографии их триметилсилиловых эфиров [2].

Объектом исследования была активированная суспензия перитонеальных ММК, полученная из перитонеальной полости мышей линии СВА, которым за 72 ч до забоя вводили неспецифический стимулятор — мясопептонный бульон. Макрофаги взвешивали в среде 199 с добавлением 20%-й инактивированной телячьей сыворотки. Криопротекторы добавляли в 10%-й конечной концентрации. Суспензия содержала более 85% ММК, которые замораживали со скоростью 1 °С/мин до –20 °С, затем погружали в жидкий азот. Размораживали суспензию на водяной бане при температуре 40–42 °С. Количество жизнеспособных клеток во взвеси после криоконсервирования определяли с помощью суправитального красителя трипанового синего.

Адгезивные свойства клеток определяли подсчетом прикрепившихся клеток к покровному стеклу на площади 1 мм^2 спустя 15 мин и 1 ч после экспозиции суспензии нативных и криоконсервированных клеток на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах при температуре 37 °С. Клетки вносили в концентрации $1 \cdot 10^4$ в флаконы с покровными стеклами. Суспензионная среда 199 содержала 20% телячьей сыворотки. Через указанные промежутки времени стекла извлекали, дважды осторожно промывали раствором Хэнкса для удаления неприкрепившихся клеток на 1 мм^2 и учитывали процентное содержание прикрепившихся ММК. Через 24 ч изучали только морфологию прикрепившихся клеток.

В таблице показано, что количество жизнеспособных клеток в суспензии, криоконсервированной под защитой ОЭ АцЭА, составило 83,0 ± 2,6%, что не отличалось от количества таких клеток в исходной суспензии (90,0 ± 4,0%), в то время как количество жизнеспособных клеток, консервированных под защитой Me_2SO и ПЭО-400, достоверно снижалось (70,0 ± 2,7 и 66,0 ± 2,3% соответственно). Через 15 мин после инкубации суспензии криоконсервированных клеток при 37 °С количество прикрепившихся клеток на площади 1 мм^2 снижалось (таблица) по сравнению с количеством интактных клеток, прикрепившихся на такой же площади. Следует отметить, что к этому времени все прикрепившиеся интактные клетки имели округлую форму, как правило, с эксцентрично расположенным ядром, обширной цитоплазмой. Во всех криоконсервированных клетках наблюдалась интенсивная вакуолизация, в отдельных — дезинтеграция ядер, размер клеток был меньше, чем размер интактных клеток в культуре.

Через 1 ч после инкубации среди прикрепившихся клеток количество ММК в суспензии интактных и криоконсервированных под защитой ОЭ АцЭА и Me_2SO клеток достоверно не отличалось (таблица), а в суспензиях, криоконсервированных под защитой ПЭО-400, составило

bution of oligomers was evaluated by means of the method of gas and liquid chromatography of their trimethylsilyl ethers [2].

An activated suspension of peritoneal MMC, obtained from peritoneal cavity of CBA line mice, to those non specific stimulator - meat and peptone broth was introduced in 72 hrs before slaughtering. Macrophages were suspended in the 199 medium, adding 20% inactivated calf serum. Cryoprotectants were added under 10% final concentration. Suspension contained more then 85% of MMC, being frozen with the rate of 1 °C/min down to –20 °C, then were immersed into a liquid nitrogen. Suspension was thawed in a water bath under the temperature of 40–42 °C. The number of viable cells in suspension after cryopreservation was evaluated by means of trypane blue supravital dye.

Cell adhesive characteristics were estimated by means of counting of the number of fixed cells to integmentary glass on the area of 1 mm^2 in 15 min and 1 hr after the exposure of native and cryopreserved cell suspension on integmentary glasses in penicilline bottles under the temperature of 37 °C. Cells were introduced in the concentration of $1 \cdot 10^4$ in bottles with integmentary glasses. Suspensive medium 199 contained 20% calf serum. After the mentioned time intervals glasses were taken, two times carefully washed by Henks solution to remove fixed cells on 1 mm^2 and the percentage of fixed MCC was taken into consideration. In 24 hrs only morphology of fixed cells was studied.

The table showed, that the number of viable cells in the suspension, cryopreserved under the protecttion of OE AcEA, made 83.0 ± 2.6%, that did not differ in respect of the number of these cells in an initial suspension (90 ± 4.0), thereat the number of viable cells, cryopreserved under the protection of Me_2SO and PEO-400, statistically decreased (70.0 ± 2.7 and 66.0 ± 2.3%, correspondingly). In 15 min after the incubation of cryopreserved cell suspension at 37 °C the number of fixed cells in the area of 1 mm^2 decreased (the Table) in comparison with the number of intact cells, fixed on an equal area. It should be noted, that up to this time all fixed intact cells have a rounded shape, as a rule, with excentrically located nucleus, extensive cytoplasm. In all cryopreserved cells an intensive vacuolization was observed, in separate ones-nuclei desintegration, cellular size was smaller in comparison with intact cells in culture.

In 1 hr after incubation among fixed cells the MMC number in the suspension of intact and cryopreserved cells under the protection of OE AcEA and Me_2SO significantly did not differ (the Table), and in the suspensions, cryopreserved under the protection of PEO-400, it made 62.0 ± 0.9%. Other fixed cells were presented by lymphocytes, sometimes by segment and nuclear and mast cells. After the cryopreservation, MMC were vacuolized, nuclei desintegration was observed, in cytoplasm cellular fagocyted

Матеріал, захищений авторським правом

Свойства ММК в зависимости от методов криоконсервирования

MMC characteristics depending on the cryopreservation methods

Исследуемые клетки Cells under study	Количество жизнеспособных клеток, % The number of viable cells, %		Количество адгезивных клеток на 1 мм^2 The number of adhesive cells on 1 mm^2				Количество прикрепившихся макрофагов спустя 1 ч инкубации The number of fixed macrophags after 1 hr of incubation	
			спустя 15 мин инкубации after 15 min of incubation		спустя 1 ч инкубации after 1 hr of incubation			
	$x \pm S\bar{x}$	P	$x \pm S\bar{x}$	P	$x \pm S\bar{x}$	P	$x \pm S\bar{x}$	P
Интактные Intact	90,0 ± 4,0	—	65,0 ± 1,5	—	94,0 ± 4,0	—	76,0 ± 1,2	—
Криоконсервированные с ОЭ АцЭА Cryopreserved with OE AcEA	83,0 ± 2,6	> 0,05	34,0 ± 0,7	< 0,05	82,0 ± 1,0	< 0,05	75,0 ± 0,7	> 0,05
Криоконсервированные с Me_2SO Cryopreserved with Me_2SO	70,0 ± 2,7	< 0,05	30,0 ± 1,0	< 0,05	80,0 ± 1,0	< 0,05	70,0 ± 0,8	> 0,05
Криоконсервированные с ПЭО-400 Cryopreserved with PEO-400	66,0 ± 2,3	< 0,05	20,0 ± 1,2	< 0,05	35,0 ± 1,0	< 0,05	62,0 ± 0,9	< 0,05

Примечание. $P < 0,05$ — различия достоверны по сравнению с контролем.

Note. $P < 0.05$ — differences are statistically significant in comparison with the control.

62,0 ± 0,9%. Другие прикрепившиеся клетки были представлены лимфоцитами, изредка сегментноядерными и тучными клетками. После криоконсервирования ММК были интенсивно вакуолизированы, отмечалась дезинтеграция, в цитоплазме наблюдали фагоцитированные фрагменты клеток. Максимальное количество клеток с измененной морфологией (клетки-тени, вакуолизация цитоплазмы, клазматоз, перстневидные формы, дезинтеграция ядер) отмечали в суспензиях клеток, криоконсервированных под защитой ПЭО-400.

В культуре интактных клеток спустя 1 ч экспозиции при температуре 37 °С практически отсутствовали клетки с измененной морфологией. Спустя 24 ч экспозиции интактные клетки были округлой формы с умеренной вакуолизацией цитоплазмы, у части клеток отмечали клазматоз, фагоцитированные фрагменты клеток, дезинтеграцию ядер, отдельные клетки были веретенообразной формы с вытянутой с одной стороны цитоплазмой. К этому сроку наблюдения морфология клеток, криоконсервированных под защитой ОЭ АцЭА и Me_2SO, не отличалась от морфологии интактных клеток (округлые клетки, у части клеток — вакуолизированная цитоплазма, в отдельных клетках дезинтегрированные ядра, единичные — вытянутой формы). В культуре после криоконсервирования клеток с ПЭО-400 количество клеток с морфологическими изменениями было больше по сравнению с нативными и криоконсервированными под защитой ОЭ АцЭА и Me_2SO. Наблюдалось уменьшение размеров клеток.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что криопротектор ОЭ АцЭА высокоэффективен для криоконсервирования суспензии ММК. Количество жизнеспособных и прикрепившихся ММК в суспензии, криоконсервированных под защитой ОЭ АцЭА и Me_2SO, было одинаковым, что позволяет высказать предположение о близких механизмах криозащитно-

fragments were revealed. Maximum cell number with changed morphology (cells-ghosts, cytoplasm vacuolization, clasmatosis, cricoid shapes, nuclei desintegration) were noted in cell suspensions, cryopreserved under PEO-400 protection.

In intact cell culture in 1 hr of exposure under the temperature of 37 °C the cells with changed morphology were practically absent. In 24 hrs of exposure intact cells have a rounded shape with a moderate cytoplasm vacuolization, in some cells clasmatosis, phagocyted cell fragments, nuclei desintegration were revealed, separate cells have spindle-like shape with a elongated form one side cytoplasm. To this time morphology of the cells, cryorpeserved under the protection of OE AcEA and Me_2SO, did not differ in respect of morphology of intact cells (rounded cells, in some cells cytoplasm was vacuolized, in separate cells — desintegrated nuclei, single ones have a elongated shape). In culture after cell cryopreservation with PEO-400 the number of cells with morphological changes was higher in comparison with native and cryopreserved under OE AcEA and Me_2SO ones. A reduction of cell sizes was observed.

The data presented testify, that OE AcEA is highly efficient cryoprotectant for cryopreservation of MMC suspension. The number of viable and fixed MMC in the suspension, cryopreserved under the protection of OE AcEA and Me_2SO, was similar, that allowed to suppose about similar mechanisms of cryoprotective effect of the mentioned cryoprotectants and their high cryoprotective efficiency.

It has been established, that after cryopreservation the characteristics of receptors and structures, participating in the realization of cell adhesive activity change reversibly. The reduction of cell adhesive activity, their ability to sprawl on a glass occurred, apparently, in the result of the change of physical and chemical characteristics and electric potentials of mem-

Матеріал, захищений авторським правом

го действия указанных криопротекторов и их высокой криозащитной эффективности.

Установлено, что после криоконсервирования обратимо изменяются свойства рецепторов и структур, участвующих в реализации адгезивной активности клеток. Снижение адгезивной активности и способности клеток распластываться на стекле происходило, по всей видимости, вследствие изменения физико-химических свойств и электрических потенциалов компонентов мембран, кластеризации липидов, белков, повышения вязкости отдельных компонентов мембран. В процессе криоконсервирования рецепторы мембран клеток могут быть потеряны или изменяется топография их расположения на мембране и, как следствие, нарушается адгезивная активность клеток. Поскольку при адгезии клеток определенную роль играет фибронектин [2], одной из причин снижения адгезивной активности криоконсервированных клеток может быть нарушение свойства фибронектина. Рецепторы поверхностных мембран клеток могут обновляться довольно быстро и увеличение количества прикрепившихся клеток по мере увеличения времени культивирования криоконсервированных клеточных суспензий можно объяснить тем, что восстанавливаются физико-химические свойства фибронектина.

В литературе имеются сведения о морфологических и функциональных изменениях в охлажденных либо криоконсервированных клетках, но данные единичные и противоречивые. Например, отмечено, что охлаждение клеток до 18 °С приводит к нарушению их способности образовывать выросты цитоплазмы, клетки принимают округлую форму [1]. По данным [8], криоконсервированные альвеалярные макрофаги не снижали своей адгезивной активности, свойства их цитоскелета не изменялись. Приводятся данные о высоком проценте жизнеспособных криоконсервированных моноцитов человека, фибринолитическая активность которых снижалась [9]. Показано изменение фагоцитарной активности криоконсервированных моноцитов человека в отношении *Str. aureus* [7]. В [13, 14] указывается, что продуцирование интерлейкина-6, интерферона после криоконсервирования моноцитов человека возрастает по сравнению с интактными клетками. Полученные результаты позволили использовать эти клетки в клинической практике. Показано, что после криоконсервирования блоков легочной ткани при культивировании ее после отогрева не отмечено различий в морфологии клеток и синтезе дезоксирибонуклеиновой кислоты в полученных клетках как из свежей, так и криоконсервированной ткани, из которых мигрировали макрофагальные, дендритные и эпителиальные клетки [10].

Таким образом, криопротекторы смешанного действия ОЭ АцЭА и Me_2SO более эффективны для криоконсервирования ММК. В отличие от Me_2SO, который является токсичным веществом

brane components, protein lipid clasterization and an increase of some membrane components viscosity. During cryopreservation cellular membrane receptors may be lost or the topography of their location in a membrane may change and, as a result, cell adhesive activity decreases. One of the causes of adhesive activity reduction of cryopreserved cells may be the damage of fibronectin properties, because during cell adhesion fibronectin [2] plays a certain role. Receptors of surficial cell membranes can to renew quite rapidly and the augmentation of the number of fixed cells with the increase of culturing time of cryopreserved cellular suspensions may be explained by the fact, that fibronectin physical and chemical characteristics recover.

There are some literature data on morphological and functional changes in cooled or cryopreserved cells, but these data are either single or contradictory. For example, it has been noted, that cell cooling down to 18 °C results in the damage of their ability to form cytoplasm outgrowings, cells gain a rounded shape [1]. According to the data [8], cryopreserved alveolar macrophages did not reduce their adhesive activity, their cytoskeletal characterstics did not change. The data on a high percentage of viable human cryopreserved monocytes, fibrinolysis activity of those decreased [9], are demonstrated. The change of phagocyte activity of human cryopreserved monocytes regarding to Str. Aureus [7] has been shown. In [13, 14] it has been pointed, that the production of interleukin-6 and interferone after human monocyte cryopreservation increases in comparison with intact cells. The results obtained allowed to recommend the usage of these cells in a clinical practice. It has been shown, that after the cryopreservation of lung tissue blocks during its culturing after thawing the differences in cell morphology and desoxyrybonucleic acid (DRNA) synthesis in the cells, obtained both from a fresh tissue and cryopreserved one, from those macrophagal, dendrite and epithelial cells migrated [11], were not found.

Thus, OE AcEA and Me_2SO cryoprotectants with a mixed effect are more efficient for MMC cryopreservation. In contrast to Me_2SO, that is a toxic substance [5, 6] it is necessary to remove it before the introduction in an organism; OE AcEA with its low toxicity is not removed before the introduction into an organism, so it is preferable to use it for MMC cryopreservation. PEO-400 cryoprotectant with a mixed effect is less efficient in comparison with Me_2SO and OE AcEA. Under its protection in cells at all cryopreservation stages more manifested non-lethal damages appear, that not repaired, or repair in more distant terms, than when cryopreserving cells under the protection of Me_2SO and OE AcEA.

REFERENCES

1. *Bershadsky A. D., Vasilyev Yu. M.* Rounding of cells of variant sublines, caused by a moderate decrease of the temperature // Tsitologiya.– 1979.– 21, № 6.– P. 703–709.
2. *Vasilyev Yu. M., Melnikov A. G.* Cellular surface and cell response.– L.: Meditsina, 1968.– 184 p.

Матеріал, захищений авторським правом

[5, 6] и его необходимо удалять перед введением в организм, ОЭ АцЭА из-за малой токсичности не удаляется перед введением в организм и по этой причине его предпочтительно использовать для криоконсервирования ММК. Криопротектор ПЭО-400 смешанного действия оказался менее эффективным, чем ОЭ АцЭА и Me_2SO. Под его протекцией в клетках на этапах криоконсервирования возникают более выраженные нелетальные повреждения, которые либо не репарируются, либо репарируются в более отдаленные сроки, чем при криоконсервировании клеток под защитой Me_2SO и ОЭ АцЭА.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бершадский А. Д., Васильев Ю. М.* Округление клеток вариантных сублиний линии, вызванное умеренным понижением температуры // Цитология.– 1979.– 21, № 6.– С. 703–709.
2. *Васильев Ю. М., Мельников А. Г.* Клеточная поверхность и реакция клеток.– Л.: Медицина, 1968.– 184 с.
3. *Закупра В. А.* Методы анализа и контроля в производстве поверхностно-активных веществ.– М.: Химия, 1977.– 367 с.
4. *Цуцаева А. А., Лобасенко Н. П., Марценюк В. Ф., Чижевская И. В.* Морфофункциональная характеристика перитонеальных макрофагов мышей после криоконсервации // Цитология и генетика.– 1984.– № 5.– С. 332–338.
5. *Branch D. R., Calderwood S. et al.* Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethylsulphoxide toxicity // Transfusion.– 1994.– 34, № 10.– P. 887–890.
6. *Galmus A., Besalduch J. et al.* Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethylsulphoxide at –80 °C without the rate of controlled freezing // Transfusion.– 1996.– 36, № 9.– P. 794–797.
7. *Hansen J. B., Halvorsen D. S. et al.* Retention of phagocytic functions in cryopreserved human monocytes // J. Leukoc. Biol.– 1995.– 57, № 2.– P. 235–241.
8. *Lamb L. S. Fr., Willoughby J. B., Willoughby W. F.* Morphologic and functional characteristics of alveolar macrophages following cryopreservation // Cryobiology.– 1995.– 23, № 4.– P. 344–357.
9. *Osnes L. T., Westvik A. B., Kierulf P.* Procoagulant and profibrinolytic activity of cryopreserved human monocytes // Thromb. Res.– 1994.– 76, № 4.– P. 373–383.
10. *Roth M., Soler M., Hornung M. et al.* Cell cultures from cryopreserved human lung tissue // Tissue Cell.– 1992.–24, № 4.– P. 455–459.
11. *Sputtek A., Getter S. et al.* Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques // Beitr. Infusionsther transfusionsmed.– 1997.– 34.– P. 79–83.
12. *Teasdale B., Lieber V. K. et al.* Cryopreservation of cultured dermal fibroblast impregnanted collagen gells // Burns.– 1993.– 19, № 5.– P. 406–410.
13. *Venkataraman M.* Effects of cryopreservation on immune responses. VII. Freezing induced enhancement of IL-6 production in human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology.– 1994.– 31, № 5.– P. 468–477.
14. *Venkataraman M.* Effects of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human periferal blood mononuclear cells // Cryobiology.– 1995.– 32, № 6.– P. 528–534.

Поступила 12.10.99

3. *Zakupra V. A.* The methods for analysis and control in the production of surficially active substances.– M.: Khimiya, 1977.– 367 p.
4. *Tsutsayeva A. A., Lobasenko N. P., Martsenyuk V. F., Chizhevskaya I. V.* Morphofunctional characteristics of mice peritoneal macrophages after cryopreservation // Tsitologiya i genetika.– 1984.– № 5.– P. 332–338.
5. *Branch D. R., Calderwood S. et al.* Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethylsulphoxide toxicity // Transfusion.– 1994.– 34, № 10.– P. 887–890.
6. *Galmus A., Besalduch J. et al.* Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethylsulphoxide at –80 °C without the rate of controlled freezing // Transfusion.– 1996.– 36, № 9.– P. 794–797.
7. *Hansen J. B., Halvorsen D. S. et al.* Retention of phagocytic functions in cryopreserved human monocytes // J. Leukoc. Biol.– 1995.– 57, № 2.– P. 235–241.
8. *Lamb L. S. Fr., Willoughby J. B., Willoughby W. F.* Morphologic and functional characteristics of alveolar macrophages following cryopreservation // Cryobiology.– 1995.– 23, № 4.– P. 344–357.
9. *Osnes L. T., Westvik A. B., Kierulf P.* Procoagulant and profibrinolytic activity of cryopreserved human monocytes // Thromb. Res.– 1994.– 76, № 4.– P. 373–383.
10. *Roth M., Soler M., Hornung M. et al.* Cell cultures from cryopreserved human lung tissue // Tissue Cell.– 1992.–24, № 4.– P. 455–459.
11. *Sputtek A., Getter S. et al.* Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques // Beitr. Infusionsther transfusionsmed.– 1997.– 34.– P. 79–83.
12. *Teasdale B., Lieber V. K. et al.* Cryopreservation of cultured dermal fibroblast impregnanted collagen gells // Burns.– 1993.– 19, № 5.– P. 406–410.
13. *Venkataraman M.* Effects of cryopreservation on immune responses. VII. Freezing induced enhancement of IL-6 production in human peripheral blood mononuclear cells // Cryobiology.– 1994.– 31, № 5.– P. 468–477.
14. *Venkataraman M.* Effects of cryopreservation on immune responses. VIII. Enhanced secretion of interferon-gamma by frozen human periferal blood mononuclear cells // Cryobiology.– 1995.– 32, № 6.– P. 528–534.

Accepted in 12.10.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.37.014.413+57.043

UDC 615.361.37.014.413+57.043

Влияние режимов криоконсервирования на сохранность микрофрагментов поджелудочной железы поросят

Б. П. САНДОМИРСКИЙ, Н. А. ВОЛКОВА, С. Е. ГАЛЬЧЕНКО, И. В. БЕЛОЧКИНА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The Effect of Cryopreservation Regimens on the Integrity of Microfragments of Piglets' Pancreas

B. P. SANDOMIRSKY, N. A. VOLKOVA, S. E. GALCHENKO, I. V. BELOCHKINA
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Исследовано влияние ДМСО, глицерина, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в 10%-й концентрации и скоростей охлаждения 1, 10, 25, 100, 1 000 °С/мин на функциональные свойства криоконсервированных микрофрагментов островковой ткани поджелудочной железы (ОТПЖ) однодневных поросят. Показано, что лучшую сохранность интенсивности дыхания обеспечивают ДМСО и ПЭО-1500, причем ПЭО-1500 более эффективен в диапазоне скоростей охлаждения от 10 до 1 000 °С/мин, а ДМСО — при низких скоростях замораживания (1 °С/мин). В культуре ОТПЖ после криоконсервирования при скорости 1 °С/мин с ДМСО и ПЭО-1500 обнаруживается высокая инсулинпродукция, трехкратно увеличивающаяся в ответ на глюкозную нагрузку.

Досліджено вплив ДМСО, гліцерину, ПЕО-400 та ПЕО-1500 у 10%-й концентрації та швидкостей охолодження 1, 10, 25, 100, 1 000 °С/хв на функціональні якості кріоконсервованих мікрофрагментів острівцевої тканини підшлункової залози (ОТПЗ) одноденних поросят. Показано, що збереження інтенсивності дихання краще забезпечують ДМСО та ПЕО-1500, при цьому ПЕО-1500 є більш ефективним в діапазоні швидкостей охолодження від 10 до 1 000 °С/хв, а ДМСО — при низьких швидкостях охолодження (1 °С/хв). У культурі ОТПЗ після кріоконсервування при швидкості 1 °С/хв з ДМСО і ПЕО-1500 виявлено високу інсулінпродукцію, яка трикратно підвищується у відповідь на глюкозне навантаження.

The effect of DMSO, glycerol, PEO-400 and PEO-1500 under 10% concentration and cooling rates of 1, 10, 25, 100, 1 000 °C/min on the functional properties of cryopreserved microfragments of pancreas islet tissue of one-day piglets has been investigated. It has been shown, that DMSO and PEO-1500 provide the highest integrity of respiration intensity, PEO-1500 is more efficient in the range of cooling rates from 10 to 1 000 °C/min and DMSO — at low freezing rates (1 °C/min). In the pancreas islet tissue culture after cryopreservation a high insulin-production, increasing (in three times) in response to glucose loading is revealed at the rate of 1 °C/min.

Лечение сахарного диабета и его осложнений остается одной из актуальнейших проблем современной медицины. Целесообразность применения для этих целей метода трансплантации островковой ткани поджелудочной железы экспериментально и клинически подтверждена в Украине и за рубежом [2, 3, 10]. Для успешной трансплантации может быть использован материал поджелудочной железы (ПЖ) плодов человека и животных или новорожденных животных — свиней, кроликов, крупного рогатого скота [2].

В последние 15 лет описаны попытки криоконсервировать материал ПЖ крыс, мышей, морских свинок, свиней, собак, обезьян и человека [6, 11]. Анализ известных результатов показывает, что отсутствует универсальный способ подготовки островков к замораживанию и не разработан единый протокол замораживания. При этом остается неясным, почему различаются деконсервированные препараты островков из отдельных образцов: из-за разных оптимальных скоростей охлаждения-оттаивания, разных скоростей проникновения и токсичности криопротектора или из-за каких-то иных причин. Скорости охлаждения, обеспечивающие

The treatment of Diabetes mellitus and its complications remains one of an actual problems of modern medicine. The expediency of the application of the method of pancreas islet tissue transplantation for these purposes is experimentally and clinically confirmed in the Ukraine and abroad [2, 6, 10]. For a successful transplantation the material of pancreas of human and animals fetuses or one from new-born animals — pigs, rabbits, cattle can be used [2].

The attempts to cryopreserve pancreas material of mice, guinea pigs, pigs, dogs, monkeys and human are described [5, 11]. The analysis of known results shows, that universal method for islets preparing to freezing as a single freezing protocol is absent. Thereat it is not clear, why frozen-thawed islet preparations of separate samples differ: because of different optimal cooling-thawing rates, different rates of cryoprotectant's penetration and toxicity or some other causes? Cooling rates, providing integrity of pancreas tissue, according to the data [5, 11] varied from very slow (0,25 °C/min) to more rapid ones (75 °C/min). Practically the majority of works on islet cryopreservation are carried-out with the usage of DMSO or glycerol as cryoprotectants. Besides the mixtures of cryopro-

Матеріал, захищений авторським правом

сохранность ткани ПЖ, по данным [6, 11], варьируют от очень медленных (0,25 °С/мин) до более быстрых (75 °С/мин). Практически большинство работ по криоконсервированию островков проведено с использованием в качестве криопротектора ДМСО либо глицерина. Кроме того, применяются смеси криопротекторов, обеспечивающие стеклование [8]. Описаны некоторые оригинальные подходы к оптимизации процесса криоконсервирования ОТПЖ. Так, островки ПЖ, помещенные в микрокапсулы, были на 20% устойчивее к повреждающим факторам замораживания-отогрева, чем свободные островки [4]. Доказано также, что кокультивирование с клетками Сертоли значительно повышает количество и улучшает функциональные свойства криоконсервированных островков [9]. В [5] отмечено положительное влияние обработки островков ПЖ перед замораживанием антиоксидантами.

Задачей настоящего исследования было изучение влияния условий охлаждения, включающих особенности создаваемой криобиологической системы и температурный режим охлаждения биоматериала до азотных температур, на функциональные характеристики ОТПЖ. Исходным материалом для получения культуры являлась поджелудочная железа новорожденных поросят, которые в качестве донора трансплантационного материала были взяты в силу физиологического и антигенного сходства человека и свиньи, предельной близости структур молекул свиного и человеческого инсулина, отсутствия опасности переноса человеческой вирусной инфекции, а также необходимости решения морально-этических проблем.

Железы иссекали до фрагментов 0,1–1,0 мм в диаметре и помещали в среду культивирования на основе среды 199. Культивирование вели на протяжении 7 сут при температуре 36 °С. Среду меняли по мере ее закисления, а в экспериментах, связанных с определением базальной секреции инсулина фрагментами ПЖ, — ежесуточно. Сохранность биологического материала определяли полярографическим методом по интенсивности эндогенного дыхания. При этом интенсивность дыхания пересчитывали на 1 мг влажного веса ткани. Устойчивость мембранных структур к перекисному окислению оценивали с помощью хемилюминесцентного метода, измеряя интенсивность хемилюминесценции образцов, индуцированной перекисью водорода и двухвалентным железом [1]. Содержание инсулина в среде культивирования определяли радиоиммунологически с помощью наборов РИО-ИНС-ПГ-^{125}I (Беларусь).

Образцы замораживали в пластиковых ампулах объемом 1,5 мл и в контейнерах из алюминиевой фольги на замораживателе УОП-6 или с помощью устройства для замораживания биологических объектов [11] со скоростью 1, 10, 25, 100 и 1 000 °С/мин. После эквилибрации с криопротектантами, providing vitrification, are applied [8]. Some original approaches to the optimization of the PIT cryopreservation process are described. Thus pancreas islet, being put in microcapsules, were by 20% more stable to freezing-thawing damaging factors in comparison with free islets [3]. It also has been proved, that co-culturing with Sertoli cells considerably increases the number of cryopreserved islets and improves their functional properties [9]. It has been noted [4] the positive effect of pancreas islets treatment by antioxidants before freezing.

The aim of the given work was to study the effect of cooling conditions, including peculiarities of created cryobiological system and temperature regimen of biomaterial cooling down to nitrogen temperature on the PIT functional characteristics. Pancreas of new-born piglets, that were the donors of transplantational material served as an initial material for culture obtaining because of human and pig physiological and antigen similarity, likeness of molecule structure of human and pig insulin as well as the absence of the danger to transfer human viral infection and necessity to solve moral and ethic problems.

Pancreas glands were cut to fragments of 0.1–1.0 mm in diameter and put in the culture medium on the base of 199 medium. Culturing was carried-out during 7 days under the temperature 36 °C. Medium was changed as far as its oxidation, and in the experiments, connected with the determination of insulin basal secretion by pancreas fragments medium was changed every day. Integrity of biological material was estimated by means of polarographic method by the intensity of endogenous respiration. Thereat respiration intensity was evaluated on 1 mg of wet tissue weight. Stability of membrane structures to peroxidation was estimated by means of chemiluminescent method, evaluating the intensity of chemiluminescent samples, induced by hydrogen peroxide and bivalent iron [1]. Radioimmunological insulin content in the cultivation medium was estimated by means of RIA-INS-^{125}I sets (Belarus).

Samples were frozen in plastic 1.5 ml ampoules and in aluminium foil containers by the programme refrigerator or by means of device for freezing biological objects [11] with the rate of 1, 10, 25, 100 and 1 000 °C/min. After the equilibration with cryoprotectant during 15 min at room temperature material was put on 5 min in a water base with the temperature of 0 °C and frozen. Thawed on a water base with the temperature 37 °C. DMSO, glycerol, PEO-400 and PEO-1500 in 10% concentration were used as cryoprotectants. Freezing was conducted in 5–7th day of cultivation, when insulin-producing function leaves its minimum, and exocrinic tissue already died. Tissue, being frozen according to many-stage program [7], was used as the control.

The data on the intensity of endogenous aspiration of PIT fragments after cryopreservation are presented in the table. It is shown, that DMSO and PEO-1500

Матеріал, захищений авторським правом

тором в течение 15 мин при комнатной температуре материал помещали на 5 мин в водяную баню с температурой 0 °С и замораживали. В качестве криопротекторов использовали ДМСО, глицерин, ПЭО-400 и ПЭО-1500 в 10%-й концентрации. Отогревали на водяной бане при температуре 37 °С. Замораживали на 5–7-е сутки культивирования, когда инсулинпродуцирующая способность выходит из минимума, а экзокринная ткань уже погибла. Для контроля использовали ткань, замороженную по многоэтапной программе [7].

В таблице представлены данные интенсивности эндогенного дыхания фрагментов ОТПЖ после криоконсервирования. Видно, что лучшую сохранность интенсивности дыхания обеспечивают ДМСО и ПЭО-1500, причем ПЭО-1500 является эффективным в диапазоне скоростей охлаждения от 10 до 1 000 °С/мин, в то время как ДМСО в условиях эксперимента обеспечивает

Влияние скорости охлаждения и криопротекторов на интенсивность эндогенного дыхания деконсервированных культур ОТПЖ

Условия эксперимента**	Интенсивность эндогенного дыхания, нмоль O_2/мин·мг ткани, при скорости охлаждения, °С/мин				
	1	10	25	100	1 000
Без криопротектора	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
ДМСО	0,28 ± 0,02*	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Глицерин	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01
ПЭО-1500	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,02
ПЭО-400	0,20 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Контроль	0,31 ± 0,02				

Примечания. * — различия достоверны ($p < 0,05$) в пределах данной скорости охлаждения; ** — концентрация криопротекторов 10%; в каждой серии экспериментов $n = 8–10$.

большую интенсивность дыхания при низких скоростях замораживания (1 °С/мин). При замораживании образцов по многоэтапной программе [1] интенсивность дыхания составила 0,26 ± 0,03 нмоль O_2/мин · мг ткани. Таким образом, не выявлено преимуществ многоэтапной программы замораживания перед одноэтапной. При изучении влияния больших скоростей охлаждения (> 1 000 °С/мин) на интенсивность дыхания нами отмечено наличие второго максимума уровня дыхания при скорости охлаждения порядка 8 000 °С/мин, однако он несколько меньше, чем при медленных скоростях охлаждения.

Вместе с тем показано, что криоконсервирование в любом случае приводит к более или менее значительным нарушениям мембранных структур клеток и снижению их устойчивости к перекисному окислению, что выражается в увеличении индуцированной хемилюминесценции в 1,5–2 и более раза в зависимости от режима консервирования. Это может быть объяснено как механическими или химическими повреждениями мембран, так и исто-

The effect of cooling rate and cryoprotectants on the intensity of endogenous respiration of depreserved PIT cultures

Experimental conditions**	Intensity of endogenous repiration, 03 nM of O_2/min·mg of tissue at cooling rates, °C/min				
	1	10	25	100	1 000
Without cryoprotectant	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
DMSO	0.28 ± 0.02*	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Glycerol	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.01
PEO-1500	0.22 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.02
PEO-400	0.20 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Control	0.31 ± 0.02				

Notes: * — differences are statistically significant ($p < 0.05$) in the range of the given cooling rate; ** — concentration of 10% cryoprotectants; in each series of experiments $n = 8–10$.

provide the highest stability of aspiration intensity and PEO-1500 is effective in a range of rates from 10 to 1 000 °C/min. When freezing samples according to multiple-stage program [1] aspiration intensity made 0.26 ± 0.03 nM of O_2/min·mg of tissue. Thus, the advantages of many-stage freezing program were not reveled in comparison with one-stage one. When studying the effect of the highest cooling rates (> 1 000 °C/min) on the aspiration intensity the presence of the second maximum of aspiration level at cooling rate near 8 000 °C/min has been noted.

It is also has been shown, that cryopreservation in every case results in more or less considerable damages of cell membrane structures and decrease of its stability to peroxidation, that manifests in the augmentation of induced chemiluminescence in 1.5–2 and more times, depending on the cryopreservation regimen. This fact may be explained both mechanical and chemical membrane damages and exhaustion of endogenous antioxidants.However this question requires the further investigation.

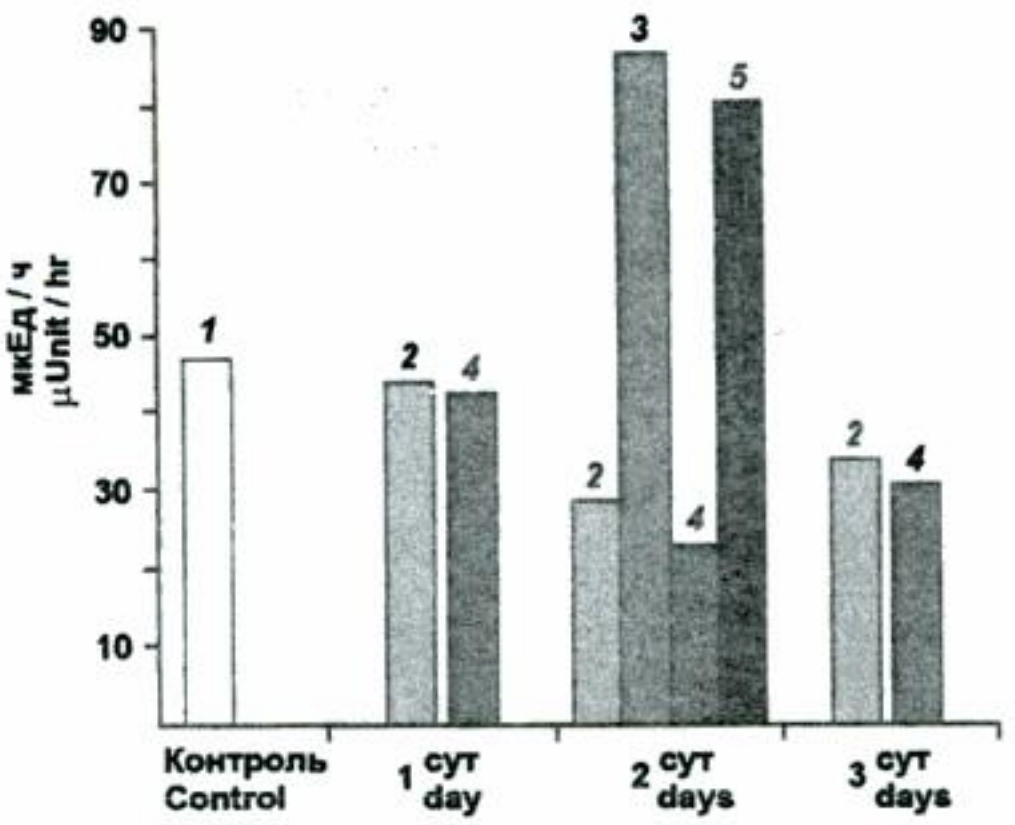
As it is known, the intensity of tissue respiration is integral non-specific characteristic of biomaterial integrity. The investigation of basal and stimulated insulin secretion by PIT cultures, being frozen under the protection of DMSO and PEO-1500 with the rate of 1 °C/min (Figure) has been carried-out. It should be noted, that considerable differences in cryoprotectant effect on PIT microfragments between DMSO and PEO-1500 were not revealed. The obtained data show, that storage of frozen-thawed PIT explants under cultivation conditions results in a considerable increase of insulin content in the medium, that makes within the given experiments series no less than 1 000 μunits on a test (one pancreas) to the end of the first day of cultivation (in the figure the data on insulin-production are presented as an average rate of insulin yield – μunits/hrs). It is not excluded, that insulin, passively being injected in a cultural medium from the part of damaged insulin-producing cells, makes a definite contribution in this index. When increasing glucose concentration up to stimulating

Матеріал, захищений авторським правом

щением эндогенных антиоксидантов. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Как известно, интенсивность тканевого дыхания является интегральной неспецифической характеристикой сохранности биоматериала. Далее было проведено изучение базальной и стимулированной секреции инсулина культурами ОТПЖ, замороженными под защитой ДМСО и ПЭО-1500 со скоростью 1 °С/мин (рисунок). Отметим, что существенных различий в криопротекторном действии на микрофрагменты ОТПЖ между ДМСО и ПЭО-1500 не обнаружено. Полученные данные показывают, что помещение размороженных эксплантатов ОТПЖ в условия культивирования приводит к существенному увеличению содержания инсулина в среде, что составляет в пределах данной серии экспериментов не менее 1 000 мкЕд на пробу (одна ПЖ) к концу первых суток культивирования (на рисунке данные по инсулинпродукции представлены в виде средней скорости выхода инсулина — мкЕд/ч). Не исключено, что определенный вклад в этот показатель вносит инсулин, пассивно вышедший в культуральную среду из части разрушенных инсулинпродуцирующих клеток. При увеличении концентрации глюкозы до стимулирующих значений (16,7 ммоль/л) происходит выброс инсулина: в течение 3 ч концентрация гормона достигает 250 мкЕд/мл. Возврат биоматериала в условия с низким содержанием глюкозы (5,6 ммоль/л) приводит к снижению продукции инсулина до значений менее 800 мкЕд/мл·сут. Таким образом, мы наблюдали адекватный ответ биоматериала на нагрузку глюкозой, заключающийся практически в трехкратном увеличении концентрации инсулина в среде в течение короткого (3 ч) отрезка времени. На вторые и третьи сутки культивирования величина содержания инсулина в среде культивирования мало отличима от базальной продукции гормона в первые сутки после отогрева, хотя и несколько ниже. Описанная динамика инсулинпродукции на протяжении трех суток после отогрева свидетельствует о функциональной полноценнности деконсервированного материала.

Таким образом, показаны высокая жизнеспособность и функциональная активность культур ОТПЖ, криоконсервированных в присутствии криопротекторов ДМСО и ПЭО-1500, замороженных по одноэтапной программе с определенными скоростями охлаждения. Не выявлено каких-либо преимуществ деконсервированного материала, замороженного по многоэтапной программе.



Инсулинпродуцирующая способность культур ОТПЖ после криоконсервирования: *1* — 7-суточная культура ОТПЖ перед замораживанием; *2* — 1-, 2-, 3-суточная культура криоконсервированной ОТПЖ, ДМСО, базальная среда культивирования; *3* — 2-суточная культура криоконсервированной ОТПЖ, ДМСО, 3 ч инкубации с 16,7 мМ глюкозой; *4* — 1-, 2-, 3-суточная культура криоконсервированной ОТПЖ, ПЭО-1500, базальная среда культивирования; *5* — 2-суточная культура криоконсервированной ОТПЖ, ПЭО-1500, 3 ч инкубации с 16,7 мМ глюкозой.

Insulin-producing ability of PIT cultures after cryopreservation: *1* — 7-days' PIT culture before freezing; *2* — 1-, 2-, 3-days' culture of cryopreserved PIT, DMSO, basal cultivation medium; *3* — 2-days' cultivation of cryopreserved PIT, DMSO, 3-hrs incubation with 16.7 mM glucose; *4* — 1-, 2-, 3-days' culture of cryopreserved PIT, PEO-1500, basal cultivation medium; *5* — 2-days' cultivation of cryopreserved PIT, PEO-1500, 3-hrs incubation with 16.7 mM glucose.

values (16.7 mM/l), insulin rejection occurs: during 3 hrs hormone concentration makes 250 µunits/ml. Biomaterial returning under the conditions with low glucose content (5.6 mM/l) results in a decrease of insulin production down to the values lower 800 µunits/ml·day. Thus we observed an adequate biomaterial response to glucose loading, consisting in a practically thresh-hold increase of insulin concentration in the medium during a short (3 hrs) time period. To the second and third days of cultivation the value of insulin content in the cultivation medium is differed a little from the basal hormone production in the first day after thawing, though it was some lower. Described dynamics of insulin production during three days after thawing testifies to the functional integrity of depreserved material.

Thus, a high viability and functional activity of PIT cultures, cryopreserved in the presence of DMSO and PEO-1500 cryoprotectants, frozen according one-stage program with the given cooling rates have been demonstrated. Any advantages of frozen-thawed material, frozen according to multi-stage program, were not revealed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабенко Г. А., Гонский Я. И., Антоник И. М. и др.* О роли металлов в процессах свободнорадикального окисления в тканях организма по данным спонтанной и индуцированной хемилюминесценции // Хемилюминесценция.– М.: Наука, 1983.– С. 164–179.
2. *Скалецкий Н. Н., Фетеева Н. Л., Сухих Г. Т., Молнар Е. М.* Трансплантация культур островковых клеток фетальной поджелудочной железы в лечении инсулинзависимого

REFERENCES

1. *Babenko G. A., Gonsky Ya. I., Antonik I. M. et al.* About the role of metals during the processes of free-radical oxidation in an organism tissues according to the data of

Матеріал, захищений авторським правом

сахарного диабета // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1994.– № 4.– С. 356–363.
3. *Inaba K., Zhou D., Yang B. et al.* Normalization of diabetes by xenotransplantation of cryopreserved microencapsulated pancreatic islets. Application of a new strategy in islet banking // Transplantation.– 1996.– 61, № 2.– P. 175–179.
4. *Janjic D., Andereggen E., Deng S., et al.* Improved insulin secretion of cryopreserved human islets by antioxidant treatment // Pancreas.– 1996.– 13, № 2.– P. 166–172.
5. *Jutte N. H., Heyse P., Breining G. J., Zeilmaker G. H.* Cryopreservation of mouse, monkey and human islets of Langerhans for transplantation purposes // Neth. J. Surg.– 1987.– 39, № 1.– P. 15–18.
6. *Nikonenko A. S., Kovalev A. A., Zavgorodnii S. N., Volkova N.A.* Surgical treatment of insulin-dependent diabetes mellitus and its complications // Khirurgiia.– 1996.– 2.– P. 81–83.
7. *Rajotte R. V., Warnock G. L., McGann L. E.* Cryopreservation of islets of Langerhans for transplantation // Low temperature biotechnology. Emerging applications and engineering contributions / Ed. by J. J. McGrath, K. R. Diller.– N-Y.: The American society of mechanical engineers, 1988.– P. 25–45.
8. *Sato S., Ohgawara H., Nakagawa Y. et al.* A simple method for cryopreservation of purified adult pig pancreatic cells // Cell Transplant.– 1996.– 5.– P. S49–S50.
9. *Selawry H.P., Wang X., Alloush L.* Sertoli cell-induced defects on functional and structural characteristics of isolated neonatal porcine islets // Cell Transplant.– 1996.– 5, № 5.– P. 517–524.
10. *Tun T., Inoue K., Hayashi H., et al.* A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid artificial pancreas: rat to mouse xenotransplantation // Cell Transplant.– 1996.– 5.– P S59–S63.
11. *Pat. 4.817.397* USA, F25B 19/00. Device for refrigeration and freezing of biological objects / V. I. Grischenko, V. F. Tarasov, S. E. Galchenko, Yu. V. Kalugin, J. S. Paraschuk, N. A. Luchko, E. N. Chernysh (USSR). Publ. April 4, 1989.

Поступила 23.11.99

spontaneous and induced chemiluminescence // Khemiluminescencia.– M.: Nauka, 1983.– P. 164–179.
2. *Skaletsky N. N., Fateeva N. L., Sukhikh G. T., Molnar E. M.* Transplantation of islet cells culture of fetal pancreas when treating insulin-dependent Diabetes mellitus // Bull. of experim. biology and medicien.– 1994.– № 4.– P. 356–363.
3. *Inaba K., Zhou D., Yang B. et al.* Normalization of diabetes by xenotransplantation of cryopreserved microencapsulated pancreatic islets. Application of a new strategy in islet banking // Transplantation.– 1996.– 61, № 2.– P. 175–179.
4. *Janjic D., Andereggen E., Deng S., et al.* Improved insulin secretion of cryopreserved human islets by antioxidant treatment // Pancreas.– 1996.– 13, № 2.– P. 166–172.
5. *Jutte N. H., Heyse P., Breining G. J., Zeilmaker G. H.* Cryopreservation of mouse, monkey and human islets of Langerhans for transplantation purposes // Neth. J. Surg.– 1987.– 39, № 1.– P. 15–18.
6. *Nikonenko A. S., Kovalev A. A., Zavgorodnii S. N., Volkova N.A.* Surgical treatment of insulin-dependent diabetes mellitus and its complications // Khirurgiia.– 1996.– 2.– P. 81–83.
7. *Rajotte R. V., Warnock G. L., McGann L. E.* Cryopreservation of islets of Langerhans for transplantation // Low temperature biotechnology. Emerging applications and engineering contributions / Ed. by J. J. McGrath, K. R. Diller.– N-Y.: The American society of mechanical engineers, 1988.– P. 25–45.
8. *Sato S., Ohgawara H., Nakagawa Y. et al.* A simple method for cryopreservation of purified adult pig pancreatic cells // Cell Transplant.– 1996.– 5.– P. S49–S50.
9. *Selawry H.P., Wang X., Alloush L.* Sertoli cell-induced defects on functional and structural characteristics of isolated neonatal porcine islets // Cell Transplant.– 1996.– 5, № 5.– P. 517–524.
10. *Tun T., Inoue K., Hayashi H., et al.* A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid artificial pancreas: rat to mouse xenotransplantation // Cell Transplant.– 1996.– 5.– P S59–S63.
11. *Pat. 4.817.397* USA, F25B 19/00. Device for refrigeration and freezing of biological objects / V. I. Grischenko, V. F. Tarasov, S. E. Galchenko, Yu. V. Kalugin, J. S. Paraschuk, N. A. Luchko, E. N. Chernysh (USSR). Publ. April 4, 1989.

Accepted in 23.11.99

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043

UDC 57.043

Жидкий азот как потенциальный источник микробной контаминации биологических объектов

В. И. ГРИЩЕНКО, А. С. СНУРНИКОВ, Н. Г. КАДНИКОВА, В. Ф. МАРЦЕНЮК, И. П. ВЫСЕКАНЦЕВ, Т. Ф. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Liquid Nitrogen as a Potential Source of Biological Object Microbe Contamination

V. I. GRISCHENKO, A. S. SNURNIKOV, N. G. KADNIKOVA, V. F. MARTSENYUK, I. P. VYSEKANTSEV, T. F. PETRENKO

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

Приведены литературные данные о случаях микробной контаминации биологических объектов в процессе криоконсервирования и при хранении в жидком азоте. Предлагаются мероприятия, позволяющие уменьшить риск такой контаминации.

Наведено літературні дані про випадки мікробної контамінації біологічних об'єктів на етапах процесу кріоконсервування і при зберіганні у жидкому азоті. Пропонуються заходи, які дозволять зменшити ризик такої контамінації.

The literature data on the cases of biological objects microbe contamination during the cryopreservation process and within the storage into a liquid nitrogen are shown. The measures, permitting to reduce the risk of such contamination are proposed.

Фундаментальные науки, биотехнология, медицина уже невозможны без использования жидкого азота и низкотемпературных банков, которые стали источником стандартизированного биоматериала: клеточных культур, микроорганизмов, органов и тканей, применяемых для трансплантации и трансфузиологии. Благодаря жидкому азоту появились такие новые направления в медицине, как криохирургия и криотерапия. Но несмотря на широкое применение жидкого азота, у исследователей не возникало предположения, что он может быть потенциальным источником контаминации медицинских инструментов и замороженных образцов бактериями или вирусами как во время хранения, так и замораживания-отогрева.

Впервые вопрос о возможной передаче вирусов посредством жидкого азота был рассмотрен в дерматологии и криохирургии [4, 11].

Большинство вирусов выдерживает действие низких температур (–196 °С), не нуждаясь при этом в криозащитных средах и специальном подборе режимов охлаждения, поэтому не случайно наиболее часто описана передача от пациента к пациенту именно вирусов при использовании криохирургической техники [4–6, 10, 11].

Вопрос о возможной контаминации при криотерапевтических манипуляциях в литературе возник в 1986 году. Исследовалась [4] возможность передачи вируса простого герпеса при криотерапии. Для этого ватный тампон инфицировали или при непосредственном контакте с пораженным участком кожи пациента, или при контакте с инфицированной клеточной культурой. Инфицированные

Fundamental sciences, biotechnology, medicine are already not feasible without liquid nitrogen and low temperature banks usage, that became a source of such standartised biomaterial as cellular cultures, microorganisms, organs and tissues, applied for transplantation and transfusion. Due to liquid nitrogen such new directions in medicine as cryosurgery and cryotherapy have appeared. However, in spite of the liquid nitrogen wide application the researchers had not any supposition, that it could be a potential contamination source of medical instruments and frozen samples by bacteria and viruses both within the storage and freeze-thawing processes.

For the first time the question on a possible virus transmission by means of liquid nitrogen was considered in dermatology and cryosurgery [4, 11].

The majority of viruses endures the low temperature effect (–196 °С), thereat not having the necessity in cryoprotective media and special cooling regimens selection, therefore it is not occasionally, that the transmission of namely viruses from patient to patient is the most often described [4–6, 10, 11].

For the first time the question of possible contamination during cryotherapeutic manipulations appeared in 1986. The possible transmission of simple herpes virus during cryotherapy has been investigated [4]. For this purpose a cotton tampon was infected either during direct contact with damaged part of a patient's skin or when contacting with an infected cellular structure. The infected cotton tampons were frozen in a liquid nitrogen (–196 °С). After storage within 12 hrs these tampons were thawed and tested to herpes virus preservation. As the result of these

Матеріал, захищений авторським правом

ватные тампоны замораживали в жидком азоте (–196 °С). После хранения в течение 12 ч эти тампоны отогревали и проверяли на сохранность вируса герпеса. В результате этих исследований авторы пришли к выводу, что вирус может передаваться от пациента к пациенту при повторном использовании ватных тампонов.

Другими авторами [11] была изучена возможность передачи вируса от одного пациента к другому при использовании многоразовой палочки с нитратом серебра и ватного тампона, смоченного повторно в жидком азоте. Результаты показали, что передача вируса через палочку с нитратом серебра невозможна, но заражение вирусом возможно через ватный тампон из сосуда с жидким азотом. На основании своих исследований авторы предлагают не погружать ватный тампон повторно во флакон с жидким азотом, а использовать небольшой объем азота и новый тампон для каждого пациента.

На основании аналогичных наблюдений [6] был сделан вывод о необходимости использования в криохирургии и дерматологии стерильного азота. Предложено стерилизующее устройство для небольшой порции азота, достаточной для лечения одного пациента, что предотвращает передачу вирусной инфекции.

Первые сообщения о жидком азоте как источнике контаминации в трансфузиологии и трансплантологии появились в 1985 году. Исследователи проанализировали причину возникновения острого гепатита В у 6 пациентов гематологического отделения после трансплантации костного мозга, хранившегося в жидком азоте низкотемпературного банка [8]. Как выяснилось, источником инфицирования стал азот с хранящимися образцами костного мозга. В детрите, взятом из жидкого азота, была обнаружена ДНК вируса гепатита В и определена ее нуклеотидная последовательность. В сыворотке крови 4-х пациентов из 6, заболевших гепатитом В, был обнаружен HBsAg, имеющий аминокислотную последовательность, отвечающую кодонам 145 и 146 X гена HBV, выделенного из хранилища с жидким азотом. На основании полученных данных авторы пришли к выводу, что в жидкий азот из инфицированных образцов попадает вирус, который впоследствии может контаминировать другие хранящиеся образцы костного мозга.

Аналогичный случай наблюдали Tedder R. S. с соавт. [13]. У пациентов были взяты и хранились в жидком азоте костный мозг или клетки периферической крови для будущей трансплантации. Четверо пациентов из числа тех, которым проводились трансфузии аутологичной крови, хранившейся в низкотемпературном хранилище, заболели гепатитом В. Через 25 мес хранения в этом хранилище с жидким азотом обнаружили ДНК одного пациента, HBsAg и ДНК вируса гепатита В. Как впоследствии выяснилось, криоампулы с костным мозгом от одного из пациентов имели дефект, что привело к

investigations the authors concluded, that the virus could be transmitted from patient to patient during repeated usage of cotton tampons.

The other authors [11] have studied the possibility of virus transmission from one patient to another when applying a multiple-use stick with silver nitrate and cotton tampon, repeatedly immersed into a liquid nitrogen. The results have demonstrated, that the virus transmission via stick with silver nitrate is impossible, but the contamination by virus is possible through a cotton tampon from vessel with liquid nitrogen. Basing on these investigations the authors propose to do not repeatedly immerse a cotton tampon into a bottle with liquid nitrogen, but to use a small volume of nitrogen and new tampon for each patient.

On the base of similar observations [6] the conclusion was made on the necessity to use a sterile nitrogen in cryosurgery and dermatology. A sterilizing device for a small nitrogen portion, sufficient for one patient treatment, preventing virus infection transmission was proposed.

In 1985 the first information on liquid nitrogen as a source of contamination in transfusiology and transplantology appeared. The investigations have analysed the cause of acute hepatitis B origin in 6 patients of hematological department after bone marrow transplantation, being stored into a liquid nitrogen of low temperature bank [8]. As it has been revealed, a nitrogen with stored bone marrow samples was the infection source. In detrite, taken from liquid nitrogen, DNA of hepatitis B virus was revealed and its nucleotide sequence was determined. In blood serum of 4 patients from 6 ones with hepatits B, HBsAg has been revealed, having an aminoacid sequence, responding to 145 and 146 X codons of HBS gene, isolated from a storehouse with a liquid nitrogen. Basing on the data obtained, the authors have made the conclusion, that the virus, that further can contaminate other stored bone marrow samples, penetrates into a liquid nitrogen from infected samples.

Tedder R. S. with co-authors [13] have observed the similar case. Bone marrow or peripheric blood cells have been obtained from patients and stored into a liquid nitrogen for further transplantation. Four patients with transfused autologic blood, stored in low temperature storehouse, had hepatitis B. DNA of a patient, HBsAg and DNA of hepatitis B virus were found in 25 months of storage in this storehouse with liquid nitrogen. As it has been revealed further, the cryoampoules with bone marrow from one patient had a defect, that resulted in penetration of the material stored into a liquid nitrogen of the storehouse. As the result, the storehouse was contaminated with hepatitis B virus with following contamination of the stored transfusional material of 4 other patients. When transplanting such a material the patients were infected with hepatitis B. This case led to the conclusion that for storage of transfusional and transplantation material it was necessary to use such containers,

Матеріал, захищений авторським правом

попаданию хранящегося материала в жидкий азот хранилища. В результате хранилище было контаминировано вирусом гепатита В с последующим инфицированием хранящегося трансфузионного материала 4-х других пациентов. При трансплантации такого материала пациенты и были инфицированы гепатитом В. Этот случай привел к выводу, что для хранения трансфузионного и трансплантационного материала необходимо использовать такие контейнеры, которые обеспечивали бы герметизацию образцов и предотвращали контакт материала с жидким азотом.

Другая группа исследователей изучила возможность заражения криоконсервированных образцов бактериальной и грибковой флорой [7]. Объектами исследования явились 704 стерильных в момент закладки образцов гемопоэтических предшественников с потенциалом стволовых клеток (HPC), полученных от 255 пациентов за 18 мес и хранившихся в жидком азоте. После отогрева 583 образцов, несмотря на тщательные меры, направленные на предотвращение контаминации во время отогрева, 7 (1,2%) были инфицированы микроорганизмами, встречающимися в окружающей среде наиболее часто в воде. При микробиологическом обследовании 5 низкотемпературных замораживателей было установлено, что во всех жидкий азот был заражен микрофлорой. В азоте 4-х замораживателей микрофлора была аналогичной микрофлоре контаминированных образцов HPC. В 5-м замораживателе азот был в значительной мере инфицирован грибами рода Aspergillus.

Авторы сделали вывод, что при загрязнении азота и жидкий азот, и пары азота являются потенциальным источником микробной контаминации образцов, хранящихся в низкотемпературном банке. По их мнению, должен осуществляться постоянный контроль стерильности используемого жидкого азота.

Для освещения рассматриваемой проблемы представляют интерес еще четыре сообщения.

Webb G. L. и др. [14] провели исследование стерильности 2 632 образцов костного мозга и крови, полученных от 1 593 доноров, на всех этапах: забор материала, иммунологическое тестирование, подготовка к криоконсервированию, замораживание, хранение при низких температурах, отогрев, трансплантация или трансфузия. На этапе хранения в низкотемпературных хранилищах были инфицированы 44 образца (1,67%), на этапе отогрева — 42 образца (1,97%), на этапе трансплантации или гемотрансфузии — 73 образца (0,36%).

Prince H. M. с соавт. [13] провели ретроспективный анализ исследования на грибковую и бактериальную контаминацию образцов костного мозга и донорской крови за период с января 1987 г. по январь 1994 г. Из 3 910 образцов после забора материала в операционных были инфицированы 2,1%, после низкотемпературного хранения — 1,1%,

that would provide the sample sealing and prevent the material contact with liquid nitrogen.

The another group of investigators has studied the possibility of cryopreserved sample contamination with bacterial and fungous flora [7]. 704 sterile in the moment of placing samples of hemopoietic precursors with stem cell potential (HPC), obtained from 255 patients during 18 months and stored into a liquid nitrogen were the investigation objects. After 583 samples freeze-thawing, in spite of thorough measures directed to prevent the contamination during freeze-thawing, 7 (1.2%) were infected by the microorganisms, being in the environment, the most frequent in water. When microbiologically examining 5 low temperature freezers it has been established, that in all a liquid nitrogen was contaminated by a microflora. In the nitrogen of 4 freezers the microflora was similar to those of HPC contaminated samples. In the 5th the nitrogen was in a considerable extent infected with fungi of Aspergillus type.

The authors made the conclusion, that during nitrogen contamination both liquid nitrogen and its vapours are a potential source of microbe contamination of the samples, stored in low temperature bank. According to their opinion, the constant sterility control of the used liquid nitrogen should be accomplished.

In order to elucidate the problem considered, one more 4 reports are of the interest.

Webb G. J. et al. [14] have carried out the study of sterility of 2 632 blood and bone marrow samples, obtained from 1 593 donors at all stages: the material procurement, immunological testing, preparation for cryopreservation, freezing, storage under low temperatures, freeze-thawing transplantation or transfusion. 44 samples (1.67%) were contaminated at the stage of storage in low temperature storehouse, 42 samples (1.97%) — at the stage of freeze-thawing, 73 samples (0.36%) — at the stage of transplantation or hemotransfusion.

Prince H. M. with co-authors [13] have accomplished the investigation retrospective analysis on fungous and bacterial contamination of the samples of bone marrow and donor blood within the period from January 1987 to January 1994. From 3 910 samples after the material procurement 2.1% of samples were contaminated in operating rooms, 1.1% — after low temperature storage, 2.2% — at the freeze-thawing stage. The majority of samples were contaminated by a saprophytic microflora, 0.2% — of isolated microorganisms were related to conditionally pathogenic bacteria.

The analogous results were obtained by Jestic H. K. [10] and Attarian I. I. [3] groups. They have established, that after low temperature storage 1.6% from 128 and 0.23% from 1 263 of blood and bone marrow samples were contaminated by bacteria, correspondingly. The authors have concluded, that the contamination might occur both at the stage of procurement and within the process of low temperature storage.

Матеріал, захищений авторським правом

на этапе отогрева — 2,2% образцов. Большинство образцов были контаминированы сапрофитной микрофлорой, 0,2% выделенных микроорганизмов относились к условно патогенным бактериям.

Аналогичные результаты получены группами Jestic H. K. [10] и Attarian I. I. [3]. Они установили, что после низкотемпературного хранения были контаминированы бактериями соответственно 1,6% из 128 и 0,23% из 1 263 образцов костного мозга и крови. Авторы пришли к мнению, что заражение могло произойти как на этапе забора, так и в процессе низкотемпературного хранения.

В последнее время интенсивно развивается терапия ряда заболеваний с использованием фетальных клеток и тканей, а также препаратов из плаценты человека [2]. Одним из обязательных этапов приготовления этих препаратов является низкотемпературное хранение. Помимо указанных в обзоре возможных вероятностей инфицирования этих препаратов на этапах приготовления, хранения и клинического использования, сам исходный материал может быть инфицирован в результате трансплацентарного заражения (вирусы гепатитов B, D, C, G, вирус краснухи, СПИД, аденовирусы, вирус простого герпеса 2-го серотипа и цитомегаловирус, возбудитель токсоплазмоза, возбудитель сифилиса, хламидии, парвовирус B-19, вирус кори) или заражения микрофлорой шейки матки и влагалища во время прерывания беременности [1].

Таким образом, представленные в научных сообщениях данные и анализ особенностей технологических процессов приготовления криоконсервированных препаратов для последующего использования в клинической практике показывают, что риск контаминации таких препаратов микроорганизмами существует на всех этапах. В связи с этим трудно переоценить значения организационных и технических мероприятий, направленных на устранение или уменьшение такого риска. К обязательным, на наш взгляд, мероприятиям относятся:

— обследование доноров на отсутствие инфекций, передающихся трансплацентарно;
— обследование на стерильность препаратов перед закладкой в низкотемпературный банк;
— при наличии достаточного количества образцов от одного донора исследование на стерильность контрольного образца перед отогревом остальных и хранение второго контрольного образца до получения результатов использования препарата в клинике;
— обследование на микробную загрязненность камер замораживателей и азота в хранилищах;
— дезинфекция внутренних поверхностей замораживателей и хранилищ при проведении технических ревизий;
— использование контейнеров, максимально обеспечивающих герметичность, и укладок, предотвращающих при разгерметизации контейнеров

Recently the therapy of some diseases using fetal cells and tissues, as well as the preparations from human placenta has intensively developed [2]. The low temperature storage is one of the obligatory stages of these praparations preparing. Besides the mentioned in the review possible probabilities of these preparations contamination at the stages of preparation, storage and clinical application, an initial material itself can be infected as the result of transplacental contamination (hepatitis B, D, C, G viruses, rubella virus, AIDS, adenoviruses, simple herpes virus of 2nd serotype and cytomegalovirus, toxoplasmosis exciter, syphilis esciter, chlamidia, B-19 parvovirus, measles virus) or contamination by microflora of uterus neck and vagina during abortion [1].

Thus, the data presented in scientific reports and the peculiarities analysis of technological processes of cryopreserved preparations preparing for following usage in clinical practice demonstrate, that the contamination risk of such preparations by microorganisms exists at all stages. In this connection it is very difficult to estimate the value of organisational and technical measures, directed to the elimination and reduction of such a risk. The obligatory measures, from our point of view, are the follows:

— donors' examination for the absence of the infections, that are transplacentarily transmitted;
— the examination on the preparation sterility before placing into low temperature bank;
— when a sufficient number of samples from one donor is available, the study on the control sample sterility before freeze-thawing the rest ones and the storage of the second control sample upto obtaining the results of the preparation application in clinic;
— The study on a microbe contamination of the freezers chambers and nitrogen in storehouses;
— desinfection of internal surfaces of freezers and storehouses when accomplishing technical revisions;
— the usage of the containers, providing a maximum sealing, and packing cases, preventing the contact of the material stored with nitrogen and environment during seal failure;
— the removal of containers with seal failure during storage;
— the observation of the regimen measures, specified by the normative documents requirements at all stages.

REFERENCES

1. *Medicinal* microbiology / Ed. by V. I. Pokrovsky, O. K. Pozdeyev.– M.: Meditsina, 1998.– 1200 p.
2. *Transplantation* of human fetal tissues and cells / Ed. by G. G. Sukhikh, A. N. Erina.– International Institute of Biological Medicine. Collection of articles.– M., 1996.– 127 p.
3. *Attarian H., Bensinger W. I., Buckner C. D. et al.* Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections // Bone Marrow Transplant.– 1996.– 17, № 5.– P. 699–702.
4. *Burke W. A., Baden T. J., Wheeler C. E., Bowdre J. H.* Survival of herpes simplex virus during cryosurgery with

Матеріал, захищений авторським правом

контакт хранящегося материала с азотом и окружающей средой;
— удаление контейнеров, разгерметизировавшихся при хранении;
— соблюдение на всех этапах режимных мероприятий, предусмотренных требованиями нормативных документов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Медицинская* микробиология / Под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева.– М.: Медицина, 1998.– 1200 с.
2. *Трансплантация* фетальных тканей и клеток человека / Под ред. Г. Г. Сухих, А. Н. Ерина.– Международный ин-т биол. медицины. Сб. статей.– М., 1996.– 127 с.
3. *Attarian H., Bensinger W. I., Buckner C. D. et al.* Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections // Bone Marrow Transplant.– 1996.– 17, № 5.– P. 699–702.
4. *Burke W. A., Baden T. J., Wheeler C. E., Bowdre J. H.* Survival of herpes simplex virus during cryosurgery with liquid nitrogen // J. Dermatol. Surg. Oncol.– 1986.– 12, № 10.– P. 1033–1035.
5. *Carroll W. E., Pinnick H. A., Ellis M. L.* Viruses, skin lesions, and liquid nitrogen [letter] [see comments] // Lancet.– 1995.– 345, № 8954.– P. 929.
6. *Dolezal J. F.* A device to prevent cross-contamination when directly applying liquid nitrogen [see comments] // J. Dermatol. Surg. Oncol.– 1991.– 17, № 10.– P. 827–828.
7. *Fountain D., Ralston M., Higgins N. et al.* Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell component // Transfusion.– 1997.– 37, № 6.– P. 585–591.
8. *Hawkins A. E., Zuckerman M. A., Briggs M. et al.* Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank // J. Virol. Methods.– 1996.– № 60.– P. 181–188.
9. *Jestice H. K., Farrington M., Hunt C. et al.* Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation // Transfus. Med.– 1996.– 6, № 2.– P. 103–110.
10. *Jones S. K., Darville J. M., Burton J. L.* Viruses, skin lesions and liquid nitrogen [letter; comment] // Lancet.– 1995.– 345, № 8961.– P. 1369.
11. *Jones S. K., Darville J. M.* Transmission of virus particles by cryotherapy and multiuse caustic pencils: a problem to dermatologists? // Br. J. Dermatol.– 1989.– № 121.– P. 4481–4486.
12. *Prince H. M., Page S. R., Keating A. et al.* Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood // Bone Marrow Transplant.– 1995.– 15, № 1.– P. 87–89.
13. *Tedder R. S., Zuckerman M. A., Goldstone A. H. et al.* Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank // Lancet.– 1995.– 346, № 8968.– P. 137–140.
14. *Webb I. J., Coral F. S., Andersen J. W. et al.* Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering // Transfusion.– 1996.– 36, № 9.– P. 782–788.

Поступила 22.05.2000

liquid nitrogen // J. Dermatol. Surg. Oncol.– 1986.– 12, № 10.– P. 1033–1035.
5. *Carroll W. E., Pinnick H. A., Ellis M. L.* Viruses, skin lesions, and liquid nitrogen [letter] [see comments] // Lancet.– 1995.– 345, № 8954.– P. 929.
6. *Dolezal J. F.* A device to prevent cross-contamination when directly applying liquid nitrogen [see comments] // J. Dermatol. Surg. Oncol.– 1991.– 17, № 10.– P. 827–828.
7. *Fountain D., Ralston M., Higgins N. et al.* Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell component // Transfusion.– 1997.– 37, № 6.– P. 585–591.
8. *Hawkins A. E., Zuckerman M. A., Briggs M. et al.* Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank // J. Virol. Methods.– 1996.– № 60.– P. 181–188.
9. *Jestice H. K., Farrington M., Hunt C. et al.* Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation // Transfus. Med.– 1996.– 6, № 2.– P. 103–110.
10. *Jones S. K., Darville J. M., Burton J. L.* Viruses, skin lesions and liquid nitrogen [letter; comment] // Lancet.– 1995.– 345, № 8961.– P. 1369.
11. *Jones S. K., Darville J. M.* Transmission of virus particles by cryotherapy and multiuse caustic pencils: a problem to dermatologists? // Br. J. Dermatol.– 1989.– № 121.– P. 4481–4486.
12. *Prince H. M., Page S. R., Keating A. et al.* Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood // Bone Marrow Transplant.– 1995.– 15, № 1.– P. 87–89.
13. *Tedder R. S., Zuckerman M. A., Goldstone A. H. et al.* Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank // Lancet.– 1995.– 346, № 8968.– P. 137–140.
14. *Webb I. J., Coral F. S., Andersen J. W. et al.* Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering // Transfusion.– 1996.– 36, № 9.– P. 782–788.

Accepted in 22.05.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 636.5.082.453

UDC 57.043: 636.5.082.453

Влияние осмотичности криозащитной среды на сохранность спермиев петуха при криоконсервировании

Т. П. ЛИННИК, В. И. ГРИЩЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

А. Б. АРТЕМЕНКО, А. В. ТЕРЕЩЕНКО

НИИ птицеводства УААН, пос. Борки

Effect of Osmoticity of Cryoprotective Medium on Survival of Cock Sperm During Cryopreservation

T. P. LINNIK, V. I. GRISCHENKO

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

A. B. ARTEMENKO, A. V. TERESCHENKO

Scientific-Research Institute of Poultry Farming of the Ukrainian Agricultural Academy, Borki village

Изучено влияние криозащитных сред, различающихся по составу компонентов и осмотичности в диапазоне от 200 до 800 мОсмоль/кг, на морфологическую сохранность и функциональную активность сперматозоидов петуха до и после замораживания-оттаивания. Показано, что оптимальное значение осмотичности криозащитной среды, обеспечивающей высокую оплодотворяющую способность спермиев петуха после криоконсервирования, находится в области гипертонии по отношению к семенной плазме и равно 395–400 мОсмоль/кг. Установлено, что осмотичность криозащитной среды является доминирующим свойством и влияет на результаты криоконсервирования больше, чем ионная сила раствора, соотношение катионов натрия и калия и присутствие двухвалентных катионов (Mg^{+2}).

Вивчено вплив кріозахисних середовищ, що відрізняються за складом компонентів та осмотичністю в діапазоні від 200 до 800 мОсмоль/кг, на морфологічну цілість і функціональну активність сперматозоїдів півня до і після заморожування-відігріву. Показано, що оптимальне значення осмотичності кріозахисного середовища, яке забезпечує високу запліднюючу здатність спермій півня після кріоконсервування, знаходиться в області гіпертонії по відношенню до сім'яної плазми і дорівнює 395–400 мОсмоль/кг. Установлено, що осмотичність кріозахисного середовища є домінантною властивістю і впливає на результати кріоконсервування більше, ніж іонна сила розчину, співвідношення катіонів натрію і калію та присутність двовалентних катіонів (Mg^{+2}).

The authors investigated the action of cryoprotective media, differing in the composition of their components and osmoticity in the range of 200–800 mOsmol/kg, on the morphological survival and functional activity of the cock sperm prior to and after freeze-thawing. It was shown that the optimum value of the osmoticity of the cryoprotective medium, which provides for a high fertilizing ability of the cock sperm after cryopreservation, is in the range of hypertension with regards to the seminal plasma and equals 395–400 mOsm/kg. The osmoticity of the cryoprotective medium was found to be a dominating property, affecting the yield of cryopreservation much stronger as compared with the ionic strength of the solution, ratio of the sodium and potassium cations and the availability of divalent cations (Mg^{2+}).

В настоящее время накоплены многочисленные доказательства того, что состав и физико-химические свойства криозащитной среды являются одним из основных факторов, определяющих эффективность криоконсервирования спермы любого вида животных [1, 2, 4, 11, 12]. Известно [6–10, 13], что сперматозоиды в процессе подготовки, охлаждения, замораживания, оттаивания и осеменения подвергаются значительным колебаниям осмотического давления внеклеточного окружения и их выживаемость в итоге зависит от того, как сперматозоиды того или иного вида способны переносить резко меняющиеся условия на этапах низкотемпературного консервирования. Ранее [9, 10, 13] исследовали диапазон осмотического давления внешней среды,

Currently there are many proofs that the composition and physical-chemical properties of a cryoprotective medium are one of the basic factors, determining the efficiency of cryopreservation of the sperm of any animal [1, 2, 4, 11, 12]. It is common knowledge [6–10, 13] that the sperm in the process of preparation, cooling, freezing, thawing and insemination experience significant deviations of the osmotic pressure of the intercellular environment, and their survival depends on the ability of the spermatozoa to tolerate the rapidly changing conditions at the stages of low temperature preservation. Earlier [9, 10, 13] the researchers made attempts to investigate the range of the osmotic pressure of the environment, which may be tolerated by the cock sperm without significant disturbances in morphology and functional activity,

Матеріал, захищений авторським правом

который может выдержать сперма петуха без существенных нарушений морфологии и функциональной активности, и на основании этого определяли осмотичность криозащитной среды, необходимую для успешного криоконсервирования. В составе криозащитных сред, не считая криопротекторов, изучено более 50 различных веществ [1, 9, 11], включающих углеводы (моно-, ди- и полисахариды), аминокислоты, органические (глутаматы, цитраты, ацетаты) и неорганические (хлориды, сульфаты, фосфаты, карбонаты) соли, некоторые биологически активные соединения. Предпринимались попытки оценить роль и характер влияния компонентов сред на результаты криоконсервирования спермы петуха [2]. Но до сих пор не выработано единого мнения как об оптимальном значении осмотичности криозащитной среды, так и ее составе, обеспечивающем максимальную оплодотворяющую способность спермы петуха после замораживания-оттаивания. Поэтому предложены самые разнообразные разбавители и среды как для гипотермического, так и низкотемпературного хранения спермиев петуха, а их осмотичность варьирует в пределах от 290 до 450 мОсмоль/кг [1, 2, 4, 11, 12].

Цель данного исследования — определение оптимального состава и осмотичности криозащитной среды, обеспечивающих максимальную морфологическую сохранность и функциональную активность спермиев петуха на этапах низкотемпературного консервирования.

В опытах использовали петухов и кур коллекционных пород, имеющихся при НИИП УААН. Сперму получали методом массажа. Для исследований применяли смешанную сперму нескольких эякулятов. Для оценки сохранности клеток до замораживания определяли: подвижность сперматозоидов под микроскопом (×450) в висящей капле на термостолике при температуре 37 °С; переживаемость спермы (максимальное время хранения спермы при 4 °С, по истечении которого остается до 10% подвижных клеток); количество сперматозоидов с целыми и поврежденными мембранами головок и состояние акросом [5] с их прижизненным окрашиванием флуоресцентными красителями этидиум бромидом (2,7-диамино-10-этил-9-фенилфенантридиум бромид) и тиазиновым красным. Анализ морфологической сохранности сперматозоидов проводили на люминесцентном микроскопе МЛ-3 (× 1 350).

После замораживания-оттаивания, кроме перечисленных показателей, определяли оплодотворяющую способность спермы. Осеменение кур криоконсервированной спермой проводили первые два дня подряд, затем один раз в 3–4 дня. Доза осеменения 0,12–0,13 мл, что соответствовало введению 70–90 млн сперматозоидов, глубина осеменения 2–3 см. Сбор яиц начинали через день после второго осеменения. Яйца инкубировали в инкубаторе "Универсал-55". Оплодотворяющую способ-

and on the basis of the above to determine the osmoticity of the cryoprotective medium, which is required for successful cryopreservation. More than 50 substances [1, 9, 11], not including cryoprotectants, were studied within the cryoprotective media, which involved carbohydrates (mono-, di- and polysaccharides), amino acids, organic (glutamates, citrates, acetates) and inorganic (chlorides, sulfates, phosphates, carbonates) salts, some biologically active compounds. The attempts were made to evaluate the role and the nature of the action of the components of the media on the yield of cryopreservation of the cock spermatozoa [2]. But until now the opinions differ both on the optimum value of the osmoticity of the cryoprotective medium, and on its composition, providing for the maximum fertilizing ability of the cock spermatozoa after freeze-thawing. That is why there are currently offered very many various diluents and media both for hypothermic and low temperature storage of the cock spermatozoa, and their osmoticity varies in the range of 290–450 mOsmol/kg [1, 2, 4, 11, 12].

The aim of the given research was to determine the optimum composition and osmoticity of the cryoprotective medium, providing for the maximum morphological survival and functional activity of the cock spermatozoa at the stages of low temperature preservation.

The cocks and chickens of the collective species, available at the Scientific-Research Institute of the Ukrainian Agricultural Academy, were used in the experiments. The sperm was collected by massaging. The mixed spermatozoa from several ejaculates were used in the research. For evaluation of the cell survival prior to freezing the following was determined: motility of spermatozoa under the microscope (×450) in the hanging drop at the thermostage at the temperature of 37 °C; revival of the sperm (maximum duration of the storage of spermatozoa at 4 °C, upon expire of which up to 10% of the cells remain motile); the number of spermatozoa with intact and injured membranes of the heads and the state of the acrosomes [5] during their vital staining with fluorescent dyes — ethidium bromide (2,7-diamino-10-ethyl-phenyl phenatridium bromide) and thiazyn red. The morphological survival of spermatozoa was analyzed with an ML-3 luminescent microscope (× 1 350).

Beside the above features, the fertilizing ability of the spermatozoa was determined after freeze-thawing. The chickens were inseminated with cryopreserved spermatozoa during the first two days round, and then once in 3–4 days. The dose of insemination was 0.12–0.13 ml, corresponding to injection of $7–9 \cdot 10^7$ spermatozoa, and the depth of insemination was 2–3 cm. Collection of eggs started in one day after the second insemination. The eggs were incubated in a Universal-55 incubator. The fertilizing ability of the spermatozoa was calculated by the development of the embryo in 1–2 days of incubation by opening them up, or at the 7th day of incubation during their ovoscopy.

Матеріал, захищений авторським правом

ность спермы учитывали по развитию эмбриона после 1–2-х суток инкубации путем их вскрытия или же на 7-й день инкубации при их овоскопировании.

Для криоконсервирования свежеполученную сперму разбавляли криозащитной средой в соотношении 1:1 при температуре 20–25 °С, затем охлаждали в течение 20–30 мин до 4 °С и добавляли криопротектор до конечной концентрации в суспензии 0,95 М (7%). Сперму расфасовывали в маркированные полиэтиленовые трубки типа "СЖ" и замораживали на программном замораживателе УОП-3 (СКТБ ИПКиК НАНУ) со скоростью охлаждения 3 °С/мин до начала кристаллизации, выдерживали в течение 1–3 мин на плато кристаллизации, затем замораживали со скоростью 25–30 °С/мин до –20 °С и до –80 °С со скоростью 70 °С/мин, далее погружали в жидкий азот. В качестве криопротектора использовали N,N-диметилформамид (ДМФА) марки "х.ч.", дополнительно очищенный вакуумной перегонкой (2–5 мм рт.ст). Оттаивание производили в водяной бане при 40 °С. Все процедуры по подготовке спермиев петуха к замораживанию и определение переживаемости до и после криоконсервирования проводили в холодильной камере криостата МК-25 при 4 °С.

В составе криозащитных сред были использованы следующие вещества: глутамат натрия ("Merck", "х.ч."), хлорид натрия, ацетат натрия ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$), ацетат калия, ацетат магния ($Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$), протамин сульфат, глюкоза, фруктоза, инозит, лактоза, поливинилпирролидон с м.м. 12 000 (ПВП-12000), овомукоид (все вещества "Реахим", "ч.д.а." или "х.ч."). Базовый состав для получения сред с различной осмотичностью содержал (г): глутамат натрия — 1,7; фруктозу — 0,5; ацетат калия — 0,25; протамин сульфат — 0,0024; ПВП-12000 — 0,2 в 100 мл воды. На основе данной среды, варьируя либо комбинацию компонентов, либо их соотношение, получали среды с требуемой осмотичностью. В табл. 1–3 указана осмотичность исследуемой среды без криопротектора и без поправки на суммарную, получаемую при смешивании со спермой (осмотичность семенной плазмы 320–340 мОсмоль/кг. Учитывая аддитивность осмотически активной концентрации веществ в среде и разбавление, нетрудно оценить поправку). Осмотичность семенной плазмы эякулятов, а также исследуемых криозащитных сред измеряли криоскопически на осмометре ОМК-1Ц-01. Статистическую обработку результатов исследований проводили методом Фишера–Стьюдента.

На рис. 1 представлены результаты определения сохранности сперматозоидов петуха, разбавленных при комнатной температуре растворами хлорида натрия различной осмотичности в диапазоне от 0 до 800 мОсмоль/кг (оценка сохранности спермы проведена через полчаса после разбавления). Как видно, наиболее чувствительны к изме-

The cock spermatozoa were cryopreserved in the following manner: the freshly collected spermatozoa were diluted with a cryoprotective medium in a 1:1 ratio at the temperature of 20–25 °C, and then cooled for 20–30 min down to 4 °C, and a cryoprotectant was added until its finite concentration in the suspension of 0.95 M (7%). The spermatozoa were distributed into marked polyethylene tubes of a CZ type and frozen with a UOP-3 programmable freezer (Special Construction-Designing Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) at a rate of 3 °C/min until the start of crystallization, then exposed for 1–3 min at the plateau of crystallization, followed with freezing at a rate of 25–30 °C/min down to –20 °C and down to –80 °C at a rate of 70 °C/min, and finally plunged into liquid nitrogen. Use was made of N,N-dimethyl formamide (DMFA) of a chemically pure type, additionally purified by a vacuum distillation (2–5 mm Hg). Thawing was done on water bath at 40 °C. All the procedures on the preparation of the cock spermatozoa for freezing and determination of revival prior and after cryopreservation were implemented in a cooling chamber of an MK-25 cryostat at 4 °C.

The following substances were incorporated into the cryoprotective medium: sodium glutamate (Merck, chemically pure), sodium chloride, sodium acetate ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$), potassium acetate, magnesium acetate ($Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$), protamine sulphate, glucose, fructose, inositol, lactose, polyvinyl pyrrolidone with the molecular mass of 12 000 (PVP-12000),ovomucoid (all the substances produced by Reakhim, chemically pure). A base composition for producing the media with different osmoticity contained (g): sodium glutamate — 1.7; fructose — 0.5; potassium acetate — 0.25; protamine sulphate — 0.0024; PVP-12000 — 0.2 in 100 ml water. The media with the required osmoticity were created on the basis of the above medium by varying either a combination of the components or their ratio. Tables 1–3 demonstrate the osmoticities of the studied media without cryoprotectants and disregarding the summary osmoticities, which are obtained during mixing with the spermatozoa (osmoticity of the seminal plasma is 320–340 mOsm/kg; taking into account the osmotically active concentration of the substances in the plasma and dilution, it is not difficult to calculate the correction). The osmoticities of the seminal plasma of the ejaculates as well as of the studied cryoprotective media were measure cryoscopically with an OMK-1C-01 osmometer. The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher's method.

Fig. 1 shows the results of determining the survival of the cock spermatozoa, diluted at room temperature with the solutions of sodium chloride with different osmoticities in the range of 0–800 mOsm/kg (evaluation of the cock spermatozoa survival was done in half an hour after dilution). It follows from this Figure that the motility of the spermatozoa and survival of

Матеріал, захищений авторським правом

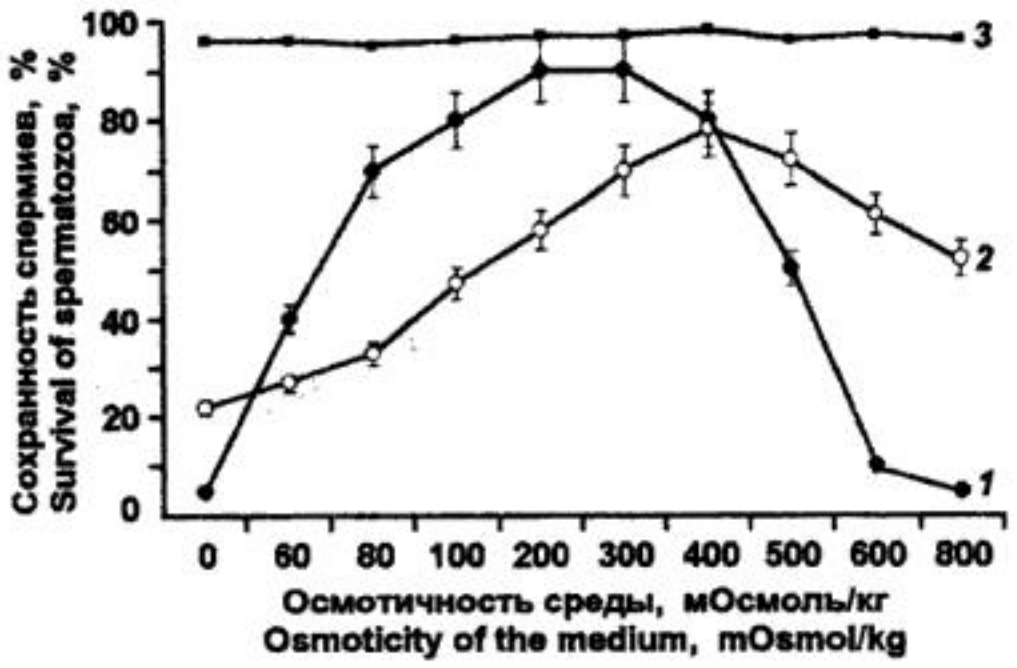


Рис. 1. Зависимость сохранности спермиев петуха от осмотичности раствора хлорида натрия, прибавленного к сперме при температуре 20 °С: *1* — подвижность; *2* — сохранность акросомы; *3* — целостность мембраны головки.

Fig. 1. Dependence of survival of the cock spermatozoa on the osmoticity of the sodium chloride solution, added to the spermatozoa at 20 °C: *1* — motility; *2* — survival of the acrosomes; *3* — intactness of the membrane of the head.

нению тоничности среды подвижность сперматозоидов и сохранность акросомы. Количество сперматозоидов с целыми мембранами головок не изменяется в исследуемом диапазоне осмотичности, что свидетельствует об отсутствии видимых нарушений в проницаемости мембраны спермиев для красителя. В связи с этим не очень понятно, чем обусловлена потеря подвижности в области гипотонии и гипертонии, так как нарушения движения спермиев, как правило, связывают с повреждением либо внешней, либо внутренней мембраны митохондрий. Подвижность спермы сохраняется в достаточно широком диапазоне тоничности среды от 200 до 450 мОсмоль/кг, что в принципе согласуется с индексом Галлеотти, определяющем пределы чувствительности спермиев к изменению осмотичности и равном для спермы петуха 1,3 (для сравнения у спермы рыб — 3,6, быка — 1,1). При этом обнаружено, что потеря подвижности в области гипертонии (от 400 до 800 мОсмоль/кг) обратима, в области гипотонии не обратима. Высокая чувствительность акросомы сперматозоидов обусловлена тем, что это наиболее обводненная органелла клетки и ее реакция на изменения осмотического давления внешней среды подобна поведению классического осмометра. Наибольшие нарушения акросомы обнаружены в области гипотонии (набухание, шаровидная форма и полное ее отсутствие), в области гипертонии сохранность акросомы выше, что согласуется с данными [10]. Установлено, что корреляция между потерей сперматозоидами подвижности и повреждением акросомы отсутствует (рис. 1), при существенных нарушениях сохранности акросом клетки остаются подвижными и, наоборот, в области гипертонии до 60% неподвижных сперматозоидов имеют целые акросомы.

Были проведены исследования жизнеспособности спермиев петуха до и после замораживания в более узком диапазоне осмотичности, в котором

the acrosomes are the most susceptible to changes in the tonicity of the medium, while the number of the spermatozoa with the intact membranes of the heads does not change in the studied range, thus testifying to the absence of the visible impairments in the permeability of the spermatozoa membranes for the dye. In this respect it is not clear why there occurs a loss of motility in the ranges of hypo- and hypertension, since the disruption in the spermatozoa motility are normally either due to the injuries to the mitochondria membranes or external/internal membranes. The motility of the spermatozoa is maintained in a sufficiently wide range of the medium tonicity from 200 to 450 mOsm/kg, which in principle is in accordance with the Galheotti index, determining the limits of the spermatozoa susceptibility to the changes in the osmoticity, and which equals 1.3 for the cock spermatozoa (e.g. for the fish spermatozoa it is 3.6, for the bull spermatozoa — 1.1). A high susceptibility of the spermatozoon acrosome is due to the fact that it is the most hydrated cell, and its response to the changes in the environmental osmotic pressure is similar to the behavior of the classic osmometer. The strongest impairments in the acrosome were reported in the range of hypotension (swelling, spheric shape and its complete absence); in the range of hypertension the survival of the acrosome is higher which nicely correlates with the earlier reported data [10]. It was found that there is no correlation between the loss of motility by the spermatozoa and the injury to the acrosome (Fig. 1); when the injury to the acrosome are significant, the cells maintain their motility and, on the contrary, in the range of hypertension up to 60% of the immotile spermatozoa possess intact acrosomes.

The authors investigated the viability of the cock spermatozoa prior to and after freezing in a narrower range of the osmoticity, in which the cells do not loose the ability for movement. Table 1 shows the composition of the media and the corresponding osmoticities, the components of which were selected on the basis of the routine diluents, successfully applied for cryopreservation of the cock spermatozoa [1, 4], including ovomucoid. The authors believe [3] that the proteins, incorporated into the cryoprotective medium, exercise a positive effect on the survival of the acrosome both

Table 1

Composition and ratio of the components in the cryoprotective media

Components of the medium*	Osmoticity of the medium, mOsmol/kg					
	200	240	270	370	440	520
Sodium glutamate	1.7	1.27	1.27	1.57	2.2	2.8
Fructose	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8
Lactose	—	1.5	3.0	3.0	3.0	3.0
Potassium acetate	—	0.33	0.33	0.6	0.6	0.7
Protamine sulfate	0.0024	—	—	—	—	—
PVP-12000	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ovomucoid	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Note: * — the amount of all the substances is given in g/100 ml water.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 1

Состав и соотношение компонентов в криозащитных средах

Компоненты среды	Осмотичность среды, мОсмоль/кг					
	200	240	270	370	440	520
Глутамат натрия	1,7	1,27	1,27	1,57	2,2	2,8
Фруктоза	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8
Лактоза	—	1,5	3,0	3,0	3,0	3,0
Ацетат калия	—	0,33	0,33	0,6	0,6	0,7
Протамин сульфат	0,0024	—	—	—	—	—
ПВП-12000	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Овомукоид	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Примечание: * — количество всех веществ указано в г/100 мл воды.

клетки не теряют способности двигаться. В табл. 1 представлены состав сред и соответствующая осмотичность, компоненты которых выбраны на основе традиционных разбавителей (исключая овомукоид), успешно применяемых для криоконсервирования спермы петуха [1, 2, 4]. По данным [3], белки, включенные в состав криозащитной среды, оказывают положительное влияние на сохранность акросомы как при низкотемпературной консервации, так и при гипотермии. Так как наиболее эффективными среди изученных белков оказались овомукоид и яичный альбумин [3], представляло интерес изучить влияние одного из них более детально.

В табл. 2 и 3 приведены результаты определения сохранности сперматозоидов, разбавленных криозащитными средами с осмотическим давлением в диапазоне от 200 до 520 мОсмоль/кг до и после замораживания-оттаивания, *pH* во всех средах равна 6,7 ± 0,2. Как видно из полученных результатов, лучшая сохранность сперматозоидов петуха до замораживания наблюдалась в среде с осмотичностью 370 мОсмоль/кг, через 192 ч хранения при 4 °С оставались подвижными до 15% клеток, через 24 ч хранения более половины сперматозоидов имели неповрежденную мембрану го-

during the low temperature preservation and hypothermia. Since ovomucoid and egg albumin turned out to be the most effective among the studied proteins [3], it seems interesting and promising to study one of them in more details.

Tables 2 and 3 show the results of determining the survival of the spermatozoa, diluted with the cryoprotective media with the osmotic pressure in the range of 200–520 mOsmol/kg prior to and after freeze-thawing, *pH* in all the media is 6.7 ± 0.2. It follows from the results submitted that the highest survival of the cock spermatozoa prior to freezing was in the medium with the osmoticity of 370 mOsm/kg; up to 15% of cells maintained their motility in 192 hours of storage at 4 °C; in 24 hours of storage more than half of the spermatozoa possessed the intact membranes of the heads, and about 50% of cells — the intact acrosomes. Following freeze-thawing the best results of the morphological survival of the spermatozoa were obtained in the same medium, and the tendency towards increasing the resistance of the acrosome towards hypertonicity of the applied medium was observed. A higher concentration of the ovomucoid was incorporated into the medium with the osmoticity of 200 mOsm/kg with the aim of reducing the injuries to the spermatozoa acrosomes, which are manifested under the hypotensive conditions. But the protein did not manifested the expected protective effect. During a long term storage of the cock spermatozoa at positive temperature and after freeze-thawing there was identified a strong correlation between the number of the spermatozoa and the injured membranes of the heads and the osmoticity of the applied cryoprotective medium (factor of correlation is 0.91, $P < 0.05$). The injuries to the cytoplasmic membranes and their permeabilities for the dye increase with a rise in the environmental osmotic pressure.

Fig. 2 shows the results of determining the fertilizing ability of the cryopreserved cock spermatozoa in cryoprotective media with different osmoticity. It is clear that the highest yield of the egg fertilization were obtained after inseminating the chickens with the spermatozoa, cryopreserved in protective media with the osmoticity in the range of 370–400 mOsmol/kg. Thus, the

Таблица 2 **Table 2**

Сохранность спермы петуха до замораживания, разбавленной средами различной осмотичности

Survival of the cock spermatozoa prior to freezing, diluted with the media with different osmoticities osmoticity of the medium, mOsm/kg

Осмотичность среды, мОсм/кг Osmoticity of the medium, mOsm/kg	Подвижность спермиев петуха, %, в течение времени хранения, ч, при 4 °С Motility of the cock spermatozoa after thawing during the period of storage at 4 °С, hours									Количество спермиев, % Amount of spermatozoa, %	
	2	24	48	72	96	120	144	168	192	с целой мембраной головки with intact membrane of head	с целой акросомой with intact acrosome
200	80	65	50	45	20	—	—	—	—	62,1 ± 2,7*	36,2 ± 4,7*
240	80	65	60	50	40	40	20	5	—	68,4 ± 1,7	44,8 ± 3,2
270	90	70	60	50	40	40	20	5	—	75,6 ± 1,2	52,1 ± 3,4
370	90	70	65	55	45	45	30	20	15	77,4 ± 2,3	59,1 ± 3,8
440	90	75	60	55	40	25	5	—	—	61,8 ± 1,4	52,3 ± 2,9
520	80	60	50	40	—	—	—	—	—	41,2 ± 2,1	42,4 ± 3,1

Примечание: * — количество сперматозоидов петуха с целой мембраной головки и целой акросомой определяли через 24 ч хранения при 4 °С.

Note: * — the amount of the cock spermatozoa with the intact membrane of the head and intact acrosomes was determined in 24 hours of storage at 4 °C.

Матеріал, захищений авторським правом

Таблица 3

Зависимость сохранности сперматозоидов петуха после замораживания-оттаивания от осмотичности применяемой криозащитной среды

Осмотичность среды, мОсм/кг	Подвижность спермиев петуха, %, в течение времени хранения, ч, при 4 °С				Количество спермиев, %	
	0,5	24	48	72	с целыми головками	с целыми акросомами
200	40	—	—	—	68,0 ± 2,3*	15,0 ± 3,2*
240	40	15	5	—	47,0 ± 2,1	20,0 ± 4,2
270	40	15	10	—	50,0 ± 2,45	31,0 ± 7,8
370	45	25	15	5	51,0 ± 3,2	32,7 ± 6,3
440	45	20	5	—	42,0 ± 2,1	33,2 ± 2,9
520	35	15	—	—	30,0 ± 2,6	33,0 ± 2,4

Примечание: * — количество жизнеспособных сперматозоидов петуха определяли в течение 15 мин после оттаивания.

ловок и около 50% клеток целую акросому. После замораживания-оттаивания лучшие результаты морфологической сохранности спермы получены с этой же средой, при этом наблюдается тенденция повышения резистентности акросомы при замораживании в сторону гипертоничности применяемой среды. В состав среды с осмотичностью 200 мОсмоль/кг введена более высокая концентрация овомукоида для уменьшения повреждений акросомы сперматозоидов, появляющихся в условиях гипотонии. Но ожидаемого защитного эффекта белок не проявил. При длительном хранении спермы петуха при положительной температуре и после замораживания-оттаивания обнаружена четкая корреляция количества сперматозоидов с поврежденными мембранами головок и осмотичностью применяемой криозащитной среды (коэффициент корреляции $r = 0{,}91$, $P < 0{,}05$). Нарушения цитоплазматической мембраны и ее проницаемость для красителя возрастают с увеличением осмотического давления внешней среды.

На рис. 2 представлены результаты определения оплодотворяющей способности криоконсервированной спермы петуха в криозащитных средах с различной осмотичностью. Как видно, наиболее высокие результаты оплодотворенности яиц получены после осеменения кур спермой, криоконсервированной в защитных средах с осмотичностью в пределах 370–400 мОсмоль/кг. Таким образом, именно в этой области находится оптимальное значение осмотичности криозащитной среды, применение которой обеспечивает наиболее высокую жизнеспособность спермы петуха после замораживания-оттаивания по описанному выше режиму. Найденный оптимальный диапазон осмотичности криозащитной среды гипертоничен по отношению к семенной плазме, осмотичность которой варьирует в пределах 320–340 мОсмоль/кг. Следовательно, можно предположить, что уже на 1-м этапе подготовки спермы к замораживанию при ее разбавлении криозащитной средой происходит частичная дегидратация клеток, которая обеспечивает сокращение времени насыщения клетки криопротекто-

Table 3

Dependence of survival of the cock spermatozoa after freeze-thawing on ssmoticity of the cryoprotective medium

Osmoticity of the medium, mOsm/kg	Motility of the cock spermatozoa after thawing during the period of storage at 4 °C, hours				Amount of spermatozoa, %	
	0.5	24	48	72	with intact heads	with intact acrosomes
200	40	—	—	—	68.0 ± 2.3*	15.0 ± 3.2*
240	40	15	5	—	47.0 ± 2.1	20.0 ± 4.2
270	40	15	10	—	50.0 ± 2.1	31.0 ± 7.8
370	45	25	15	5	51.0 ± 3.2	32.7 ± 6.3
440	45	20	5	—	42.0 ± 2.1	33.2 ± 2.9
520	35	15	—	—	30.0 ± 2.6	33.0 ± 2.4

Note: * — amount of viable cock spermatozoa was determined in 15 min after thawing.

optimum value of the osmoticity of the cryoprotective medium is exactly in this range, the application of which provides for the highest viability of the cock spermatozoa following freeze-thawing according to the above mode. The selected optimum range of the osmoticity of the cryoprotective medium is hypertonic towards the seminal plasma, the osmoticity of which varies from 320 to 340 mOsm/kg. Hence, it may be supposed that already at the first stage of preparation of the spermatozoa for freezing during its dilution with a cryoprotective medium there occurs partial dehydration of cells, which shortens the duration of saturation of the cell with a cryoprotectant, reduces the developing osmotic balance on the membrane following appearance of the intercellular ice crystals and prevents deadly intracellular crystallization.

Tables 4 and 5 demonstrate the composition and ratio of the components within cryoprotective media with similar osmoticities (390–400 mOsm/kg) and their influence on the survival of the cock spermatozoa after cryopreservation. The highest morphological and functional survival of the cock spermatozoa was obtained after cryopreservation with the media BHSV [11], C2 and C3. The absence of sodium glutamate in the composition (media C4 and C5) resulted in a rapid reduction in the yield of the spermatozoa cryopreservation. it should be noted that beside osmotic pressure of the

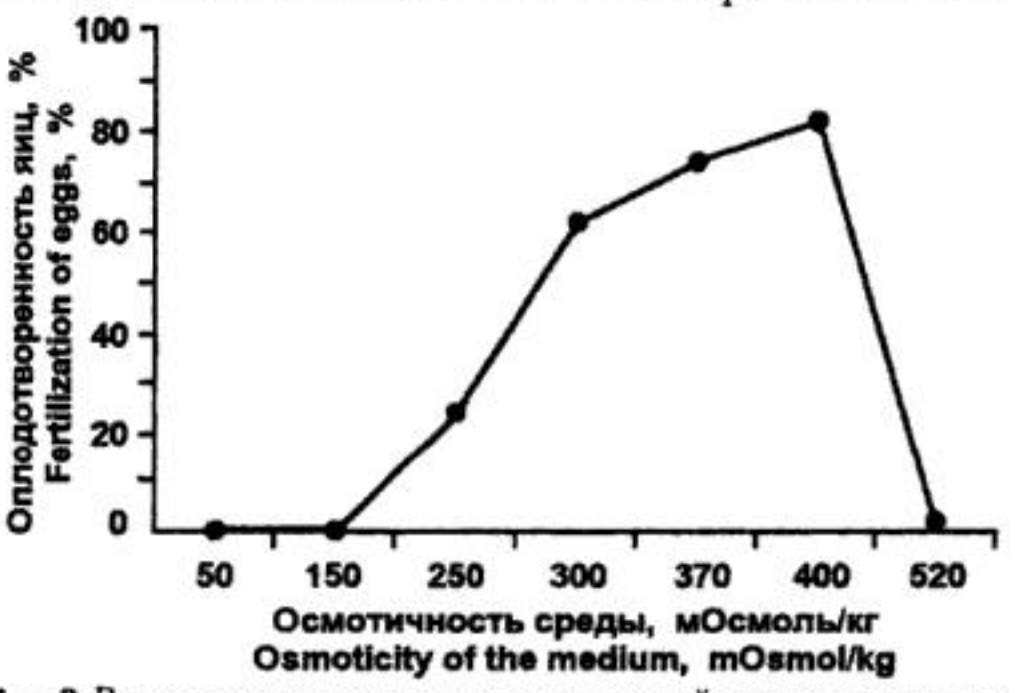


Рис. 2. Влияние осмотичности криозащитной среды на оплодотворяющую способность спермы петуха после замораживания-оттаивания.

Fig. 2. Influence of the osmoticity of the cryoprotective medium on the fertilizing ability of the cock spermatozoa following freeze-thawing.

Матеріал, захищений авторським правом

ром, уменьшает возникающий осмотический дисбаланс на мембране при появлении внеклеточных кристаллов льда и предотвращает губительную внутриклеточную кристаллизацию.

В табл. 4 и 5 представлены состав и соотношение компонентов в криозащитных средах с одинаковой осмотичностью (390–400 мОсмоль/кг) и их влияние на выживаемость спермиев петуха после криоконсервирования. Наиболее высокая морфологическая и функциональная сохранность спермиев петуха получена при криоконсервировании со средами BHSV [11], C2 и C3. Отсутствие в составе глутамата натрия (среды C4 и C5) привело к резкому снижению результатов криоконсервирования спермы. Следует отметить, что кроме осмотического давления среды одной из ее важных физико-химических характеристик является ионная сила [13]. Полученные данные подтверждают, что существует ее оптимальное значение (среды BHSV, C2, C3), обеспечивающее выживаемость сперматозоидов после замораживания-оттаивания. Любое изменение ионной силы среды (табл. 5), например ее резкое уменьшение в среде C5, составленной только из неэлектролитов, приводит к значимому снижению морфологической и функциональной сохранности спермы петуха после криоконсервирования. Но получение 34% оплодотворенных яиц после осеменения кур спермой, криоконсервированной в среде C5, свидетельствует о том, что доминирующей характеристикой является ее осмотичность и только потом ионная сила, соотношение катионов

Таблица 4 **Table 4**

Состав и соотношение компонентов в криозащитных средах

Composition and ratio of the components in the cryoprotective media

Компоненты среды* Components of the medium*	BHSV [11]	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Глутамат натрия Sodium glutamate	2,85	3,90	2,85	2,85	—	—	1,27
Глюкоза Glucose	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	—	—
Фруктоза Fructose	—	—	—	—	—	0,50	0,50
Лактоза Lactose	—	—	—	—	—	5,0	3,0
Инозит Inositol	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	—	—
Ацетат магния Magnesium acetate	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	—	—
Ацетат калия Potassium acetate	0,50	—	0,50	0,50	0,50	—	0,33
Ацетат натрия Sodium acetate	—	—	—	—	1,8	—	—
Глицин Glycin	—	—	—	—	—	0,8	—
ПВП-12000 PVP-12000	—	0,20	0,20	0,20	—	0,50	0,20
Протамин сульфат Protamine sulfate	—	0,028	0,028	0,028	—	—	—
Овомукоид Ovomucoid	—	—	—	0,30	—	—	—

Примечание: * — количество веществ в среде указано в г/100 мл воды.

Note: * — the amount of substances is given in g/100 ml water.

Таблица 5 **Table 5**

Влияние состава и соотношения компонентов в криозащитной среде на жизнеспособность спермиев петуха после замораживания-оттаивания

Influence of the composition and ratio of the components in the cryoprotective medium on the viability of the cock spermatozoa following freeze-thawing

Показатели жизнеспособности спермиев Viability features	BHSV [11]	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Подвижность, % Spermatozoa motility, %	55 ± 6	50 ± 4	55 ± 5	50 ± 3	45 ± 5	45 ± 5	50 ± 3
Переживаемость при 4 °C, ч* Revival of spermatozoa at 4 °C*	72	48	72	72	24	48	48
Количество спермиев с целыми мембранами головок, % Amount of spermatozoa with intact membranes of the heads, %	55,4 ± 3,2	52,1 ± 2,7	58,9 ± 2,3	54,2 ± 1,9	33,1 ± 4,2	34,6 ± 3,7	40,8 ± 3,1
Количество спермиев с целыми акросомами, % Amount of spermatozoa with intact acrosomes, %	22,1 ± 3,2	19,6 ± 2,6	24,1 ± 2,4	21,4 ± 2,8	12,6 ± 4,1	11,7 ± 3,9	17,4 ± 3,6
Оплодотворенность яиц, % Fertilization of eggs, %	79,8	68,1	82,8	77,4	36,2	34,0	71,0
Выводимость яиц, % Breeding ability of eggs, %	85,3	79,3	84,5	85,7	—	—	80,4
Вывод молодняка, % Breeding of young birds, %	71,2	54,0	67,2	66,3	—	—	64,1

Примечание: * — при хранении в течение указанного времени остается до 10–15% подвижных сперматозоидов.

Note: * — during storage within the said period there remain up to 10–15% of motile spermatozoa.

Матеріал, захищений авторським правом

калия и натрия или присутствие в среде двухвалентных катионов (Mg^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2} [4, 6]).

Таким образом, показано, что осмотичность является одной из самых важных физико-химических характеристик криозащитной среды, ее оптимальное значение находится в области гипертонии по отношению к семенной плазме спермы и равно 395–400 мОсмоль/кг при *pH* 6,7 ± 0,2. Использование состава криозащитной среды С2 и описанного режима замораживания-оттаивания спермы петуха позволяет получать оплодотворенность яиц и вывод молодняка на уровне 85 и 70% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Броерский А. В.* Криоконсервация спермы с/х птицы (Обзор иностранной литературы) // С.-х. биология.– 1989.– № 2.– С. 33–39.
2. *Курбатов А. Д., Платов Е. М., Корбан Н. В. и др.* Криоконсервация спермы с/х животных.– Л.: Агропромиздат, 1988.– 256 с.
3. *Линник Т. П., Терещенко А. В., Артеменко А. Б.* Влияние белковых добавок к криозащитной среде на сохранность спермиев петуха при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 2.– С. 35–39.
4. *Наук В. А.* Структура и функция спермиев с/х животных при криоконсервировании.– Кишинев: Штиинца, 1991.– 199 с.
5. *Сахацкий Н. И., Терещенко А. В., Артеменко А. Б.* Экспресс-метод оценки оплодотворяющей способности замороженно-оттаянной спермы сельскохозяйственной птицы // С.-х. биология.– 1987.– № 12.– С. 77–80.
6. *Hammerstedt R. H., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– 29.– P. 26–38.
7. *Liu Z., Foote R. H.* Ocrotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and non-permeable agents // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 207–218.
8. *Liu Z., Foote R. H. Brockett Ch. C.* Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 219–230.
9. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Studies of the factors causing abnormal arccosines and crooked-necks in fowl spermafozoa during freezing and thawing // Brit. Poultry Sc.– 1986.– 27, № 4.– P. 695–702.
10. *Maeda T., Terada T.* The morphology of fowl spermatozoa stored at 5 °C in diluents of various osmotic pressures // Japan Poultry Sc.– 1982.– 19, № 6.– P. 344–350.
11. *Schramm G. P., Hübner R.* Konservierung von Gefugel-sperma // Arch. Tierz.– 1989.– 32, № 1.– S. 51–61.
12. *Tselutin K., Narubina L, Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // Brit. Poultry Sc.– 1995.– 36.– P. 805–811.
13. *Watson P. E, Kunze E., Gramer P., Hammerstedt R. H.* A comparison of critical osmolality and hydraulic couductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa // J. Androl.– 1992.– 13.– P. 131–138.

Поступила 21.03.2000

medium, one of its important physical-chemical characteristics is the ionic strength [13]. The data obtained support the fact that there exists its optimum value (media BHSV, C2, C3), providing for survival of the spermatozoa after freeze-thawing. Any change in the ionic strength (Table 5), e.g. its rapid reduction in the C5 medium, which incorporates only non-electrolytes, results in the significant reduction in the morphological and functional survival of the cock spermatozoa after cryopreservation. But the yield of 34% of the fertilized eggs after inseminating the chickens with the spermatozoa, cryopreserved in the C5 medium, indicate that its osmoticity is the dominating feature, and only then come the ionic strength, ratio of the potassium and sodium cations, or availability of divalent cations (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}) in the medium [4, 6].

Thus, it may be concluded that osmoticity is one of the most important physical-chemical characteristics of the cryoprotective medium; its optimum value is in the hypertonic range with respect to the seminal plasma of the spermatozoa and equals 395–400 mOsm/kg at *pH* 6.7 ± 0.2. Application of the composition of the C2 cryoprotective medium and the described mode of freeze-thawing of the cock spermatozoa makes it possible to obtain fertilization of eggs and breeding of young birds at the levels of 85 and 70%, respectively.

REFERENCES

1. *Broyersky A. V.* Cryopreservation of spermatozoa of agricultural birds (Review of foreign literature) // S/kh. biologiya.– 1989.– № 2.– P. 33–39.
2. *Kurbatov A. D., Platov E. M., Korban N. V. et al.* Cryopreservation of spermatozoa of agricultural animals.– L.: Agropromizdat, 1988.– 256 p.
3. *Linnik T. P., Tereschenko A. V., Artemenko A. B.* Action of protein additives to cryoprotective medium on survival of cock spermatozoa during cryopreservation // Probl. kriobiol.– 1996.– № 2.– P. 35–39.
4. *Nauk V. A.* Structure and function of spermatozoa of agricultural animals during cryopreservation.– Kishinev: Shtiintza, 1991.– 199 p.
5. *Sakhatsky N. I., Tereschenko A. V., Artemenko A. B.* Express-method of evaluating fertilizing ability of the frozen-thawed spermatozoa of agricultural birds // S.-kh. biologiya.– 1987.– № 12.– P. 77–80.
6. *Hammerstedt R. H., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– 29.– P. 26–38.
7. *Liu Z., Foote R. H.* Ocrotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and non-permeable agents // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 207–218.
8. *Liu Z., Foote R. H. Brockett Ch. C.* Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 219–230.
9. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Studies of the factors causing abnormal arccosines and crooked-necks in fowl spermafozoa during freezing and thawing // Brit. Poultry Sc.– 1986.– 27, № 4.– P. 695–702.
10. *Maeda T., Terada T.* The morphology of fowl spermatozoa stored at 5 °C in diluents of various osmotic pressures // Japan Poultry Sc.– 1982.– 19, № 6.– P. 344–350.
11. *Schramm G. P., Hübner R.* Konservierung von Gefugel-sperma // Arch. Tierz.– 1989.– 32, № 1.– S. 51–61.
12. *Tselutin K., Narubina L, Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // Brit. Poultry Sc.– 1995.– 36.– P. 805–811.
13. *Watson P. E, Kunze E., Gramer P., Hammerstedt R. H.* A comparison of critical osmolality and hydraulic couductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa // J. Androl.– 1992.– 13.– P. 131–138.

Accepted in 21.03.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 616-008.64 UDC 57.043: 616-008.64

Патогенетическая коррекция метаболических нарушений введением криоконсервированных КЭП (на моделях экспериментального диабета и атеросклероза). Сообщение I. Влияние трансфузии криоконсервированных КЭП на состояние про- и антиоксидантного гомеостаза и липидный профиль крови при аллоксановом диабете

Ю. А. ДЕМИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Pathogenetic Correction of Metabolic Impairments by Injection of Cryopreserved Embryonic Liver Cells (on the Models of Experimental Diabetes and Atherosclerosis). Report I. Effect of Transfusion of Cryopreserved Embryonic Liver Cells on the State of Pro- and Antioxidative Homeostasis and Lipid Profile of Blood During Alloxanic Diabetes

Yu. A. DEMIN

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

На моделях экспериментального аллоксанового диабета показано, что использование однократной трансфузии аллогенных криоконсервированных клеток эмбриональной печени (КЭП) приводило к снижению степени выраженности гликемии, нормализации процессов пероксидации с восстановлением физиологического равновесия между степенью активности свободнорадикальных процессов и эндогенными антиоксидантными механизмами, нормализации липидного и липопротеинового профилей сыворотки крови.

На моделі експериментального алоксанового діабету показано, що використання однократної трансфузії алогенних кріоконсервованих клітин ембріональної печінки (КЕП) приводило до зниження ступеня вираження глікемії, нормалізації процесів пероксидації з відновленням фізіологічної рівноваги між ступенем активності вільнорадикальних процесів і ендогенними антиоксидантними механізмами, нормалізації ліпідного та ліпопротеїнового профілів сироватки крові.

Using the models of the alloxanic diabetes, the authors demonstrated that application of single transfusions of the allogenic cryopreserved cells of the embryonic liver resulted in the reduction of the extent of glycemia manifestation, normalization of the processes of peroxidation with recovery of the physiological balance between the extent of activity of free-radical processes and endogenous antioxidative mechanisms, normalization of the lipid and lipoprotein profiles of the blood serum.

Лечение сахарного диабета (СД) является важной задачей современной медицины практически всех стран мира. СД приводит к ранней инвалидности и летальности, которые обусловлены сосудистыми проявлениями: микроангиопатиями (ретино- и нефропатия) и макроангиопатиями (инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей) [2].

Известно, что в основе сосудистых расстройств при СД любого генеза лежат метаболические нарушения, основные из них гипергликемия, окислительный стресс как результат нарушения углеводного обмена, гиперлипидемия с изменением качественных характеристик липопротеинов и их накоплением в пенистых клетках являются основой атеросклеротического поражения сосудов [7].

Treatment of diabetes mellitus (DM) is a very important problem for health care services all over the world. DM results in early invalidization and lethality, which are due to vascular manifestations: microangiopathies (retino- and nephrophathy) and macroangiopathies (myocardial infarction, insult, gangrene of the lower limbs) [2].

It is known that vascular disturbances during the DM of any genesis are due to metabolic impairments, the basic ones among which are hyperglycemia, oxidative stress as a result of the disturbance of the carbohydrate exchange, hyperlipemia accompanied by alteration of the qualitative characteristics of lipoproteins and their accumulation in the foamy cells, which are the basis of the atherosclerotic injury to the vessels [7].

Матеріал, захищений авторським правом

По мнению [5], сахарный диабет по сущности обменных нарушений — естественная модель атеросклероза.

Для обоснования методов патогенетической коррекции сосудистых манифестаций при СД необходимо определить эффективность предлагаемых лечебных средств вышеперечисленных пусковых метаболических механизмов сосудистых поражений.

Существуют различные подходы к коррекции метаболических нарушений при данной соматической патологии, однако их эффективность в силу гетерогенности данного заболевания [1] не всегда удовлетворяет клиницистов, что требует поиска новых средств лечения. Это связано с тем, что часть больных данной патологией резистентна к препаратам, используемым для коррекции этих нарушений, в частности дислипопротеинемий.

В последнее время в разных областях медицины стали применять методы клеточно-тканевой терапии, а трансплантацию фетальных тканей (ФТ) поджелудочной железы кадавров человека используют при лечении СД уже около 20 лет [11]. Однако ФТ поджелудочной железы оказывают специфические эффекты и направлены на восстановление продукции инсулина. Но больные СД 1 типа относятся к не самой многочисленной части больных данной патологией. Гораздо чаще встречаются больные СД смешанного типа, что не всегда позволяет четко определить заболевание [1].

В связи с этим целесообразно использовать при лечении СД и его сосудистых проявлений наиболее активный фетальный препарат — КЭП, — обладающий многофакторным (иммунным, нейроэндокринным, гемопоэтическим и др.) регулирующим действием на нарушения гомеостаза [4].

Для обоснования коррекции метаболических нарушений были выбраны две экспериментальные модели, в которых скорость их развития соотносима с видовой продолжительностью жизни животных (крыс):

модель 1 — аллоксановый диабет у крыс, который сопровождается сравнительно быстрым проявлением метаболических нарушений (от 7 до 11 дней);

модель 2 — антиоксидантдефицитный атеросклероз, при котором вследствие использования специфической диеты (лишенной витаминов и антиоксидантов) на протяжении 1–2,5 месяцев происходит развитие метаболических нарушений, сходных с моделью 1.

Цель работы — изучение влияния трансфузий аллогенных КЭП на метаболические нарушения различного генеза для патогенетического обоснования использования их в арсенале методов лечения СД и его проявлений — микро- и макроангиопатий. Представлены данные однократной трансфузии аллогенных КЭП для коррекции метаболических нарушений при аллоксановом диабете.

Some researchers believe [5] that diabetes mellitus is a natural model of atherosclerosis judging by the nature and essence of the exchange impairments.

Substantiation of the methods of pathogenic correction of the vascular manifestations during DM requires, in the first place, determination of the efficiency of the proposed drugs towards the above triggering metabolic mechanisms of the vascular injuries.

There exist different approaches to correction of metabolic disturbances during the given somatic pathology, however, their efficiency does not always satisfy medical staff due to heterogeneity of the given disease [1], thus prompting a search for new methods of treatment. This relates to the fact that some patients with the given pathology are resistant to the preparations, applied for correction of these impairments, dyslipoproteinemias, in particular.

Recently the methods of cell-tissue therapy have been applied in various fields of medicine, and transplantation of fetal tissues (FT) of the pancreatic gland of the human cadavers have been used for treatment of DM for over 20 years [11]. However, the pancreatic FT exercise specific effects and are aimed at recovery of the insulin production. Though the patients of a CD-1 type belong to a small group of patients with the given pathology. Much more frequently the patients suffer from DM of a mixed type, which sometimes prevents from making a clear diagnosis [1].

In this respect the authors thought it expedient to apply the most active fetal preparation for treatment of DM and its vascular manifestations – the embryonic liver cells (ELC), which possess multifactor (immune, neuroendocrine, hemopoietic, etc.) regulating action on the homeostatic impairments [4].

To substantiate correction of the metabolic impairments the authors selected two experimental models, in which the rate of the development was comparable with the life period of animals (rats):

model 1 — alloxanic diabetes in rats, which was accompanied by a comparatively rapid manifestation of metabolic impairments (from 7 to 11 days);

model 2 — antioxidative-deficient atherosclerosis, during which the metabolic impairments, similar to those in model 1, are developed due to the application of a specific diet (void of vitamins and antioxidants) for 1–1.5 months.

The aim of the given research was to investigate the influence of transfusions of the allogenic ELC on the metabolic impairments of various genesis for pathogenetic substantiation of their usage within the arsenal of methods of treatment of DM and its manifestations — micro- and macroangiopathies. Report I deals with the data on applying single transfusions of the allogenic ELC for correction of metabolic impairments during the alloxanic diabetes.

Mature male Wistar rats with the body weights of 180–230 g were used in the experiments.

Alloxan trihydrate ("Lachema", Czech republic) was administered intraperitoneally by single injec-

Матеріал, захищений авторським правом

В работе использованы половозрелые крысы-самцы линии Вистар массой тела 180–230 г.

Аллоксан тригидрат производства фирмы "Lachema" (Чехия) вводили внутрибрюшинно однократно в дозе 200 мг/кг веса животного после предварительной 24-часовой депривации пищи и при полном сохранении их доступа к воде. У 168 крыс из 200 к 7-м суткам развился диабет, верифицированный по уровню глюкозы; 54 крысам с подтвержденным по уровню глюкозы СД, начиная с 8-х суток после введения аллоксана, проводили однократную трансфузию КЭП (5–7 недель гестации) в хвостовую вену в объеме 0,5 мл, содержащем 0,4·10 КЭП. Препарат получали по методу, разработанному в ИПКиК НАН Украины [4].

На 7-е, 15- и 35-е сутки изучали степень выраженности гликемии, уровень основных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и показатели липидного спектра крови.

Крыс умерщвляли декапитацией, предварительно усыпляя их хлороформом (10–12 крыс на каждую экспериментальную точку).

Уровень глюкозы определяли при помощи стандартных наборов производства "Lachema" (Чехия). Показатели ПОЛ – диеновые конъюгаты (ДК) и малоновый диальдегид (МДА) – в эритроцитах и плазме крови, активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах определяли спектрофотометрическим методом [8–10].

Уровень холестерина и триглицеридов (ТГ) определяли ферментативным методом с помощью стандартных диагностикумов производства "DiaSystem Int." (Германия). Холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) измеряли в супернатанте после преципитации липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) с помощью гепарин-марганцевого реактива [6]. Холестерин ЛПНП вычисляли по формуле Friedwald [6].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*–критерия Стьюдента.

Как и следовало ожидать, наиболее выраженным метаболическим изменением явилось устойчивое повышение уровня глюкозы крови опытных крыс в 3–5 раз по сравнению с уровнем интактных крыс на протяжении всего наблюдаемого периода (35 сут) (рис. 1). Максимальный пик гликемии фиксировался на 15-е сутки и в 5 раз превышал контрольные значения ($P < 0,05$). Подобный уровень гликемии и связанное с ней нарушение поступления глюкозы в клетки вызывают сбой механизмов энергообразования и энергоаккумуляции. Последнее сопровождается появлением в тканях и крови большого количества недоокисленных продуктов метаболизма. Главным образом это продукты ПОЛ, так как недостаток глюкозы компенсируется включением "запасного"энергетического шунта — окисления жирных, в том числе ненасыщенных

tions at a dose of 200 mg/kg of the body weight following 24-hour pre-deprivation of food and full access to water.In 168 rats out of 200 the diabetes was developed by the 7th day, verified by the level of glucose; 54 rats with the DM, verified by the glucose level, experienced single transfusion of the ELC suspension (5–7 weeks of gestation) into the tail vein in the volume of 0.5 ml, containing 0.4·10 ELC, starting from the 8th day after administration of alloxan. The preparation was obtained with a method, developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4].

The extent of glycemia manifestation, level of the basic products of the lipid peroxidation (LPO) and features of the blood lipid spectrum were studied at the 7th, 15th and 35th days.

The rats were slaughtered by decapitation, putting them to sleep beforehand with chloroform (10–12 rats for every experimental point).

The level of glucose was determined with the help of standard reagent kits ("Lachema", Czech Republic). The features of the LPO – dien conjugates (DC) and malone dialdehyde (MDA) – in red cells and blood plasma, the activity of the catalase and superoxide dismutase (SOD) in red cells were evaluated spectrophotometrically [8–10].

The levels of cholesterol and triglycerides (TG) were determined with the enzymatic method using standard reagent kits (DiaSystem Int., Germany). Cholesterol of the high-density lipoproteins (HDLP) was measured in the supernatant following precipitation of the lipoproteins of low and very low densities (LDLP and VLDLP) with a heparin-manganic reagent [6]. The LDLP cholesterol was calculated by the formula of Friedwald [6].

The results obtained were statistically using a *t*-criterion of a Student's method.

As expected, the most manifested metabolic change was a persisting increase in the level of glucose in blood of the experimental rats by 3–5-fold as compared with that in intact rats throughout the whole period of observation (35 days) (Fig. 1). The maximum peak of glycemia was registered at the 15th day and exceeded the control values by 5-fold ($P < 0.05$). This level of glycemia and the related disturbance of the glucose supply into the cells brings about troubles in the mechanisms of energy formation and energy accumulation. The latter is accompanied by appearance of superoxidized metabolic products in the tissues and blood. Mainly these the LPO products, since the deficit of glucose is compensated for by triggering of the "reserve" energetic shunt – oxidation of fatty acids, including unsaturated and highly unsaturated, which are one of the sources of free radicals [7].

In the given model of the diabetes the LPO activation and a rise in the level of the LPO products in the blood of experimental animals were identified already at the 7th day following their exposure (Fig. 2).

Матеріал, захищений авторським правом

или высоконенасыщенных кислот, являющихся одним из источников свободных радикалов [7].

При данной модели диабета активацию ПОЛ и повышение уровня продуктов пероксидации в крови подопытных животных фиксировали уже на 7-е сутки после их воздействия (рис. 2). Об активации начальных стадий ПОЛ в тканях свидетельствует повышенный уровень ДК эритроцитов в 1,5–2,5 раза на протяжении всего периода исследования. Максимальный пик накопления ДК в эритроцитах отмечался на 15-е сутки, что сопровождалось гликемическим пиком. К концу наблюдаемого периода нормализации данного метаболита не наступало. В плазме крови подопытных животных повышение уровня ДК носило менее выраженный характер и в 1,5 раза превышало нормальные величины. На 15-е сутки концентрация ДК в плазме крови была максимальной и составила 175% от нормы ($P < 0,05$).

Содержание в эритроцитах крови МДА возрастало на 7-е сутки на 174% от нормы, достигая на 15-е сутки максимальных значений (более чем в 2 раза, $P < 0,05$) без нормализации к концу периода наблюдений (рис. 2), а в плазме рост данного метаболита был менее выраженным, максимальная концентрация его на 15-е сутки в 1,7 раза превышала таковую у интактных животных и сохранялась практически на одном уровне до 35-х суток.

Подобное повышение уровня пероксидации в эритроцитах и плазме крови в значительной степени обусловлено нарушениями работы антиоксидантных систем, что выражалось в снижении активности каталазы эритроцитов и составляло на 7-е сутки 63, 15-е сутки – 52 и на 35-е сутки – 65% от интактного контроля ($P < 0,05$) (рис. 3). Аналогичную динамику наблюдали в отношении СОД эритроцитов. Максимальное снижение ее уровня



Рис. 1. Динамика гликемии у пораженных диабетом крыс и при трансфузии КЭП: *1* – норма; *2* – диабет; *3* – диабет + КЭП.

Fig. 1. Dynamics of glycemia in diabetic rats and during the ELC transfusions: *1* – normal state; *2* – diabetes; *3* – diabetes + ELC.

Activation of the original LPO stages in the tissues is supported by an increased level of DC in red cells by 1.5–2.5-fold throughout the whole period of observation. The maximum peak of the DC accumulation in red cells was reported by the 15th day, accompanied by a glycemic peak. By the end of the period of observation the level of the given metabolite was not normalized. In the blood plasma of experimental animals an increase in the DC level was less pronounced and by 1.5-fold exceeded the normal values. By the 15th day the DC concentration in the blood plasma was maximum and comprised 15% from the normal value ($P < 0.05$).

The content of the MDA in red cells increased by the 7th day by 174% of the normal value, reaching maximum volumes by the 15th day (by more than 2-fold, $P < 0.05$) (Fig. 2) and without normalization by the end of the period of observation, while the growth of the given metabolite in plasma was less

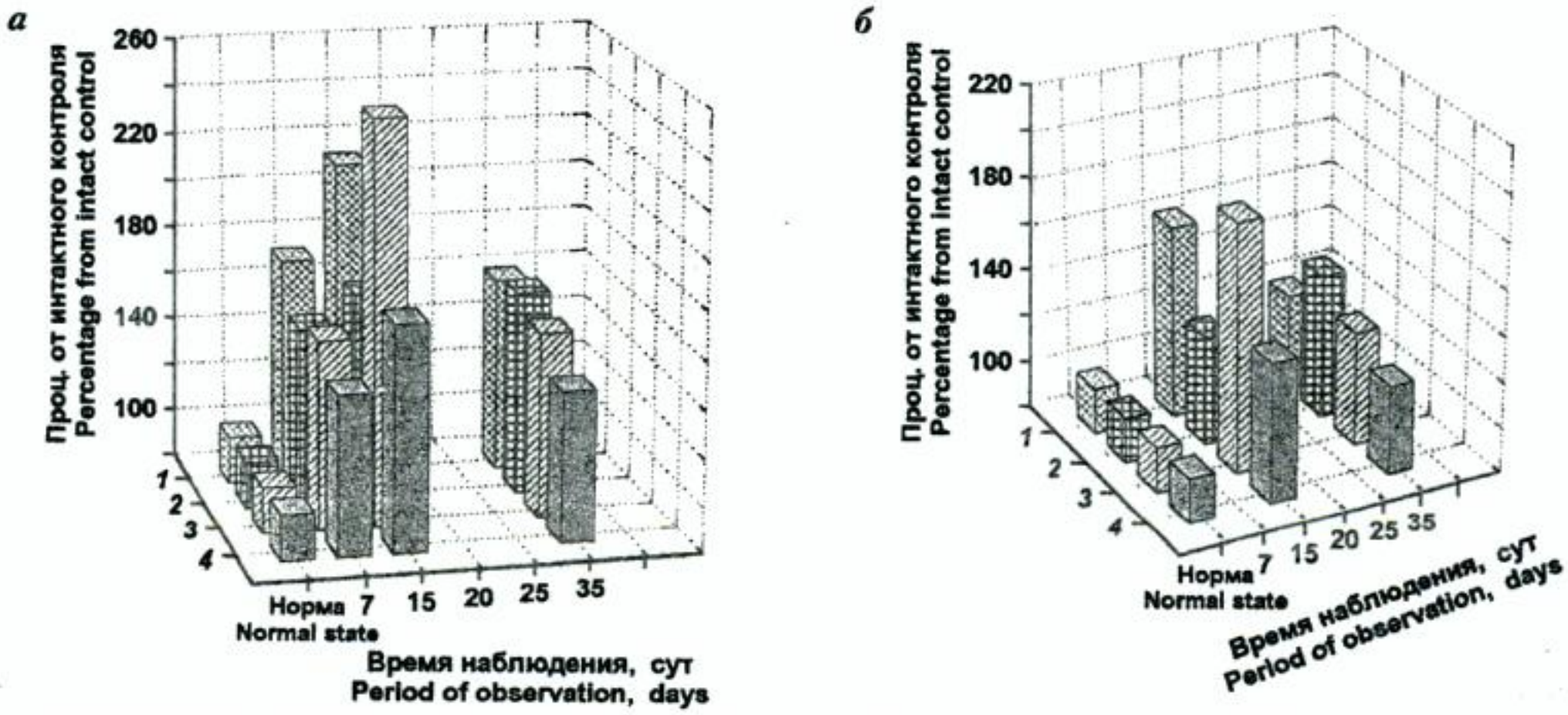


Рис. 2. Интенсивность процессов ПОЛ: *а* – в динамике аллоксанового диабета; *б* – после трансфузии КЭП для изучаемых показателей: *1* – $МДА_{эр}$; *2* – $МДА_{пл}$; *3* – $ДК_{эр}$; *4* – $ДК_{пл}$.

Fig. 2. Intensities of the LPO processes: *a* – in the dynamics of the alloxanic diabetes; *б* – following the ELC transfusions for the studied features: *1* – MDA_{rbc}; *2* – MDA_{pl}; *3* – DC_{rbc}; *4* – DC_{pl}.

Матеріал, захищений авторським правом



Рис. 3. Изменение активности ферментов АО защиты при аллоксановом диабете и после трансфузии КЭП: *1* – норма; *2* – $КАТ_{эр}$-Д; *3* – $КАТ_{эр}$-Д + КЭП; *4* – $СОД_{эр}$-Д; *5* – $СОД_{эр}$-Д + КЭП.

Fig. 3. Changes in the activities of the enzymes of the AO-protection during the alloxanic diabetes and after the ELC transfusions: *1* – normal state; *2* – CAT_{rbc}-D; *3* – CAT_{rbc}-D + ELC; *4* – SOD_{rbc}-D; *5* – SOD_{rbc}-D + ELC.

фиксировали на 15-е сутки (64% от интактного контроля). На 35-е сутки в группе животных с аллоксановым диабетом нормализации активности обоих ферментов не отмечалось.

Использование трансфузии КЭП оказывало существенное влияние на выраженность гликемии и изучаемые показатели свободнорадикальных процессов.

Однократное введение КЭП крысам, пораженным диабетом, на 15-е сутки снижало степень гликемии на 27%, а на 35-е – на 57% по сравнению с нелеченными животными ($P < 0{,}05$), однако не восстанавливаясь до уровня гликемии интактных животных (см. рис. 1). Подобная тенденция отмечалась в отношении изучаемых показателей ПОЛ (см. рис. 2). Так, уровень ДК эритроцитов на 15-е сутки снижался на 24% по сравнению с нелеченными крысами, а к 35-м достигал уровня интактного контроля. Аналогичная динамика выявлена и для ДК плазмы. Уровень МДА эритроцитов при использовании трансфузий КЭП существенно снижался на 15-е (на 23% от нелеченых животных), а на 35-е сутки достигал нормальных значений. Концентрация данного метаболита ПОЛ в плазме опытных животных на 15-е сутки снижалась аналогично МДА эритроцитов по сравнению с нелеченой группой, однако на 35-е сутки уровень его превышал интактные значения для данного показателя (143% от нормы). Этот факт может свидетельствовать о восстановлении проницаемости мембраны эритроцитов для данного метаболита без компенсации его избыточного накопления в тканях на предыдущих этапах развития патологического процесса.

Позитивное влияние трансфузий КЭП отмечалось нами и на антиоксидантные ферменты. Уровень каталазы уже на 15-е сутки превышал на 65% аналогичный показатель в нелеченой группе животных и не отличался от интактных значений. Наблюдалась тенденция к повышению активности

pronounced. Its maximum concentration by the 15th day by 1.7-fold exceeded that in the intact animals and was maintained at nearly the same level until the 35th day.

Such a rise in the level of peroxidation in red cells and blood plasma is mainly due to the impairments in functioning of the antioxidative systems, which was manifested as a reduction in the activity of the red cell catalase and which comprised 63% from intact control by the 7th day, 52% – by the 15th day and 65% from intact control – by the 35th day ($P < 0.05$) (Fig. 3). A similar dynamics was reported for superoxide dismutase (SOD) of red cells. Maximum decrease in its level was reported by the 15th day (65% from intact control). The activities of both enzymes were not normalized by the 35th day in the group of animals with alloxanic diabetes.

Application of the ELC transfusion significantly affected manifestation of glycemia and the studied features of free-radical processes.

A single injection of the ELC to the rats, suffering from diabetes, reduced the extent of glycemia by 27% by the 15th day, and by 57% – by the 35th day, though it was not restored up to the level of glycemia in intact animals (see Fig. 1). A similar tendency was reported towards the studied LPO features (see Fig. 2). For example, the level of the DC in red cell by the 15th day was reduced by 24% as compared with the non-treated rats, and by the 35th day it reached the level of intact control. A similar dynamics was observed for the DC of the plasma. The level of the red cell MDA when using the ELC transfusions was significantly reduced by the 15th day (by 23% from the level of the non-treated animals), and by the 35th day it reached the normal values. Concentration of the given LPO metabolite in the plasma of experimental animals by the 15th day was reduced similarly to the red cell MDA as compared with the non-treated group; however, by the 35th day its level exceeded the intact values for the given feature (143% from the normal level). This fact may be indicative of the recovery of the red cell membrane to the given metabolite without compensating for its excessive accumulation in the tissues at the earlier stages of development of the pathological process.

The authors also observed a positive action of the ELC transfusions on the antioxidative enzymes. The level of the catalase already by the 15th day exceeded by 65% a similar feature in the non-treated group of animals and did not differ from the intact values. A tendency towards increasing its activity by the 15th day with a complete recovery by the end of the period of observation was reported (Fig. 3).

The data on the dynamics of the studied features of the lipid profile of the blood serum in the animals with the alloxanic diabetes are submitted in Fig. 4. Already by the 7th day after exposure the experimental animals demonstrated the symptoms of the hyperlipemia, which was manifested by a 2-fold rise in the

Матеріал, захищений авторським правом

СОД на 15-е сутки с полным восстановлением к концу периода наблюдений (рис. 3).

Данные о динамике изучаемых показателей липидного профиля сыворотки крови животных с аллоксановым диабетом приведены на рис. 4. Уже на 7-е сутки после воздействия у опытных животных отмечались признаки гиперлипидемии, что выражалось в 2-кратном повышении уровня ТГ и высокоатерогенной фракции ЛПОНП, которые являются основными носителями ТГ в организме. К 15-м суткам уровень ТГ возрастал в 2,7 раза по сравнению с интактным контролем и сохранялся приблизительно на том же уровне до конца наблюдений.

С 15-х суток у животных с аллоксановым диабетом фиксируется выраженная гиперхолестеринемия с превышением контрольных значений общего холестерина в 2 раза, сохраняющаяся до конца наблюдаемого периода.

Как известно, у крыс антиатерогенная фракция ЛПВП, осуществляющая обратный транспорт холестерина из тканей в печень, в 2 раза превышает значения фракции ЛПНП в отличие от человека и других атерогенных видов млекопитающих (кролик), имеющих обратную зависимость в соотношении данных фракций. При определенных патологических состояниях, в частности при диабете, может происходить перераспределение липопротеиновых фракций с увеличением уровня атерогенных фракций ЛПНП и ЛПОНП [3]. Подобная ситуация складывается в процессе развития метаболических изменений в данной модели. На 7-е сутки наблюдалась тенденция к развитию адекватной реакции на повышение ЛПВП на фоне 2-кратного снижения ЛПНП. Однако на 15-е сутки уровень атерогенной фракции ЛПНП не только превысил в 2,6 раза интактный, но почти в 2 раза

level of triglycerides and highly atherogenic fraction of VLDLP, which are the basic carriers of TG in the organism. By the 15th day the level of TG increased by 2.7-fold as compared with intact control and was maintained at nearly the same level until the end of observations.

Starting from the 15th day the animals with the alloxanic diabetes demonstrate a manifested hypercholisterinemia, and the values of the control level of total cholesterol were exceeded by 2-fold, being maintained until the end of the period of observations.

It is known that in rats the antiatherogenic fraction of the HDLP, which realizes the return transport of cholesterol from the tissues into the liver, by 2-fold exceeds the values of the LDLP fraction, in contrast to that in man and other atherogenic species of animals (rabbit), which have a reverse dependence of the ratio of the given fractions. During certain pathological states, diabetes, in particular, a re-distribution of the lipoprotein fractions with a rise in the level of the atherogenic fractions of the LDLP and HDLP may occur [3]. This pattern occurs due to the development of the metabolic changes in the given model. By the 7th day there was observed a tendency to triggering an adequate response to a rise in the HDLP during a 2-fold reduction in the LDLP. However, by the 15th day the level of the atherogenic LDLP fraction not only exceeded the intact values by 2.6-fold, but also exceeded by 2-fold the level of the antiatherogenic fraction in the rats with the given pathology. By the 15th day, in spite of the fact that the HDLP level by 1.4-fold exceeded the intact values, this event cannot be considered as a compensatory one, since the atherogenic fractions of the HDLp and LDLP by 2.6-fold exceeded the intact control, i.e. the rats with the alloxanic diabetes develop a persisting impairment of the system of the cholesterol backward transport by the 15th day, which lasts until the end of observations (Fig. 4).

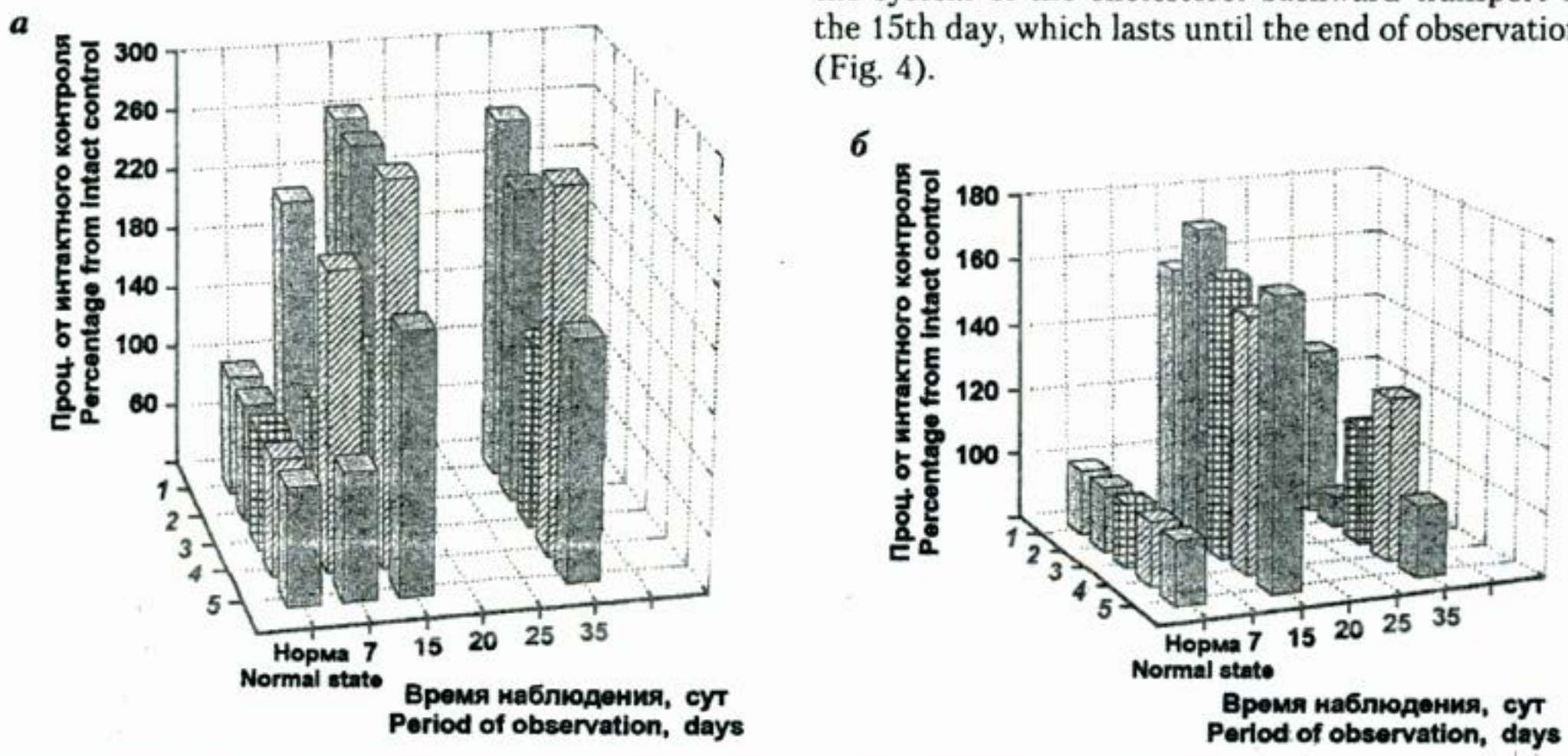


Рис. 4. Изменение спектра липидов и липопротеинов крови крыс: *а* – при аллоксановом диабете; *б* – после трансфузии КЭП для изучаемых показателей: *1* – ЛПОНП; *2* – ЛПНП; *3* – ЛПВП; *4* – ТГ; *5* – ОХ.

Fig. 4. Changes in the spectra of lipids and lipoproteins of the rat blood: *a* – during the alloxanic diabetes; *б* – after transfusion of the ELC for the studied features: *1* – VLDLP; *2* – LDLP; *3* – HDLP; *4* – TG; *5* – OC.

Матеріал, захищений авторським правом

уровень антиатерогенной фракции у крыс с данной патологией. На 15-е сутки, несмотря на то, что уровень ЛПВП в 1,4 раза превысил интактный, этот факт нельзя рассматривать как компенсаторный, поскольку атерогенные фракции ЛПНП и ЛПОНП в 2,6 раза превышали интактный контроль, т.е. у крыс с аллоксановым диабетом на 15-е сутки вплоть до конца наблюдений развивается стойкое нарушение системы обратного транспорта холестерина (рис. 4).

Использование трансфузии КЭП существенно влияло на состояние липидного профиля сыворотки крови животных. На 15-е сутки уровень гипертриглицеридемии был почти в 2 раза ниже уровня интактных животных, а на 35-е сутки данный показатель не отличался от показателя интактных животных. Изменение уровня общего холестерина не было столь выраженным на 15-е сутки (87% от нелеченых животных), однако к концу наблюдений его концентрация находилась практически в пределах нормальных значений.

Подобный процесс сопровождался перераспределением общего холестерина по его транспортным формам, характерным для данного вида животных. Так, уровень атерогенных фракций ЛПНП и ЛПОНП у леченых крыс постепенно снижался, начиная с 15-х суток вплоть до конца периода наблюдений на фоне адекватного повышения антиатерогенной фракции – ЛПВП. Конечное соотношение транспортных липопротеинов в группе леченых КЭП животных свидетельствовало о восстановлении прямого и обратного транспорта холестерина с адекватной утилизацией его в гепатоцитах.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

при экспериментальном аллоксановом диабете наблюдаются резко выраженные метаболические нарушения в виде гипергликемии, синдрома пероксидации на фоне угнетения антиоксидантного потенциала, гиперлипидемии и дислипопротеинемии;

использование однократной трансфузии аллогенных КЭП приводило к снижению степени выраженности гликемии, нормализации процессов пероксидации с восстановлением физиологического равновесия между степенью активности свободнорадикальных процессов и эндогенными ферментативными антиоксидантными механизмами. Очевидно, последнее связано с восстановлением энергоснабжения клеток глюкозой и уменьшением степени гипоксии;

введение КЭП имело позитивный эффект на состояние липидного статуса крыс и характеризовалась нормализацией уровня как липидных, так и липопротеиновых фракций.

Полученные данные свидетельствуют, что использование трансфузий КЭП перспективно в плане патогенетической коррекции метаболических нарушений при СД.

Application of the ELC transfusion significantly affected the state of the lipid profile of the blood serum of animals. By the 15th day the level of hyperglyceridemia was by nearly 2-fold lower as compared with that of intact animals, and by the 35th day this feature did not differ from the one in intact animals. A change in the level of total cholesterol was not that manifested by the 15th day (87% from the non-treated animals), however, by the end of the period of observations its concentration was practically within the range of the normal values.

This process was accompanied by the re-distribution of the total cholesterol by its transport forms, characteristic of the given species of animals. For example, the levels of the atherogenic fractions (HDLP and LDLP) were gradually reduced in the treated rats, starting from the 15th day, during the adequate rise in the antiatherogenic fraction – HDLP. A finite ratio of transport lipoproteins in the group of animals, treated with the ELC, testified to the recovery of the direct and backward transport of cholesterol with its adequate utilization in hepatocytes.

Thus, the experimental data thus obtained make it possible to conclude on the following:

the alloxanic diabetes results in the development of the strongly pronounced metabolic impairments in the forms of hyperglycemia, syndrome of peroxidation during the inhibition of the antioxidative potential, hyperlipidemia and dyslipoproteinemia;

application of a single transfusion of the allogenic ELC brings about a reduction in the extent of manifestation of glycemia, normalization of the processes of peroxidation with a recovery of a physiological balance between the extent of the activity of free-radical processes and endogenous enzymatic antioxidative mechanisms. Apparently, the latter relates to the recovery of the energy-supply of the cells with glucose and a reduction in the extent of hypoxia;

injection of the ELC exercised a positive effect on the state of the lipid status of the rats and was characterized by normalization of the level of both lipid and lipoprotein fractions.

The data obtained indicate that application of the ELC transfusions opens up prospects for pathogenic correction of the metabolic impairments during the DM.

REFERENCES

1. *Asfandiyarova N. S., Kolcheva N. G., Shatrova I. V.* On the heterogeneity of diabetes mellitus // Terapev. arkhiv.– 1999.– № 12.– P. 49–52.
2. *Balabolkin M. I., Kreminskaya V. M.* Pathogenesis and prevention of vascular complications of diabetes mellitus // Terapev. arkhiv.– 1999.– № 10.– P. 5–12.
3. *Vershinina S. F.* Experimental radial diabetes mellitus and its role in distant radiation pathology: Abstr. Thesis Doctor. Med. Sci.– St. Petersburg, 1999.– 35 p.

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. *Асфандиярова Н. С., Колчева Н. Г., Шатрова И. В.* О гетерогенности сахарного диабета // Терап. архив.– 1999.– № 12.– С. 49–52.
2. *Балаболкин М. И., Креминская В. М.* Патогенез и профилактика сосудистых осложнений сахарного диабета // Терап. архив.– 1999.– № 10.– С. 5–12.
3. *Вершинина С. Ф.* Экспериментальный лучевой сахарный диабет и его место в отдаленной радиационной патологии: Автореф. ... дис. докт. мед. наук.– СПб, 1999.– 35 с.
4. *Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени.– Киев: Наук. думка, 1988.– 192 с.
5. *Ефимов А. С.* Диабетические ангиопатии.– М.: Медицина, 1989.– 288 с.
6. *Измерение* концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности // Лабораторные измерения липидов, липопротеинов и аполипопротеинов / Под ред. Н. Рифаи, Г. Варника: Пер. с англ.– М.: Фармарус-принт, 1997.– С. 139–142.
7. *Климов А. Н., Никульчева Н. Г.* Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.– СПб., 1999.– 512 с.
8. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– № 1.– С. 16–19.
9. *Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии.– 1990.– 36, № 2.– С. 88–91.
10. *Сопряженные* диены. Метод измерения веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторные измерения липидов, липопротеинов и аполипопротеинов / Под ред. Н. Рифаи, Г. Варника. Пер. с англ.– М.: Фармарус-принт, 1997.– С. 380–382.
11. *Суббота Н. П.* Проблемы современной биологической медицины // Пробл. криобиологии.– 1997.– № 4.– С. 3–14.

Поступила 06.06.2000

4. *Grischenko V. I., Lobyntseva G. S., Votyakova I. A., Shereshkov S. I.* Hemopoietic cells of embryonic liver.– Kiev: Naukova dumka publ., 1988.– 192 p.
5. *Efimov A. S.* Diabetic angiopathies.– M.: Meditsina publ., 1989.– 288 p.
6. *Measuring* cholesterol concentration of high density lipoproteins // Laboratory measurements of lipids, lipoproteins and apolipoproteins / N. Rifai, H. Varnick, eds.:Transl. from English.– M.: Farmarus-print publ., 1997.– P. 139–142.
7. *Klimov A. N., Nikulcheva N. G.* Exchange of lipids and lipoproteids and its impairments.– St. Petersburg, 1999.– 512 p.
8. *Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., Tokarev V. E.* A method for measuring catalase activity // Lab. delo.– 1988.– № 1.– P. 16–19.
9. *Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. I.* A simple and sensitive method for determining activities of superoxide dismutase, based on reaction of quartzetine oxidation // Vopr. med. khimii.– 1990.– 36, № 2.– P. 88–91.
10. *Conjugated* diens. A method of measuring the substances, reacting with thiobarbituric acid // Laboratory measurements of lipids, lipoproteins and apolipoproteins / N. Rifai, H. Varnick, eds. Transl. from English.– M.: Farmarus-print publ., 1997.– P. 380–382.
11. *Subbota N. P.* Problems of current biological medicine // Probl. kriobiol.– 1997.– № 4.– P. 3–14.

Accepted in 06.06.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 618.11-002-097: 611.013.84: 57.043

UDC 618.11-002-097: 611.013.84: 57.043

Состояние иммунитета у больных с подострым сальпингоофоритом после трансплантации криоконсервированной хориальной ткани

В. И. ГРИЩЕНКО, Н. П. СУББОТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В. А. ПИТЬКО

Харьковский государственный медицинский университет

State of Immunity in Patients with Subacute Salpingo-oophoritis Following Transplantation of Cryopreserved Chorionic Tissue

V. I. GRISCHENKO, N. P. SUBBOTA

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

V. A. PITKO

Kharkov State Medical University

Изучено влияние трансплантации криоконсервированной хориальной ткани на клинические проявления заболевания и иммунологические показатели больных с подострым сальпингоофоритом. Полученные результаты по использованию в комплексном лечении больных с подострыми сальпингоофоритами трансплантации криоконсервированной хориальной ткани свидетельствуют о том, что данный препарат, помимо выраженного клинического эффекта, оказывает иммуномодулирующее действие.

Вивчено вплив трансплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на клінічні прояви захворювання та імунологічні показники хворих з підгострим сальпінгоофоритом. Отримані результати щодо використання в комплексному лікуванні хворих з підгострим сальпінгоофоритом трансплантації кріоконсервованої хоріальної тканини свідчать про те, що даний препарат, крім вираженого клінічного ефекту, виявляє імуномодулюючу дію.

The authors studied the action of transplantation of cryopreserved chorionic tissue on the clinical manifestations of the disease and immunological features in the patients with the subacute salpingo-oophoritis. The results obtained on the application of the transplantation of cryopreserved chorionic tissue in complex therapy of patients with the subacute salpingo-oophoritis indicate that the given preparation, beside a manifested clinical effect, exercises an immune-modulating action.

В настоящее время происходит эволюция структуры и клинического течения воспалительных заболеваний внутренних половых органов, стали преобладать воспалительные заболевания гениталий без яркой клинической картины, стертые, малосимптомные их формы [1]. Воспаление придатков матки со стертой клинической симптоматикой или с более яркой манифестной картиной может принять подострое или хроническое течение, что вызывает нарушение функций самых разных органов и систем [4].

Многие авторы считают, что одной из причин подострого течения сальпингоофоритов и недостаточной эффективности противовоспалительной терапии является снижение иммунологической реактивности организма [7]. Это обусловливает целесообразность более широкого использования различных иммуностимулирующих препаратов в комплексной патогенетической терапии данного заболевания. Но применение одних частично огра-

Currently we evidence the evolution of the structure and clinical occurrence of the inflammatory diseases of the inner sexual organs, the inflammatory diseases of the genitals without clear clinical pattern and distinct symptoms are becoming predominant [1]. The inflammation of the uterine appendages with shaky clinical symptoms or with stronger manifested pattern may acquire subacute or chronic occurrence, which may result in the impairment of functions of different organs and systems [4].

Many researchers believe that one of the reasons for subacute occurrence of salpingo-oophoritis and insufficient efficiency of the antiinflammatory therapy is a decrease in the immunologic reactivity of the organism [7]. This prompts the expediency of a wider application of various immune-stimulating preparations in complex pathogenetic therapy of the given disease. Though clinical application of some of them is limited by their high toxic properties (prodigiozane), and the others are insufficiently effective

Матеріал, захищений авторським правом

ничено их высокими токсическими свойствами (продигиозан), другие недостаточно эффективны (метилурацил, Т-активин), поэтому важен поиск новых эффективных иммуномодуляторов, особенно естественного происхождения. Перспективным в этом отношении может стать биопрепарат криоконсервированной хориальной ткани, получаемый из хориона человека 8–10 недель гестации [6]. Хориальная ткань является полифункциональной в эндокринном и иммунологическом отношении преимущественно с репродуктивными иммуномодуляторами, цитокинами, интерлейкинами [9]. Но эти вещества легко разрушаются при термальных и химических воздействиях, т.е. содержатся только в живой ткани. Сохранить биопрепарат хориона жизнеспособным и пригодным к трансплантации позволяет эффективная программа криоконсервирования [3]. Использование этого биопрепарата в гинекологической практике даст возможность значительно расширить спектр тканевых препаратов и возможности противовоспалительной терапии.

Учитывая, что одним из основных показателей эффективности противовоспалительных средств и соответствующей терапии является динамика иммунологических показателей, целью работы явилось изучение влияния гетеротопической трансплантации хориальной ткани на иммунологические показатели у женщин с подострым сальпингоофоритом в процессе комплексного лечения.

Проведено клинико-иммунологическое обследование 51 больной с подострым сальпингоофоритом с длительностью заболевания от 4-х месяцев до 2-х лет и 30 здоровых женщин (контрольная группа).

Контрольную группу составили соматически здоровые женщины в возрасте 25,2 ± 0,9 лет, в анамнезе которых отсутствовали гинекологические заболевания и за 6 мес до обследования не наблюдалось каких-либо воспалительных процессов.

Женщин с подострым сальпингоофоритом разделили на 2 группы (основные), сопоставимые по возрасту (средний возраст больных 25,9 ± 0,7 лет), клиническим проявлениям и длительностью заболевания. С учетом клинического течения заболевания всем больным проводилась комплексная противовоспалительная терапия.

Первую группу составили пациентки (31 женщина), получавшие этиотропную антибактериальную терапию с учетом максимальной терапевтической разовой и суточной дозы с обязательным приемом нистатина или леворина в среднетерапевтических дозах. Проводились медикаментозная детоксикация; витаминотерапия B_1, E, C; вводились биостимуляторы ФиБС, плазмол, стекловидное тело; седативные, антигистаминные средства. Пациентки принимали физиотерапевтические процедуры.

Больным 2-й группы (20 женщин) в комплексе с традиционной терапией произведена трансплантация криоконсервированной хориальной ткани, ее образцы получены из Института проблем криобио-

(methyl uracil, T-activin), that is why a search for new immune modulators, particularly of the natural origin, is very important. Very promising in this respect seems a biopreparation of the cryopreserved chorionic tissue, collected from the human chorion of 8–10 weeks of gestation [6]. Chorionic tissue is polyfunctional in the endocrine and immunological respect, producing, mainly, reproductive immune modulators, cytokines, interleukins [9]. On the other hand, these substances are easily degraded during thermal and chemical exposures, i.e. they are found only in the living tissue. The effective program of cryopreservation makes it possible to maintain the chorion biopreparation in the viable state and suitable for transplantation [3]. Application of this biopreparation in the gynecological practice allows to considerably expand the spectrum of tissue preparations and the abilities of the antiinflammatory therapy.

Taking into account that one of the basic features of the efficiency of the antiinflammatory means and corresponding therapy is the dynamics of the immunological indices, the aim of the given research was to investigate the action of heterotropic transplantation of the chorionic tissue on the immunological characteristics in the women with subacute salpingo-oophoritis in the process of complex therapy.

Fifty-two female patients with the subacute salpingo-oophoritis, the duration of which ranged from 4 months to 2 years, and 30 healthy women (control group) underwent clinical-immunological examination.

The control group was made up of somatically healthy women aged 25.2 ± 0.9 years, the anamnesis of whom did not have any gynecological diseases, and no inflammatory processes were identified in them during the last 6 months prior to examination.

The she-patients with subacute salpingo-oophoritis were divided into 2 groups (basic), which were comparable in the age (average age of patients was 25.9 ± 0.7 years), clinical manifestations and duration of the disease. Taking into account clinical occurrence of the disease, all the patients experienced complex antiinflammatory therapy.

Group 1 was made up of the patients (31 females), who underwent the etiotropic antibacterial therapy with due regard to the maximum therapeutic single and daily doses with the obligatory taking of nystatin or levorin in the mean daily doses; medicamentous detoxication and vitamin B_1-, E-, C-therapy were conducted; biostimulators — FiBS, plasmol, vitreous body — and sedative, antihistamine means were injected. The patients experienced physiotherapeutic procedures.

The patients of group 2 (20 women) underwent transplantation of cryopreserved chorionic tissue together with routine therapy. The samples of the cryopreserved chorionic tissue were courteously granted by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Fetal tissues were used on the permission of

Матеріал, захищений авторським правом

логии и криомедицины НАН Украины. Фетальные ткани использовали на основании разрешения Министерства охраны здоровья Украины [6]. Образец (1×1 см) размораживали и производили трансплантацию в верхний наружный квадрант ягодицы в условиях операционной. Иммунологический контроль осуществляли до лечения и после его окончания.

В качестве показателей естественной неспецифической резистентности организма использовали определение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови методом завершенного фагоцитоза [5] в прямом визуальном тесте со стафилококком – штамм С52.

Т-систему лимфоцитов исследовали с помощью реакции спонтанного розеткообразования (Е-РОК) с эритроцитами барана [8], количество Т-супрессоров оценивали методом термостабильных розеток с эритроцитами барана [10], количество В-лимфоцитов – методом розеткообразования с эритроцитами мыши [8]. Уровень иммуноглобулинов (Ig) основных классов (G, A, M) определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием коммерческих моноспецифических сывороток против иммуноглобулинов человека. Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) измеряли спектрофотометрическим методом преципитации с полиэтиленгликолем молекулярной массой 6000 Д [2].

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию Стьюдента–Фишера.

Основными жалобами больных чаще всего были боли: в гипогастральной области (15) и в паховых областях с иррадиированием в область крестца (37). Наблюдались ухудшение общего состояния, нарушение менструальной, репродуктивной функций, патологические выделения.

После комплексного общепринятого лечения клиническое выздоровление отмечено у 16 женщин (51,62%), значительное улучшение состояния достигнуто у 11 (35,41%), улучшение – у 1-й женщины (3,1%). У 3-х пациенток (9,67 %) проведенное лечение положительного результата не дало.

При комплексном лечении с использованием трансплантации криоконсервированной хориальной ткани клиническое выздоровление наступило у 15 пациенток (75%), значительное улучшение состояния достигнуто у 4-х (20%), улучшение – у 1-й женщины (5%). В процессе лечения больных 1-й и 2-й групп побочных реакций не наблюдалось.

Результаты иммунологических исследований у женщин с подострым сальпингоофоритом приведены в таблице. Как видно из представленных данных, до лечения отмечаются достоверное (по отношению к контролю) снижение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов, повышенный уровень Т-супрессоров, снижение абсолютного содержания В-лимфоцитов. При этом относи-

the Ministry of Health Care of Ukraine. The sample (1×1 cm) was thawed and transplantation was done into the upper quadrant of the buttocks in the surgery room. The immunological control was exercised prior to the start of therapy and after its termination. Determination of the phagocytic activity of neutrophiles of the peripheral blood with the method of completed phagocytosis [5] within a direct visual test with the staphylococcus – strain C52 – was used as a feature of the natural nonspecific resistance of the organism.

The T-system of the lymphocytes was studied with a reaction of spontaneous rosette-formation (E-ROF) with the ram red cells [8], the amount of T-suppressors was evaluated with a method of thermally stable rosettes with the ram red cells [10], and the number of B-lymphocytes – with a method of rosette formation with the murine red cells [8]. The level of immunoglobulins (Ig) of the major classes (G, A, M) was assessed with a Mancini's method of radial immune diffusion using commercial nonspecific sera against human immunoglobulins. The number of the circulating immune complexes (CIC) was measured with a spectrophotometrical method of precipitation with polyethylene glycol with the molecular mass of 6000 D [2].

The results obtained were statistically processed with a Student–Fisher's method.

The patients mostly complained of the pains: hypogastral (15 patients) and inguinal areas with irradiation into the region of the sacrum (37 patients). There were observed aggravation of the general state, impairments of the menstrual, reproductive functions, pathological discharge.

Following complex routine therapy clinical recovery was reported in 16 women (51.62%), significant improvement was achieved in 11 females (35.41%), improvement – in 1 she-patient (3.1%). In three female patients (9.67%) the implemented therapy did not produce any positive result.

The applied complex therapy, accompanied by transplantation of cryopreserved chorionic tissue, resulted in clinical recovery of 15 she-patients (75%), significant improvement was achieved in 4 females (20%), improvement – in 1 woman (10%). No side effects and reactions were observed during treatment of the patients of groups 1 and 2.

The results of the immunological research are given in the Table. It follows from the data submitted that prior to treatment there is reported a significant (as compared with control) reduction in the relative and absolutre amounts of T-lymphocytes, an increased level of T-suppressors, a decrease in the absolute content of B-lymphocytes. And the relative amount of the latter remains at the level of control group.

Prior to treatment all the patients demonstrated a significantly high level of the CIC, an increased level of IgG and IgM, which did not exceed, however, the confidence interval of the normal values of these features.

Матеріал, захищений авторським правом

Иммунологические показатели у больных с подострым сальпингоофоритом

Immunological features in patients with subacute salpingo-oophoritis

Показатели иммунитета Features of immunity	Здоровые женщины Healthy women ($n = 30$)	Группа 1 Group 1 ($n = 31$)		Группа 2 Group 2 ($n = 20$)	
		до лечения Prior to treatment	после лечения After treatment	до лечения Prior to treatment	после лечения After treatment
Лимфоциты, % Lymphocytes, % $\times 10^9$/л $\times 10^9$/l	29,81 ± 0,74 1,34 ± 0,09	24,44 ± 1,46** 0,97 ± 0,08**	19,77 ± 1,62$^{***\bullet\bullet}$ 0,67 ± 0,06$^{***\bullet\bullet}$	24,56 ± 1,58*** 0,90 ± 0,08***	19,01 ± 1,37$^{***\bullet\bullet}$ 0,73 ± 0,06***
Т-лимфоциты, % T-lymphocytes, % $\times 10^9$/л $\times 10^9$/l	59,57 ± 1,14 1,00 ± 0,03	45,00 ± 3,42*** 0,45 ± 0,04***	42,34 ± 3,12*** 0,28 ± 0,04$^{***\bullet}$	44,76 ± 3,01*** 0,43 ± 0,03***	52,41 ± 2,01$^{**\bullet\bullet}$ 0,56 ± 0,04$^{***\bullet\bullet\bullet}$
Т-супрессоры, % T-suppressors, %	16,47 ± 0,05	24,54 ± 2,30***	23,30 ± 2,21***	23,91 ± 2,14***	21,54 ± 1,33***
В-лимфоциты, % B-lymphocytes, % $\times 10^9$/л $\times 10^9$/l	8,65 ± 0,31 0,17 ± 0,01	8,70 ± 0,60 0,09 ± 0,02***	9,52 ± 0,81 0,06 ± 0,02***	8,76 ± 0,83 0,09 ± 0,01***	5,22 ± 0,44$^{***\bullet\bullet\bullet\bullet}$ 0,08 ± 0,01***
ЦИК, усл. ед. CIC, cond. units	56,00 ± 4,89	136,85 ± 12,17***	146,51 ± 14,20***	135,91 ± 12,87***	86,02 ± 5,31$^{***\bullet\bullet\bullet\bullet}$
IgG, г/л IgG, g/l	10,40 ± 0,52	14,45 ± 0,77***	9,16 ± 0,48$^{\bullet\bullet}$	14,68 ± 1,33***	12,21 ± 1,11**
IgA, г/л IgA, g/l	3,22 ± 0,25	2,26 ± 0,16***	1,17 ± 0,11$^{***\bullet\bullet}$	2,30 ± 0,21**	1,97 ± 0,18$^{***\bullet\bullet}$
IgM, г/л IgM, g/l	1,32 ± 0,14	1,57 ± 0,09	1,44 ± 0,12	1,61 ± 0,11	1,11 ± 0,09*
Фагоцитирующие нейтрофилы, % Phagocyting neutrophiles, %	78,24 ± 2,30	90,16 ± 2,76	89,33 ± 2,42**	90,02 ± 2,54***	90,27 ± 2,56***
Фагоцитарное число, усл. ед. Phagocytic number, cond. units	3,11 ± 0,30	3,72 ± 0,34	3,30 ± 0,26	3,70 ± 0,33	2,7 ± 0,19*
Индекс завершенности фагоцитоза, усл. ед. Index of phagocytosis completeness, cond. units	1,19 ± 0,08	0,84 ± 0,03***	0,81 ± 0,06***	0,83 ± 0,03***	0,97 ± 0,02$^{*\bullet\bullet}$

Примечания: * — достоверность различия по отношению к норме (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$); • — достоверность различия по отношению показателей в группах до лечения (••• $P < 0,001$, •• $P < 0,01$, • $P < 0,05$); ♦ — достоверность различий между 1-й и 2-й группой после лечения (♦♦♦ $P < 0,001$, ♦♦ $P < 0,01$, ♦ $P < 0,05$).

Notes: * — the differences are significant as compared with the normal values (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$); • — the differences are significant with respect to the ratio of the indices in groups prior to treatment (••• $P < 0.001$, •• $P < 0.01$, • $P < 0.05$); ♦ — the differences are significant between groups 1 and 2 after treatment (♦♦♦ $P < 0.001$, ♦♦ $P < 0.01$, ♦ $P < 0.05$).

тельное количество последних остается на уровне показателей контрольной группы.

У всех больных до лечения наблюдали достоверно высокий уровень ЦИК, повышенный уровень IgG и IgM, не выходящий за доверительный интервал нормальных значений этих показателей.

Несмотря на сохранность поглотительной способности фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови, у больных на данный срок наблюдений имеет место достоверное снижение их переваривающей способности, что выражается в отсутствии завершенности фагоцитоза.

После комплексного лечения мы отмечали, что у больных 1-й группы не изменялись относительные и снижались абсолютные показатели количества Т-лимфоцитов ($P < 0,01$), а у больных 2-й группы повышалось относительное количество тимусзависимых лимфоцитов ($P < 0,05$). Необходимо отметить, что относительное ($P < 0,001$) и абсолютное количество ($P < 0,05$) Т-лимфоцитов у больных 1-й

In spite of the maintenance of the adsorbing ability of the phagocyting neutrophiles of the peripheral blood the patients experienced a significant reduction in their digestive ability at that period of observation, which is manifested in the absence of the phagocytosis completeness.

After complex therapy the relative indices of the amount of T-lymphocytes remained at the same level in the patients of group 1, while the absolute features were reduced ($P < 0.01$), and in the patients of group 2 a relative number of the thymus-dependent lymphocytes increased ($P < 0.05$). It should be noted that the relative ($P < 0.001$) and absolute ($P < 0.05$) amounts of T-lymphocytes in the patients of group 1 were lower after treatment as compared with the females of group 2.

The absolute amount of B-lymphocytes under the action of therapy in all the patients did not practically change, while in the she-patients of group 2 there occurred a reduction ($P < 0.001$) in the relative amount of this index.

Матеріал, захищений авторським правом

группы после лечения было меньше, чем у женщин 2-й группы.

Абсолютное количество В-лимфоцитов под влиянием терапии у всех больных практически не менялось, в то время как у женщин 2-й группы произошло снижение ($P < 0{,}001$) относительного количества данного показателя. Уровень ЦИК у больных 1-й группы не претерпевал существенных изменений и оставался высоким, а у женщин 2-й группы после лечения отмечалось достоверное его снижение ($P < 0{,}001$).

После лечения у больных 2-й группы мы наблюдали достоверную ($P < 0{,}001$) тенденцию к нормализации переваривающей способности нейтрофилов периферической крови по сравнению с исходными данными и отсутствие таковой у больных 1-й группы.

Полученные результаты по использованию в комплексном лечении женщин с подострыми сальпингоофоритами трансплантации криоконсервированной хориальной ткани свидетельствуют о том, что данный препарат, помимо выраженного клинического эффекта, оказывает иммуномодулирующее действие. Однако механизмы иммуномодулирующего действия криоконсервированной хориальной ткани требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Антонова Л. В., Брумштейн Л. М., Евсеев А. А.* Значение иммунокоррекции в терапии острых воспалительных заболеваний внутренних половых органов // Тез. докл. 1 Всерос. съезда акуш.-гинек. и педиатров.– Челябинск, 1992.– С. 83–84.
2. *Гриневич Ю. А., Алферов А. И.* Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело.– 1981.– № 8.– С. 493–495.
3. *Грищенко В. И., Чуйко В. А., Пушкарь Н. С.* Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев, 1993.– 241 с.
4. *Дубоссарская З. М., Миляновский А. И., Коляденко В. Г.* Хронические воспалительные процессы внутренних женских половых органов.– Киев: Здоров'я, 1991.– С. 115–118.
5. *Кудрявицкий А. И.* Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном тесте // Лаб. дело.– 1985.– № 1.– С. 45–47.
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. *Хамадьянова А. У.* Клинико-иммунологические особенности хронических неспецифических сальпингоофоритов в стадии обострения и комплексное их лечение с применением α-интерферона // Вестник Рос. ассоциации акуш.-гинекол.– 1999.– № 1.– С. 29–32.
8. *Череднев А. Н.* Количественная и функциональная оценка Т- и В-систем иммунитета // Общие вопросы патологии. Серия иммунология.– М., 1976.– Т. 4.– С. 132–135.
9. *Ширшев С. В.* Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи современной биологии.– 1993.– 113, Вып. 2.– С. 230–237.
10. *Olinescu A., Hristescu S., Roman S.* The human peripheral T-lymphocytes are endowed weith a heat stable E-receptor // Arch. Roum. Patol. Rap. and microbiol.– 1987.– 46, № 4.– P. 311–319.

Поступила 04.04.2000

The level of the CIC in the patients of group 1 did not undergo any significant changes and remained high, while in the females of group 2 there was reported a significant reduction in this feature ($P < 0.001$) after treatment.

The patients of group 2 after treatment demonstrated a clear ($P < 0.001$) tendency towards normalization of the digestive ability of the peripheral blood neutrophiles as compared with the original data, and the absence of such in the patients of group 1.

The data obtained on the application of transplantation of cryopreserved chorionic tissue in the therapy of females with subacute salpingo-oophoritis testify to the fact that the given preparation, beside a manifested clinical effect, exercises an immunomodulating action. However, the mechanisms of the immunemodulating influence of the cryopreserved chorionic tissue need further investigation.

REFERENCES

1. *Antonova L. V., Brumstein L. M., Yevseyev A. A.* Value of immune correction in the therapy of acute inflammatory diseases of the inner genital organs // Abstr. reports 1 All-Russian Congress of Obstetr.-Gynecologists and Pediatrists.– Chelyabinsk, 1992.– P. 83–84.
2. *Grinevich Yu. A., Alferov A. I.* Identification of immune complexes in blood of oncological patients // Lab. delo.– 1981.– № 8.– P. 493–495.
3. *Grischenko V. I., Chuiko V. A., Pushkar N. S.* Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.– Kiev, 1993.– 241 p.
4. *Dubossarskaya Z. M., Milyanovsky A. I., Kolyadenko V. G.* Chronic inflammatory processes in inner female genital organs.– Kiev: Zdorovya publ., 1991.– P. 115–118.
5. *Kudryavitsky A. I.* Evaluation of killer bactericidity of peripheral blood neutrophiles of healthy donors and sick people during a direct visual test // Lab. delo.– 1985.– № 1.– P. 45–47.
6. *Subbota N. P., Grischenko V. I., Pitko V. A. et al.* Collection, storage and usage of fragments, suspensions and cryoextract of chorion: Method. recommendations.– Kharkov, 1997.– 8 p.
7. *Khamadyanova A. U.* Clinical-immunological peculiarities of chronic nonspecific salpingo-oophoritis at the stage of the acute attack of the disease and its complex therapy using α-interferon // Vestnik Ros. Assotsiatsii Akush.-Ginekol.– 1999.– № 1.– P. 29–32.
8. *Cherednev A. N.* Quantitative and functional evaluation of T- and B-systems of the immunity // General problems of pathology. The Immunology series.– M., 1976.– Vol. 4.– P. 132–135.
9. *Shirshev S. V.* Proteins of fetoplacental complex in regulating immune responses // Uspekhi sovr.biologii.– 1993.– 113, Issue 2.– P. 230–237.
10. *Olinescu A., Hristescu S., Roman S.* The human peripheral T-lymphocytes are endowed with a heat stable E-receptor // Arch. Rom. Pathol. Rap. and Microbiol.– 1987.– 46, № 4.– P. 311–319.

Accepted in 04.04.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.21-08-7: 615.832.9

UDC 616.21-08-7: 615.832.9

Перспективы использования криогенной техники в ЛОР практике

А. С. ЖУРАВЛЕВ

Харьковский государственный медицинский университет

Б. Н. МУРИНЕЦ-МАРКЕВИЧ

Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина

Prospects of Applying Cryogenic Equipment iIn Otolaryngological Practice

A. S. ZHURAVLEV

Kharkov State Medical university

B. N. MURINETZ-MARKEVICH

B. I. Verkin Insitute for Low Temperature Physics and Engineering

Представлены новые конструкции криоаппаратов, которые не имеют недостатков их предшественников, описаны сферы использования в ЛОР практике.

Представлено нові конструкції кріоапаратів, які не мають недоліків їх попередників, описані сфери застосування в ЛОР практиці.

The report deals with the new design of cryoapparatus, which are void of the drawbacks, characteristics of their precursors, and the areas of their application in the otolaryngological practice.

Недостаточная эффективность многих современных терапевтических методов, сложность и в ряде случаев этапность хирургического лечения, часто вызывающих осложнения и нежелательные побочные явления, функциональные и косметические нарушения, стимулируют поиск новых методов санации патологических процессов в ЛОР органах. Примером этого является развитие лазерной, ультразвуковой, криогенной хирургии [1].

Основными достоинствами криохирургического метода лечения ЛОР патологии являются малоболезненность, которая объясняется блокированием нервных окончаний при сверхнизком охлаждении, бескровность, отсутствие рецидивов, хороший косметический и функциональный эффект, незначительная травматичность обрабатываемых тканей, достижение положительного клинического результата в более короткие сроки, чем при традиционном лечении, а также заметные экономические преимущества, так как не используются многие лекарственные вещества.

По сравнению с нейрохирургией, офтальмологией, дерматологией, гинекологией и другими областями медицины криогенный метод в оториноларингологии используется мало, что объясняется отсутствием адаптированной современной криоаппаратуры, анатомическими особенностями строения ЛОР органов, в которых располагаются периферические рецепторы трех анализаторов. Поэтому доступность их для охлаждающих наконечников

Insufficient efficiency of many current therapeutic methods, their complicated and sometimes staged nature of the surgical treatment, which not infrequently brings about complications and unfavorable side effects, functional and cosmetic impairments, stimulate a search for new methods of sanation of pathological processes in the otolaryngological organs. An example is the development of the laser, ultrasound and cryogenic surgery [1].

The major advantages of the cryosurgical method of treatment of the otolaryngological pathology is minor pain inflicted, which is due to the blocking of nervous endings during supralow cooling, bloodlessness, absence of relapses, good cosmetic and functional effects, minor traumatic injury of the tissues being treated, achievement of a positive clinical result in a much shorter time as compared with routine therapy, and profound economic advantages, since many drugs are simply not applied.

As compared with neurosurgery, ophthalmology, dermatology, gynecology and other fields of medicine, a cryogenic method is poorly applied in otolaryngology, which is due to the absence of the corresponding adapted equipment, anatomical features of the otolaryngological organs, in which peripheral receptors of three analyzers are located. That is why their availability to the cooling tips or directly to the cooling agent is a complicated technical and biological problem. At the first stages of introduction of the cold

Матеріал, захищений авторським правом

или непосредственно хладагента представляет сложную техническую и биологическую проблему. На первых этапах внедрения в практику холодового метода лечения для разрушения новообразований в труднодоступных местах (гортань при ее папилломатозе, задние отделы полости носа при полипозном риносинуите) применялись металлические стержни [2] диаметром до 3 мм, предварительно охлажденные в жидком азоте или кислороде. Их недостатками являются нестабильная температура охлаждения и в связи с малой массой стержней небольшие площади замораживаемой ткани, невозможность регулирования температуры. Более совершенным был криозонд, разработанный И. И. Шальниковым [3], в котором в качестве хладагента используется газообразная углекислота. Этот аппарат уже мог обеспечивать постоянную температуру охлаждающего наконечника. Однако в связи с недостаточно низкой температурой криозонда (–60 °С) он пригоден лишь для разрушения опухолей малых размеров.

В результате творческого сотрудничества Физико-технического института низких температур НАН Украины и ЛОР кафедры Харьковского государственного медицинского университета разработано несколько криохирургических инструментов, лишенных этих недостатков.

Аппликатор криогенный оториноларингологический КМ-22 [5] позволяет получить более низкие температуры в сравнении с известными аналогами при значительно меньшем диаметре охлаждающей части и не нуждается в шлангах для соединения с хранилищем криогенной жидкости или баллоном. Благодаря небольшому сосуду с жидким азотом им удобно манипулировать одной рукой. Продольный разрез аппликатора приведен на рис. 1. Подготовка аппликатора к работе заключается в заполнении сосуда 1 жидким азотом 2 и герметизации внутреннего объема от окружающей среды пробкой 3. Давление внутри сосуда в результате внешнего теплопритока повышается и поддерживается постоянным с помощью предохранительного клапана 4, встроенного внутрь герметизирующей пробки

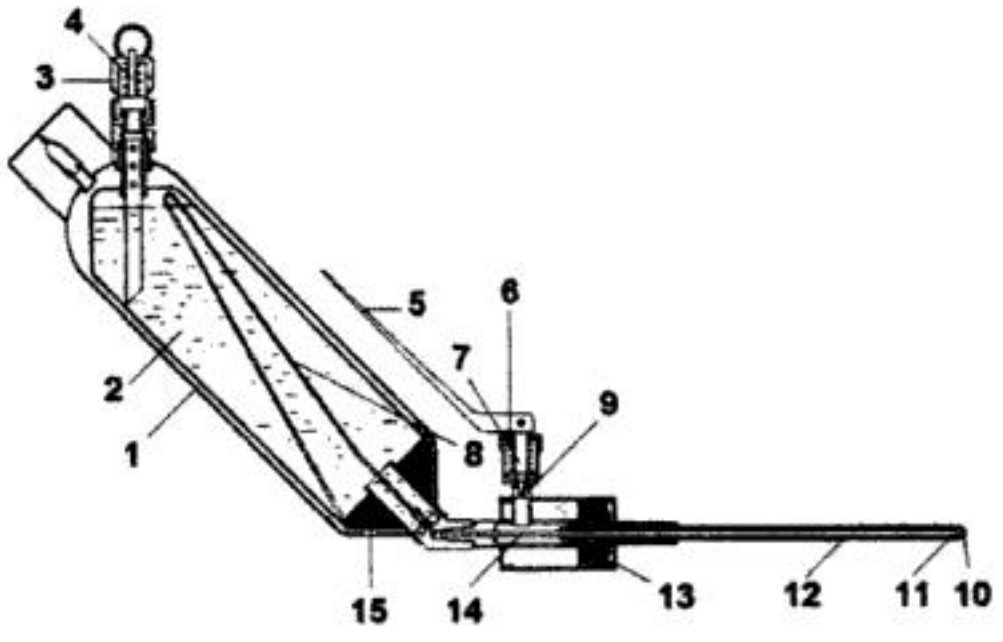


Рис. 1. Принципиальная схема аппликатора КМ-22.

Fig. 1. Key diagram of a KM-22 applicator.

method of treatment into clinical practice for destruction of neoplasms in the almost inaccessible areas (larynx during its papillomatosis, posterior departments of the nasal cavity during polypous rhinosinuitis) use was made of metal rods [2] with the diameter of up to 3 mm, pre-cooled in liquid nitrogen or oxygen. Among their drawbacks are the unstable temperature of cooling and, due to low weights of the rods, small areas of the tissue being frozen, and impossibility of temperature regulation. A cryoprobe, designed by I. I. Shalnikov [3], was better; gaseous carbonic acid was used as a cooling agent in it. This apparatus was capable of providing for constant temperature of the cooling tip. However, because of the insufficiently low temperature of the cryoprobe (–60 °C) it is applicable for destruction of small tumors only.

Creative co-operation of the Physical-Technical Institute of Low Temperatures of the National Academy of Sciences of Ukraine and Chair of Otolaryngology of the Kharkov State Medical university resulted in the development of several surgical instruments, void of these drawbacks.

A KM-22 cryogenic otolaryngological applicator [5] permits to obtain lower temperatures as compared with the known analogues, having a much smaller diameter of the cooling part; it does not require any hoses for connection with a reservoir with a cryogenic fluid. It can be manipulated single-handed, since it has a small cylinder with liquid nitrogen. A longitudinal section of the applicator is given in Fig. 1. Preparation of the applicator for subsequent use involves filling of cylinder 1 with liquid nitrogen 2 and sealing of the inner volume against environment with cork 3. The pressure inside the cylinder due to external heat flow increases and it is maintained constant with the help of protective valve 4, inserted into the sealing cork of the inlet tube. The operating tip is cooled by pressing lever 5, which, overcoming resistance of spring 6, opens up needle-shaped valve 7, and liquid nitrogen under the action of the excessive pressure is discharged into the atmosphere out of the cylinder 1 through syphon 8, inner cavity of tip 10 and heat exchanger 11, in which it takes away the heat off the tissue being cooled, through pipe 12 and sockets 9 and 14. The process of cooling may be terminated at any moment by returning lever 5 into the original position, and needle-shaped valve 7 closes the outflow of the cooling agent. Syphon 8 provides for the inclination of the instrument by 90° with respect to the horisontal position. To prevent hands of the operator from getting cold-bitten the cylinder is placed into coat 13. Static vacuum is maintained between the cylinder and the coat by means of the adsorbent, placed in cavities 9 and 15. The diameter of the operating tip is 2 mm and its length is 170 mm, which is the optimum combination of the dimensions as compared with home-made and foreign analogues. The operating temperature of the tip is –160 °C. The applicator is used for treatment of patients, suffering

Матеріал, захищений авторським правом

заливной горловины. Рабочий наконечник охлаждается нажатием на рычаг 5, который, преодолевая усилия пружины 6, открывает игольчатый клапан 7, и жидкий азот под избыточным давлением из сосуда 1 через сифонную трубку 8, внутреннюю полость наконечника 10 и теплообменника 11, в которых он отводит тепло от охлаждаемой ткани, через трубку 12 и патрубки 9 и 14 выводится в атмосферу. Процесс замораживания может быть прекращен в любой момент возвращением рычага 5 в начальное положение, при этом игольчатый клапан 7 прекращает выход хладагента. Сифонная трубка 8 обеспечивает возможность наклона инструмента на 90° относительно горизонтального положения наконечника. Для предохранения рук от обмораживания сосуд помещен в оболочку 13. Между сосудом и оболочкой поддерживается статический вакуум с помощью адсорбента, расположенного в полостях 9 и 15. Диаметр рабочего наконечника 2 мм при его длине 170 мм, что является наилучшим сочетанием размеров по сравнению с отечественными и зарубежными аналогами. Рабочая температура на наконечнике –160 °С. Аппликатор использован при лечении больных, страдающих сосудистыми и кожными новообразованиями наружного слухового прохода и барабанной полости, новообразованиями мягкого неба, сосудистыми новообразованиями полости носа, вазомоторным ринитом, полипозным риносинуитом. Хорошие непосредственные и отдаленные результаты получены при точечном криовоздействии на небные миндалины у больных хроническим тонзилитом. В результате клинических испытаний установлено, что аппликатор прост в эксплуатации, надежен, обеспечивает хороший обзор операционного поля в глубоко лежащих структурах. Однако к недостаткам этого и других автономных инструментов следует отнести сравнительно короткий период непрерывной работы из-за малой емкости для криоагента. Кроме того, при криообработке тканей возможен выброс жидкого азота из линии обратного потока, что значительно сокращает время непрерывной работы.

Более совершенным криозондом, который лишен вышеперечисленных недостатков, является криозонд КМ-22Б [5]. Он обеспечивает многократное использование криоагента, что существенно удлиняет период эффективной работы. Криозонд КМ-22Б (рис. 2) состоит из теплоизолированного сосуда 12 для криоагента, разделенного перегородкой 15 на полости 14 (основную) и 13 (дополнительную), с подводящим 18 и отводящим 17 каналами. На отводящем канале смонтирован клапан 16, перекрывающий отверстие 3 в перегородке 15. Подводящий и отводящий каналы соединены теплообменником 1, расположенном в наконечнике 2. В вакуумированном пространстве сосуда 12 размещен экран 4 с трубопроводом 5, соединяющим основную полость 14 с предохрани-

from vascular and cutaneous neoplasms of the external acoustic meatus and tympanic cavity, neoplasms of the soft palate, vascular neoplasms of the nasal cavity, vasomotor rhinitis, polypous rhinosinuitis. Good immediate and remote results were obtained during punctate cryoexposure of the faucial tonsils in the patients with chronic tonsillitis. Clinical trials demonstrated that the applicator is easy to operate, reliable, and provides for good observation of the surgery field in the deep structures. However, the drawback of this and other autonomous instruments involves relative short period of continuous operation, caused by low volume of the cryoagent. Besides, cryoexposure of the tissues may result in the discharge of liquid nitrogen out of the reverse flow line, thus considerably shortening the duration of continuous operation.

A KM-22B is a modified version of the cryoprobe, void of the above shortcomings [5]. It provides for a multiple usage of the cryoagent, thus significantly prolonging the duration of effective operation. A KM-22B cryoprobe (Fig. 2) consists of a thermally isolated vessel for cooling agent, separated by partition 15 into cavities 14 (basic) and 13 (additional), with supply channel 18 and discharge channel 17. The latter houses valve 16, shut-off aperture 3 in partition 15. The supply and discharge channels are connected with heat exchanger 1, positioned inside tip 2. The vacuum space of vessel 12 houses screen 4 with pipeline 5, connecting basic cavity 14 with protective valve 7. Basic cavity has filling valve 6. Rod 9 is fixed on the discharge channel, which has an external outlet through porous element 10 of the upper portion of vessel 12; there is also limb 11 for draining cryoagent into additional cavity. Lever 8 is installed in the upper portion of vessel 12, which opens up valve 16. Additional cavity is connected with the atmosphere through porous element 10. To return the cryoagent, collected in additional cavity by means of socket 11, into basic cavity, lever 8 should be pressed, which will shift rod 9, discharge valve 16, and cryoagent will be drained into cavity 14 through aperture 3 between partition 15 and valve 16. Following transfer of the cryoagent out of cavity 13 into cavity 14 lever 8 and valve 16 return into the original positions because of the elasticity of the portion of the discharge channel, manufactured in the form of the coil pipe. Clinical and experimental trials showed that a KM-22B cryoprobe

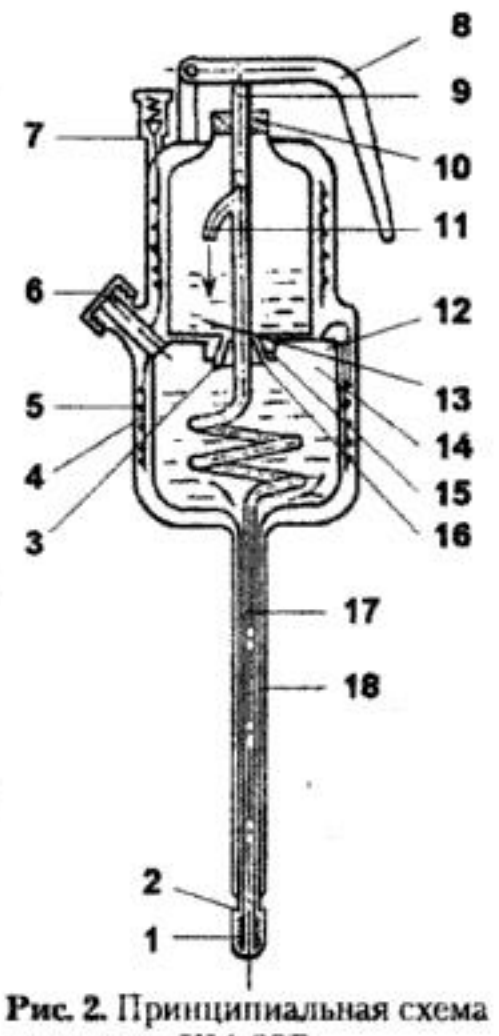


Рис. 2. Принципиальная схема криозонда КМ-22Б.

Fig. 2. Key diagram of a KM-22B cryoprobe.

Матеріал, захищений авторським правом

тельным клапаном 7. Основная полость имеет заправочный клапан 6. На отводящем канале укреплен шток 9, выведенный через пористый элемент 10 верхней части сосуда 12 наружу, а также имеется патрубок 11 для слива криоагента в дополнительную полость. В верхней части сосуда 12 смонтирован рычаг 8, обеспечивающий открытие клапана 16. Дополнительная полость сообщается с атмосферой через пористый элемент 10. Для возвращения в основную полость криоагента, собранного в дополнительной полости посредством патрубка 11, достаточно нажать на рычаг 8, который переместит шток 9, отводящий клапан 16, и криоагент через отверстие 3 между перегородкой 15 и клапаном 16 стечет в полость 14. После перехода криоагента из полости 13 в полость 14 рычаг 8 и клапан 16 возвращаются в исходное положение за счет упругости части отводящего канала, выполненного в виде змеевика. В результате клинических и экспериментальных наблюдений установлено, что криозонд КМ-22Б по сравнению с известными аналогами более прост, надежен и удобен в эксплуатации.

Для повышения коэффициента полезного действия криохирургических инструментов, используемых в ЛОР практике, нами предложен модернизированный аппликатор КМ-23 [6]. Он позволяет существенно повысить хладопроизводительность аппарата при одинаковом расходе хладагента и тем самым увеличить объем получаемого некроза биологической ткани. Аппликатор КМ-23 (рис. 3) содержит теплоизолированный корпус 5, концентрично ему установленный с зазором "а" резервуар 4 для жидкого хладагента, трубку 14 для подвода хладагента к наконечнику 15 с запорным клапаном 1, заливную трубку 6 с предохранительным клапаном 7 и трубку 10 для отвода паров хладагента. В зазоре "а", который является каналом отвода обратного потока хладагента, на выходе из него перед трубкой 10 установлен вверху резервуара 4 сепаратор 11, а в зазоре "а" вдоль резервуара 4 размещена спираль 12. Трубка 14 подвода хладагента к наконечнику 15 выполнена теплоизолированной и связана одним концом с полостью резервуара 4, например, через переходник 3, имеющий отверстия 2, другим концом с полостью наконечника 15 через запорный клапан 1, расположенный в ней и имеющий тягу 13 с наружным управлением в виде кнопки 8 с возвратной пружиной 9. Полость наконечника 15 связана с каналом отвода обратного потока хладагента — зазором "а" и далее — с трубкой 10 отвода паров хладагента через сепаратор 11. Подготовка аппликатора к работе заключается в следующей технологической последовательности. К нижней части теплоизолированного корпуса 5 присоединяется необходимого размера наконечник 15. Отсоединив предохранительный клапан 7 через заливную трубку 6 резервуара 4, заливают криогенную жидкость при закрытом клапане 1.

is easier to operate, more reliable and suitable in operation as compared with the known analogues.

To improve efficiency of cryosurgical instruments, applied in the otolaryngologic practice, the authors designed a KM-23 applicator [6]. It permits to considerably improve cold productivity of the apparatus, maintaining the same consumption of the cooling agent, thus increasing the volume of the obtained necrosis of the biological tissue. Key diagram of a KM-23 applicator is given in Fig. 3. It is made up of a thermally insulated body 5, concentrically mounted reservoir 4 for the cooling agent with a gap "a", pipe 14 for supplying the cooling agent to tip 15 with a shut-off valve 1, filling pipe 6 with a protective valve 7 and pipe 10 for discharge of the cooling agent vapors. In the gap "a", which serves as a channel for discharging reverse flow of the cooling agent, separator 11 is installed at the end of it in front of pipe 10 on the top of reservoir 4; spiral 12 is mounted in the gap "a" along reservoir 4. Pipe 14 for supplying the cooling agent to tip 15 is thermally insulated and connected with the cavity of reservoir 4, for example, via adapted 3, which has the apertures 2. The other end of pipe 14 is connected with the cavity of tip 15 via shut-off valve 1, which is installed inside it and which has draught 13 with remote control in the form of button 8 with recoil spring 9. The cavity of tip 15 is connected with the channel for discharge of the reverse flow of the cooling agent — gap "a" and further — with pipe 10 for discharge of the vapors of the cooling agent through separator 11. Preparation of the applicator for operation involves the following technological sequence. Lower portion of the thermally insulated body 5 is connected with tip 15 of the required size. After disconnecting protective valve 7, cryogenic fluid is filled through filling pipe 6 of reservoir 4, while valve 1 is closed. Then protective valve 7 is installed, which seals up the reservoir cavity against the environment. By pressing button 3 through draught 13 valve 1 opens up the inner channel of pipe 14, and the cooling agent out of it is supplied to the inner cavity of tip 15, thus cooling it. Liquid nitrogen is warmed and passes the gap "a" between thermally insulated body 5 and reservoir 4 with a cryogenic fluid, thus making it warmer due to intensive heat exchange at the site of location of spiral 12. This increases the excessive pressure inside the vessel and consumption of the cooling agent and rate of cooling of

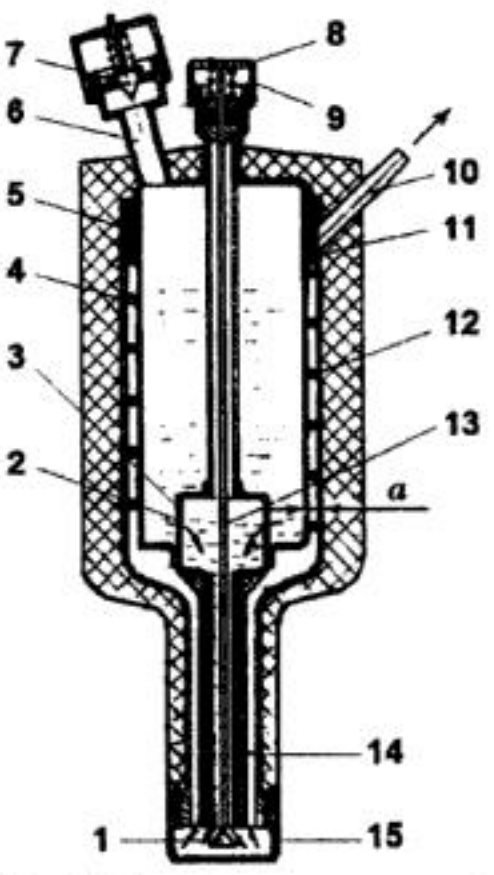


Рис. 3. Принципиальная схема аппликатора КМ-23.

Fig. 3. Key diagram of a KM-23 applicator.

Матеріал, захищений авторським правом

После этого устанавливают предохранительный клапан 7, который герметизирует полость резервуара от внешней среды. Нажатием вниз на кнопку 8 через тягу 13 клапан 1 открывает внутренний канал трубки 14 и находящийся в ней хладагент поступает во внутреннюю полость наконечника 15, охлаждая его. При этом жидкий азот, нагреваясь, выходит по зазору "а" между теплоизолированным корпусом 5 и резервуаром 4 с криогенной жидкостью, подогревая ее за счет интенсивного теплообмена на участке расположения спирали 12. Этим повышается избыточное давление внутри сосуда и увеличиваются расход хладагента и скорость охлаждения наконечника. По мере снижения температуры наконечника 15 количество газифицированного хладагента уменьшается, а количество жидкой фракции в обратном потоке в зазоре "а" увеличивается и его температура понижается, что автоматически приводит к снижению избыточного давления внутри резервуара 4 и к уменьшению расхода хладагента, так как в окружающую среду выбрасывается только газообразная фракция хладагента. При этом его жидкая фракция, заполняя зазор "а" до сепаратора, уменьшает теплоприток излучением к резервуару 4. Для прекращения охлаждения наконечника 15 и соответственно замораживания биологической ткани необходимо прекратить нажатие на кнопку 8 и возвратная пружина 9 через тягу 13 закроет клапаном 1 подачу хладагента в наконечник 15.

Описанные криогенные аппликаторы существенно ускоряют процесс охлаждения наконечника, а также увеличивают продолжительность криовоздействия при одинаковом расходе хладагента по сравнению с аналогичной аппаратурой [4]. Это значительно повышает эффективность использования предложенных криоаппликаторов в оториноларингологии и позволяет рекомендовать их для практического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Московченко Н. А., Муринец-Маркевич Б. Н., Журавлев А. С.* Криогенный ЛОР аппликатор // Мед. техника.– 1981.– № 5.– С. 58–59.
2. *Чиркшкин Д. Г., Тымчак И. В.* Криотерапия папилломатоза гортани у детей // Вестн. оториноларингологии.– 1969.– № 3.– С. 36–41.
3. *Шальников А. И., Чиркшкин Д. Г., Зюкин Н. А.* Инструменты для криохирургии в оториноларингологии // Мед. техника.– 1970.– № 2.– С. 53–55.
4. *Шахбаз М. Я.* Совершенствование автономных азотных криохирургических аппаратов: Автореф. дис. ... канд. техн. наук.– Одесса, 1990.– 10 с.
5. *А. с. 1127581.* МКИ[3] А 61В17/36. Криозонд / Б. Н. Муринец-Маркевич, Н. А. Московченко, А. С. Журавлев.– Опубл. 07.12.84. Бюл. № 45.– С. 13.
6. *А. с. 1803057.* МКИ[5] А 61В17/36. Устройство для криовоздействия на ткани / В. Ф. Филатов, А. С. Журавлев, Б. Н. Муринец-Маркевич.– Опубл. 23.03.93. Бюл. № 11.– С. 14.

Поступила 21.03.2000

the tip. As the temperature of tip 15 is lowered, the amount of the carburated gas is reduced, while the amount of the liquid fraction in the reverse flow in the gap "a" increases, while its temperature is lowered, thus automatically reducing the excessive pressure inside reservoir 4 and consumption of the cooling agent, since only gaseous fraction of the cooling agent is discharged into the environment. Its liquid fraction, while completely filling the gap "a" up to the separator, reduces heat inflow with emission to reservoir 4. To terminate cooling of tip 15 and, respectively, freezing of the biological tissue, it is required to stop pressing button 8, and recoil spring 9 through draught 13 will close the supply of the cooling agent to tip 15 by valve 1.

The described cryogenic applicators make it possible to considerably accelerate the process of cooling of the tip, and to prolong cryoexposure, maintaining the same consumption of the cooling agent as compared with the similar equipment [4]. This significantly improves the efficiency of applying the designed cryoapplicators in otolaryngology and permits to recommend them for practical application.

REFERENCES

1. *Moskovchenko N. A., Murinetz-Markevich B. N., Zhuravlev A. S.* Cryogenic otolaryngologic applicator // Med. tekhnika.– 1981.– № 5.– P. 58–59.
2. *Chireshkin D. G., Tymchask I. V.* Cryotherapy of papillomatosis of the larynx in children // Vestn. otolaryngology.– 1969.– № 3.– P. 36–41.
3. *Shalnikov A. I., Chireshkin D. G., Zyukin N. A.* Instruments for cryosurgery in otolaryngology // Med. tekhnika.– 1970.– № 2.– P. 53–55.
4. *Shakhbaz M. Ya.* Modification of the autonomous nitric cryosurgical apparatus: Abstr. Thesis Cand. Sci. Tech.– Odessa, 1990.– 10 p.
5. *Author's certificate* 1127581. MKI3 A61B 17/3b. Cryoprobe / B. N. Murinetz-Markevich, N. A. Moskovchenko, A. S. Zhuravlev.– Publ. on 07.12.84. Bull. № 45.– P. 13.
6. *Author's certificate* 1803057. MKI5 A61B17/3b. Device for cryoexposure of the tissue / V. F. Filatov, A. S. Zhuravlev, B. N. Murinetz-Markevich.– Publ. on 23.03.93. Bull. № 11.– P. 14.

Accepted in 21.03.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.111: 577.352.4

Температурная чувствительность транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде

В. В. РАМАЗАНОВ, Н. А. ЛУПИЛОВА, Т. П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

UDC 57.043: 612.111: 577.352.4

Temperature Sensitivity of Proton Transport in Erythrocytes in Sulphate Medium

V. V. RAMAZANOV, N. A. LUPILOVA, T. P. BONDARENKO

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

Комбинирование эритроцитов со средой, содержащей 120 ммоль/л Na_2SO_4, вызывает изменение *pH* суспензии клеток сначала в кислую область до *pH* 6,4, а затем в щелочную к исходному значению *pH* 7,0 (рис. 1). Снижение температуры инкубации в области 37–13 °С приводит к торможению фазы защелачивания и возрастанию степени закисления суспензии эритроцитов. При 13–14 °С отмечается полное ингибирование указанной фазы, при этом уровень закисления среды инкубации достигает значения *pH*, равного 5,2–5,5. Снижение температуры ниже 13 °С вызывает торможение фазы закисления, однако даже при 3 °С полного блокирования не выявляется (рис. 2). В эритроцитах, внесенных в сульфатную незабуференную среду, происходит два транспортных процесса: выход анионов хлора с протонами из клетки [4] и вход сульфата с протоном в обмен на внутриклеточный хлорид [3]. Различная чувствительность к температуре фазы закисления и фазы защелачивания указывает на существование двух транспортных механизмов. Транспорт анионов хлора из клетки по градиенту электрохимического потенциала может происходить канальным способом [1] без конформационных изменений белка полосы 3, тогда как обменный механизм включает переориентацию его гидрофобных фрагментов и транспортного сайта [2].

Таким образом, основываясь на различной температурной чувствительности транспорта протонов из клетки и в клетку, можно предположить, что выход хлорида в фазе закисления происходит канальным способом, тогда как в фазе защелачивания осуществляется обменный транспорт при обмене хлорида на внесенный протон и сульфат.

Combining of erythrocytes with the medium, containing 120 mM/l Na_2SO_4, causes the change in *pH* of cell suspension first of all into an acid region to *pH* 6.4 and then into alkaline one to 7.0 (Fig. 1). A reduction in incubation temperature within the range of 37–13 °C results in inhibition of alkalization phase and an increase in the degree of oxidation of erythrocyte suspension. At 13–15 °C practically complete inhibition of mentioned phase is noted, in this case the level of incubation medium oxidation reaches the pH value equal to 5.2–5.5. A decrease of temperature lower than 13 °C has already caused the inhibition of oxidation phase, but even at 3 °C no complete blocking is seen (Fig. 2). In erythrocytes, introduced into sulphate without buffer medium there are two transport processes: chlor anion release with protons out of a cell [4] and the entrance of sulphate with proton in exchange to intracellular chloride [3]. Different sensitivity to temperature of oxidation phase and one of alkalization points to existance of two transport mechanisms. Chlor anions transport out of a cell on a gradient of electrochemical potential can proceed by channel way [1] without conformational changes of protein of band 3, meanwhile the exchange mechanism comprises reorientation of its hydrophobic fragments and transport site [2].

Thus assuming various temperature sensitivity of proton transport out of a cell into a cell one can suppose, that chloride release in the phase of oxidation occurs by channel way, while in the phase of alkalization the exchange transport is accomplished when exchanging chloride to extracellular proton and sulphate.

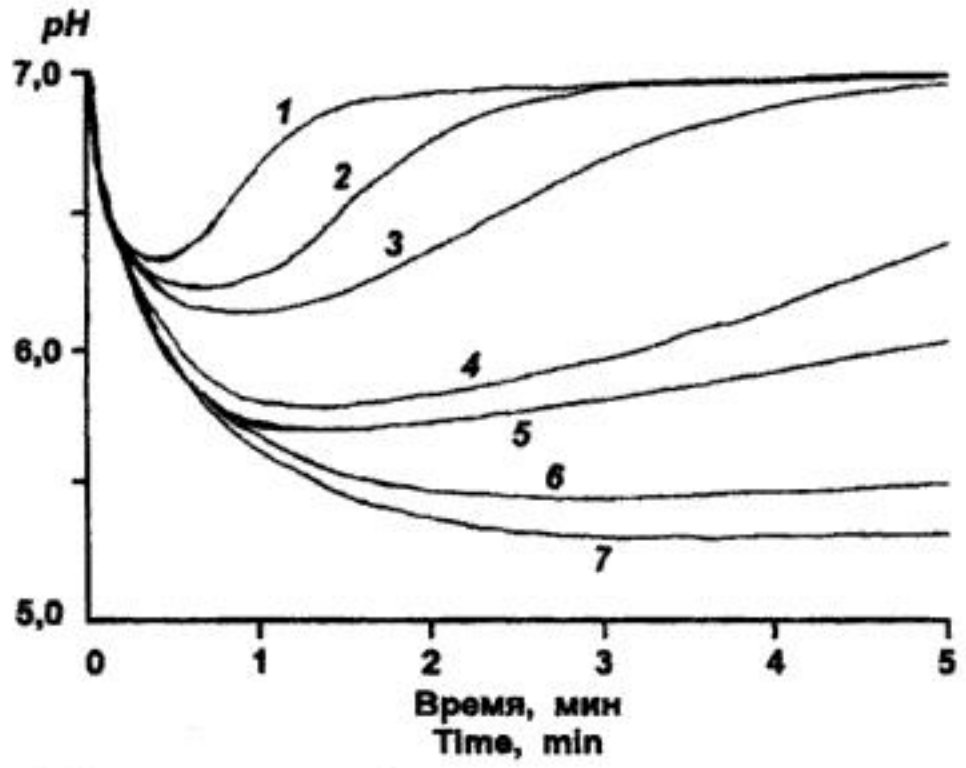


Рис. 1. Чувствительность фазы защелачивания к снижению температуры с 37 до 13 °С: *1* – 37 °С; *2* – 34 °С; *3* – 29 °С; *4* – 24 °С; *5* – 20 °С; *6* – 15 °С; *7* – 13 °С.

Fig. 1. Sensitivity of alkalization phase to reduction of temperature from 37 to 13 °C: *1* – 37 °C; *2* – 34 °C; *3* – 29 °C; *4* – 24 °C; *5* – 20 °C; *6* – 15 °C; *7* – 13 °C.

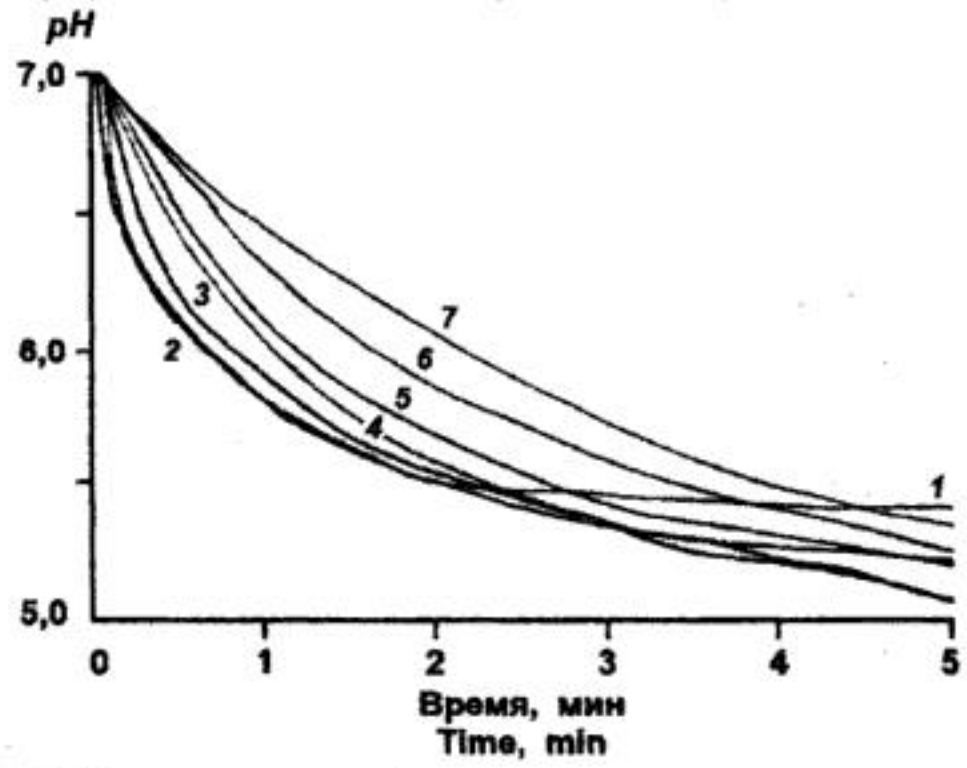


Рис. 2. Чувствительность фазы закисления к снижению температуры с 15 до 3 °С: *1* – 15 °С; *2* – 13 °С; *3* – 11 °С; *4* – 9 °С; *5* – 7 °С; *6* – 5 °С; *7* – 3 °С.

Fig. 2. Sensitivity of oxidation phase to reduction of temperature from 15 to 3 °C: *1* – 15 °C; *2* – 13 °C; *3* – 11 °C; *4* – 9 °C; *5* – 7 °C; *6* – 5 °C; *7* – 3 °C.

Матеріал, захищений авторським правом

ЛИТЕРАТУРА

1. *Frohlich O.* Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // J. Gen. physiol.– 1984.– 84.– P. 877–893.
2. *Jennings M. L.* Structure and function of the red blood cell anion transport protein // Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem.– 1989.– 18.– P. 397–420.
3. *Jennings M. L., Al-Rhaiyel S.* Modification of a carboxil group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // J. Gen. Physiol.– 1988.– 92.– P. 161–178.
4. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London–Paris–New York: Acad. press, 1982.– 369 p.

Поступило 23.03.99

REFERENCES

1. *Frohlich O.* Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // J. Gen. physiol.– 1984.– 84.– P. 877–893.
2. *Jennings M. L.* Structure and function of the red blood cell anion transport protein // Annual Rev. Biochem. Biophys. Chem.– 1989.– 18.– P. 397–420.
3. *Jennings M. L., Al-Rhaiyel S.* Modification of a carboxil group that appears to cross the permeability barrier in the red blood cell anion transporter // J. Gen. Physiol.– 1988.– 92.– P. 161–178.
4. *Red* cell membranes — a methodological approach / Ed. by J. C. Ellory, J. D. Young.– London–Paris–New York: Acad. press, 1982.– 369 p.

Accepted in 23.03.99

УДК 57.043: 57.084.1

UDC 57.043: 57.084.1

Особенности моделирования общего умеренного периодического охлаждения у крыс линии Вистар

И. Н. НИКИШКОВА, А. Е. КУТИКОВ

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Peculiarities of the Modelling of General Moderate Periodic Cooling in Wistar Line Rats

I. N. NIKISHKOVA, A. E. KUTIKOV

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Одним из распространенных факторов внешней среды, воздействие которого испытывает человек, являются умеренно низкие температуры. Поэтому важно выяснить влияние этого фактора на протекание различных процессов (в частности, обучения) и состояние (например, эмоциональный стресс) организма. С этой целью была разработана модель общего охлаждения, учитывающая особенности ответной реакции организма экспериментальных животных на гипотермическое воздействие.

Животные охлаждались путем экспонирования в холодильной установке (на базе бытового холодильника), снабженной системой поддержания заданной температуры, термометром для контроля температуры и вентиляционной системой. В установке животные размещались в индивидуальных решетчатых клетках размером 35×30×25 см для предотвращения развития у них иммобилизационного и социального стресса, а также устранения возможности группового согревания. Экспонирование проводилось при температуре 10 ± 1 °С по часу в течение 3-х дней в одно и то же время суток. В процессе эксперимента измерялась ректальная температура животных. Характеристики экспериментальной модели гипотермического воздействия были выбраны в соответствии с задачами исследования. Для создания реалистической модели использовали общее охлаждение, которое к тому же минимизирует развитие необратимых процессов в нейронах, возможное при других моделях гипотермии [3].

Температурный режим экспозиции (10 ± 1 °С) обеспечивал условия умеренного охлаждения организма, поскольку экспериментальное животное *Rattus rattus* является видом тропического происхождения с комфортной температурой около 28 °С [8]. Кроме того, именно при умеренном гипотермическом воздействии последовательность активации отделов ЦНС, ответственных за терморегуляторные функции (кора больших полушарий — передний гипоталамус — ретикулярная формация — задний гипоталамус — средний мозг), в наибольшей степени отвечает целям изучения поведенческих феноменов [3, 5].

Экспозиция в течение часа позволяет минимизировать эмоциональный стресс при воздействии и предупредить чрезмерное

One of the spreaded factors of environment, affecting a human-being, is moderately low temperatures. Therefore, it is necessary to reveal the effect of this factor on the course of different processes (especially, training) and organism states (for example, emotional stress). With this aim the model of general cooling, taking into consideration the peculiarities of organism response of experimental animals to hypothermic effect has been elaborated.

Animals were exposed to cooling in the device (at the base of refrigerator) with the system of temperature maintainance, thermometer for temperature control and ventilation system. In the device animals were kept in individual cages of 35×30×25 cm to prevent immobilizing and social stress, as well as to remove the possibility of group warming. Exposure was carried-out under the temperature of 10 ± 1 °C 1 hrs during 3 days at at the same time. During the experiments animals rectal temperature was evaluated.

Characteristics of hypothermal effect experimental model were chosen according to the aims of investigation. To create a real model a general cooling was used, minimizing development of irreversible processes in neurons, possible when using other hypothermia model [3].

Temperature regimen of exposure (10 ± 1 °C) provided conditions of organism moderate cooling, because Rattus experimental animal of tropic origin with comfort temperature above 28 °C [8].

Besides, exactly under moderate hypothermal effect the activation sequence of CNS compartments, responsible for thermoregulative functions (big hemisphere cortex — anterior hypothalamus — reticulatoric formation — posterior hypothalamus — midbrain), responds in the greatest extent to the purposes of behaviour phenomena investigation [3, 5].

The exposure within one hour permits to minimize an emotional stress during the effect and to prevent an excessive tension of an organism's thermoregulative system, and consequently its stocks exhausting.

According to the data [2], under real conditions a human being faces the most frequently a periodical interrupted cooling type. Under periodical hypothermal effect an increase in an organism's nonspecific resistance to the effect of some extremal environmental

Матеріал, захищений авторським правом

напряжение терморегуляторных систем организма, а следовательно, и истощение его ресурсов.

Согласно данным [2], человек в реальных условиях чаще всего сталкивается с периодическим прерывистым типом охлаждения. При периодическом гипотермическом воздействии наблюдается повышение неспецифической устойчивости организма к действию ряда экстремальных факторов внешней среды [6]; подобный режим способствует сохранению адаптационных резервов организма [7]. Периодически повторяющееся экспонирование при низких температурах облегчает последствия стресса на организм как за счет уменьшения эффектов катехоламинов в тканях, так и снижения активности гипофизарно-адреналовой системы [1].

В связи с задачами исследований необходимо было получить эффект после действия гипотермии, проявляющегося в перестройке функционального состояния организма. По данным [4], подобный эффект может быть достигнут уже после 3-кратного воздействия, поскольку при усиленной теплоотдаче реакция симпатоадреналовой системы на воздействие умеренно низких температур проявляется после первого дня в увеличении секреции катехоламинов, а после 3-кратного воздействия — в повышении их обмена.

Таким образом, вышеприведенные характеристики позволяют создать реалистичную модель гипотермического воздействия на общую реактивность организма животного.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Барабаш Н. А., Двуреченская Г. Я.* Адаптация к холоду // Физиология адаптационных процессов.– М.: Наука, 1986.– С. 283–293.
2. *Кривощеков С. Г., Роуч Р., Диверт Г. М. и др.* Физиологические механизмы дыхания и терморегуляции на раннем этапе адаптации к холоду // Физиология человека.– 1993.– 19, № 6.– С. 51–52.
3. *Майстрах В. Е.* Неспецифические сенсорные и эндокринные механизмы терморегуляции при остром охлаждении организма // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова.– 1979.– 65, № 11.– С. 1582–1591.
4. *Стабровский Е. М., Коровин К. Ф.* Катехоламины в тканях крыс и их обмен при охлаждении // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова.– 1972.– 58, № 3.– С. 414–420.
5. *Brunella N.* Effects of immobilization and cold exposure on the turnover rate of acethylcholine in rat brain areas // Neurosci.– 1981.– 30, № 4.– P. 307–311.
6. *Chaffee R. R., Roberts J. C.* Temperature acclimation in birds and mammals // Ann. Rev. Physiol.– 1971.– 33.– P. 155–202.
7. *Leblanc J., Labrie A.* Glycogen and nonspecific adaptation to cold // J. Appl. Physiol.– 1981.– 51, № 6.– P. 1428–1432.
8. *Scholander P. F., Walters V., Hock R. et al.* Insulation of some arctic and tropical mammals and birds // Biol. Bull.– 1950.– 99.– P. 225–229.

Поступило 27.04.2000

factors is observed [6], a similar regimen contributes to preserve the adaptational stocks of an organism [7]. A periodically repeated under low temperatures exposure relieves the tress consequences to an organism, both due to the reduction of catecholamine effects in tissues, and due to a decrease in activity of hypophysial and adrenal system [1].

According to the tasks of investigations it was necessary to obtain the effect of hypothermia consequence, manifesting in an organism's functional state rearrangement. In accordance with the data [4], a similar effect can be obtained already after threshhold effect, since during a strengthened convective heat exchange the reaction of symphato-adrenal system to the effect of moderate low temperatures manifests after the first day in an increase in catecholamine secretion, and after triple effect – in their exchange increase.

Thus, the mentioned above characteristics allow to create a real model of hypothermal effect on general reactivity of an animal's organism.

REFERENCES

1. *Barabash N. A., Dvurechenskaya G. Ya.* Adaptation to cold // Physiology of adaptational processes.– M.: Nauka, 1986.– P. 283–293.
2. *Krivoschekov S. G., Rouch R., Divert G. M. et al.* Physiological mechanisms of respiration and thermoregulation at the early stage of adaptation to cold // Human physiology.– 1993.– 19, № 6.– P. 51–52.
3. *Majstrakh V. E.* Non-specific sensor and endocrine mechanisms of thermoregulation during acute cooling of an organism // Physiological journal of USSR named by I. M. Sechenov.– 1979.– 65, № 11.– P. 1582–1591.
4. *Stabrovskiy E. M., Korovin K. F.* Catecholamines in rats' tissues and their exchange under cooling // Physiological journal of USSR named by I. M. Sechenov.– 1972.– 58, № 3.– P. 414–420.
5. *Brunella N.* Effects of immobilization and cold exposure on the turnover rate of acethylcholine in rat brain areas // Neurosci.– 1981.– 30, № 4.– P. 307–311.
6. *Chaffee R. R., Roberts J. C.* Temperature acclimation in birds and mammals // Ann. Rev. Physiol.– 1971.– 33.– P. 155–202.
7. *Leblanc J., Labrie A.* Glycogen and nonspecific adaptation to cold // J. Appl. Physiol.– 1981.– 51, № 6.– P. 1428–1432.
8. *Scholander P. F., Walters V., Hock R. et al.* Insulation of some arctic and tropical mammals and birds // Biol. Bull.– 1950.– 99.– P. 225–229.

Accepted in 27.04.2000

Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.3: 611.018.51

UDC 577.3: 611.018.51

Влияние ионной силы на распределение флуоресцеина между эритроцитами и средой инкубации

О. А. ОЛЕЙНИК

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

В. А. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

The Effect of Ionic Strength on Fluorescein Distribution Between Erythrocytes and Incubation Medium

O. A. OLEJNIK

Kharkov National University named by V. N. Karazin

V. A. BONDARENKO

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

Исследование транспорта с помощью флуоресцирующих субстратов может иметь определенное преимущество для выявления механизма проникновения веществ через мембрану. Использование анионного субстрата НБД-таурина (N-(2-аминоэтилсульфонат)-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол), который транспортируется в эритроциты через анионный канал, позволило выявить не только общие, но и дополнительные особенности указанной транспортной системы [3]. Одним из флуоресцирующих субстратов является флуоресцеин, который обладает высоким квантовым выходом, что позволяет использовать его в микромолярных концентрациях. Цель исследования – изучение возможности транспорта данного субстрата в эритроциты.

В работе использовали эритроциты, полученные из донорской крови II группы. Применяли изоосмотические среды, содержащие различные концентрации NaCl и сахарозы (150 мМ NaCl, 100 мМ NaCl + 100 мМ сахарозы, 50 мМ NaCl + 200 мМ сахарозы, 25 мМ NaCl + 250 мМ сахарозы, 10 мМ NaCl + 280 мМ сахарозы, 5 мМ NaCl + 290 мМ сахарозы, 2 мМ NaCl + 296 мМ сахарозы). Калибровочную кривую интенсивности флуоресценции флуоресцеина от его концентрации строили в интервале концентраций 0–0,27 мкМ. В данном интервале зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации является линейной. Эритроциты инкубировали 10 мин в указанных средах с флуоресцеином (20 мкМ) при температуре 37 °С. Осадок эритроцитов, нагруженных флуоресцеином, лизировали дистиллированной водой на льду 5 мин, гемоглобин осаждали на льду 5 мин трихлоруксусной кислотой в конечной концентрации 3,3%, центрифугировали, *pH* надосадочной жидкости доводили до 12 и измеряли интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре HITACHI MPF-2A.

Исследование распределения флуоресцеина между эритроцитами человека и средой инкубации показало, что снижение концентрации NaCl от 0,15 до 0,002 М вызывает значительное увеличение включения флуоресцеина в эритроциты (рис. 1, кривая *1*).

Присутствие 50 мкМ ингибитора анионного транспорта, диизотиоцианостильбендисульфоната (ДИДС), приводит к снижению включения указанного вещества в клетки (рис. 1, кривая *2*). Степень снижения включения возрастает при уменьшении ионной силы, тогда как в изотонической среде (0,15 М NaCl) этот ингибитор не вызывает изменения в уровне распределения данного субстрата (рис. 1).

Согласно [4] снижение ионной силы среды инкубации приводит к перераспределению хлоридных анионов из эритроцитов во внеклеточную среду. При этом происходят изменение внутриклеточного *pH* и перемена знака мембранного потенциала с отрицательного на положительный. Например, снижение концентрации NaCl до 2 мМ приводит к значительному возрастанию мембранного потенциала (около +100 мВ [4]). Данное состояние клетки может поддерживаться до 15 мин вследствие того, что проницаемость эритроцитарной мембраны для катио-

The study of the transport using fluorescent substrates can possess a certain advantage for revealing the mechanism of penetration of substances through membrane. Usage of anion substrate NBD-taurine (N-(2-amine ethyl sulphonate)-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), that is transported into erythrocytes through anion channel, allowed to find not only general but additional peculiarities of mentioned transport system [3]. One of fluorescent substrates is fluorescein which has a high photon yield, that allows to use it in micromolar concentrations. The aim of present paper is to investigate the possibility of given substrate transport into erythrocytes.

Erythrocytes obtained from donor's blood of the second group was used for the experiments. Isoosmotic media, containing various NaCl concentrations and sucrose were applied (150 mM NaCl, 100 mM NaCl + 100 mM sucrose, 50 mM NaCl + 200 mM sucrose, 25 mM NaCl + 250 mM sucrose, 10 mM NaCl + 280 mM sucrose, 5 mM NaCl + 290 mM sucrose, 2 mM NaCl + 296 mM sucrose). Calibrated curve of intensity of fluorescein fluorescence on its concentration was built within the interval of concentrations from 0 to 0.27 μM. In this interval the dependence of fluorescence intensity on the concentration is linear one. Erythrocytes were incubated during 10 min in the mentioned mediawith fluorescein (20 μM) at 37 °C. Sediment of fluorescein-loaded erythrocytes was lysed by distilled water on ice during 5 min, hemoglobin was precipitated on ice within 5 min by trifluoracetic acid in a final concentration of 3.3%, centrifuged, *pH* of supernatant liquid was added to 12 and the intensity of fluorescence was measured by means of HITACHI MPF-2A spectrofluorimeter.

Investigation of fluorescein distribution between human erythrocytes and incubation medium has shown that reduction in NaCl concentration from 0.15 down to 0.002 causes a significant increase of fluorescein inclusion into erythrocytes (Fig. 1, curve *1*).

The presence of 50 μM of inhibitor of anion transport, diisothiocyanostilbene disulfonate (DIDS), results into a reduction of inclusion of the mentioned substance into cells (Fig. 1, curve *2*). The degree of decrease in the inclusion enhances with a reduction in ionic strength, meanwhile in isotonic medium (0.15 M NaCl) this inhibitir does not cause the changes at the level of distribution of given substrate (Fig. 1).

According to the data [4] the reduction of ionic strengthof incubation medium results in redistribution of chloride anions from erythrocytes into extracellular medium. In this case there are changes in intracellular pH and switching of the sign of membrane potential from negative to positive one. For instance, the decrease in NaCl concentration down to 2 mM causes considerable increase in membrane potential (about +100 mV [4]). This cell state can maintain up to 15 min being the result of the fact that permeability of erythrocyte membrane for cations of calcium and sodium by several orders lower than permeability for chloride [2].

Матеріал, захищений авторським правом

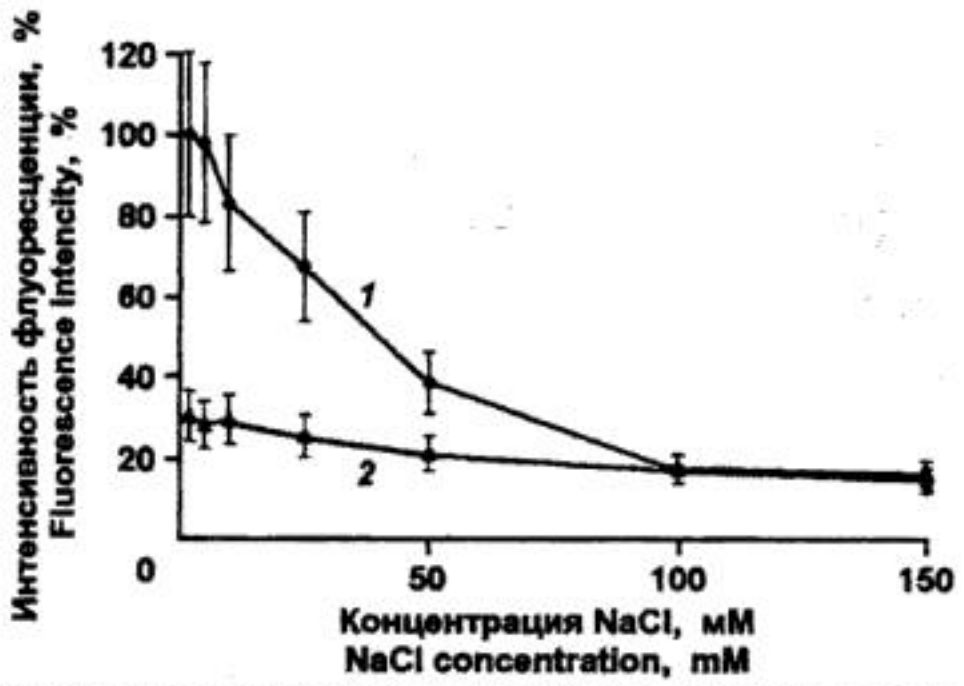


Рис. 1. Влияние ионной силы и ДИДС на включение флуоресцеина в эритроциты: *1* – контроль; *2* – ДИДС (50 мкМ).

Fig. 1. Effect of ionic strength and DIDS on fluorescein inclusion into erythrocytes: *1* – control; *2* – DIDS (50 μM).

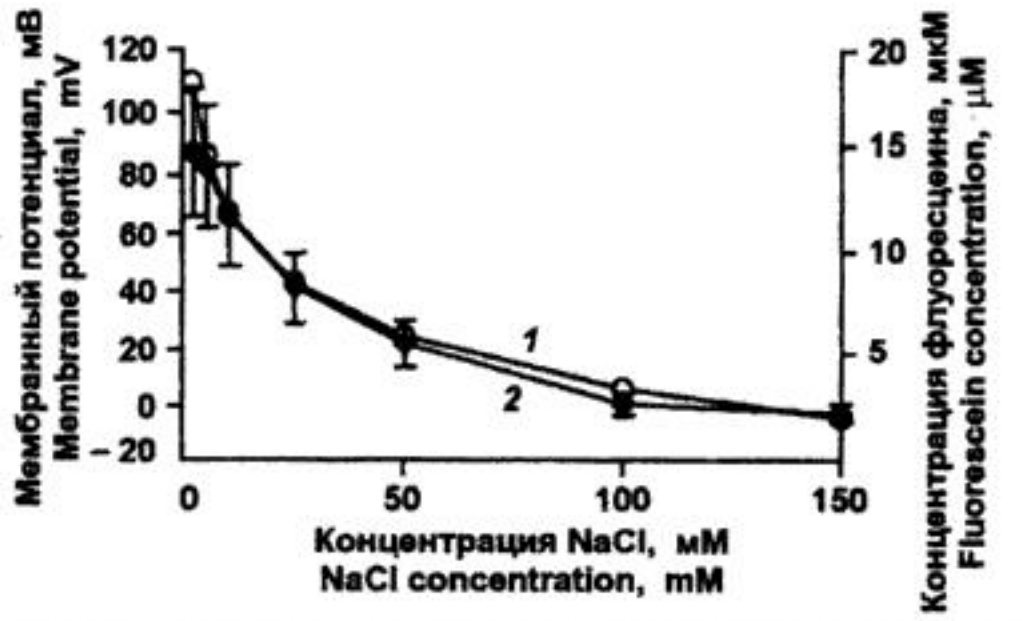


Рис. 2. Корреляция между включением флуоресцеина в эритроциты и мембранным потенциалом зависимости от ионной силы: *1* – мембранный потенциал; *2* – включение флуоресцеина.

Fig. 2. Correlation between fluorescein inclusion into erythrocytes and membrane potential dependence on ionic strength: *1* – membrane potential; *2* – fluorescein inclusion.

нов калия и натрия на несколько порядков ниже, чем проницаемость для хлорида [2].

ДИДС является специфическим ингибитором анионного транспорта, который тормозит выход анионов из клетки [2] и при этом должен блокировать значительную деполяризацию мембраны.

На рис. 2 кривая *1* представляет собой зависимость мембранного потенциала от ионной силы. Зависимость взята из [4]. Сопоставляя кривую *1* с кривой *2*, можно отметить, что возрастание включения флуоресцеина в эритроциты связано с ростом мембранного потенциала.

Таким образом, полученные результаты показывают, что включение флуоресцеина в эритроциты не блокируется ингибитором анионного транспорта ДИДС в 0,15 М NaCl несмотря на то, что молекула флуоресцеина в данных экспериментальных условиях (*pH* среды 7,4) находится в анионной форме: $pK_1 = 2{,}14$, $pK_2 = 4{,}45$, $pK_3 = 6{,}8$ [1]. Можно заключить, что включение флуоресцеина в эритроциты не опосредуется анионным каналом. Снижение ионной силы среды инкубации, вследствие которого происходит деполяризация мембраны, вызывает увеличение уровня включения флуоресцеина. При этом присутствие ингибитора анионного транспорта ДИДС, который снижает деполяризацию, приводит к снижению включения данного субстрата в клетки. Принимая во внимание, что флуоресцеин не проникает через анионный канал, такое уменьшение включения указанного субстрата в эритроцитах связано с блокированием выхода хлорида и соответственно с торможением деполяризации.

Результаты работы позволяют предположить: уровень включения флуоресцеина в эритроциты определяется мембранным потенциалом, т.е. данный субстрат транспортируется внутрь клетки. Прослеживаемая связь между параметрами транспорта, мембранным потенциалом и ионной силой среды показывает, что работа ионных транспортеров в клетке при изменении соотношения компонентов изоосмотических сред является фактором, обеспечивающим адаптацию клеток только для ограниченного числа субстратов. В некоторых случаях адаптация может осуществляться по иным механизмам, включающим перенос через специфические сайты мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Мчедлов-Петросян Н. О.* Химическое равновесие многофункциональных соединений ксантенового и трифенилметанового рядов в неводных средах: Дис. д-ра хим. наук.– Харьков, 1992.– С. 29–42, 112–117.
2. *Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Ronstein A.* The anion transport system of the red blood cells // Biochim. Biophys. Acta.– 1978.– 515.– P. 239–302.
3. *Darmon A., Zangvill M., Cabantchick Z. I.* New approaches for the reconstitution and functional assay of membrane transport proteins. Application to the anion transporter of human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– 727.– P. 77–88.
4. *Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al.* Stationary ionic states of human red blood cells - consequence for planing and evaluation of experiments // Stud. Biophys.– 1980.– 81, № 1.– P. 43–47.

Поступило 20.04.2000

DIDS is specific inhibitor of anionic transport, inhibiting the release of anions from a cell [2] and in this case it must block a significant depolarization of membrane.

In Fig. 2. the curve *1* presents the dependence of membrane potential on ionic strength. The dependence was described in [4]. Comparing the curve *1* and curve *2* one can note that an increase in fluorescein inclusion into erythrocytes is related to the growth in membrane potential.

Thus the obtained results show that fluorescein inclusion into erythrocytes is not blocked by the inhibitor of anion transport DIDS in 0.15 M NaCl, nevertheless that fluorescein molecule under given experimental conditions (medium *pH* is 7.4) is in anion form: $pK_1 = 2.14$, $pK_2 = 4.45$, $pK_3 = 6.8$ [1]. One can conclude that fluorescein inclusion into erythrocytes is not mediated by anion channel. Reduction of ionic strength of incubation medium, resulted in membrane depolarization, causes an increase in fluorescein inclusion level. In this case the presence of inhibitor of anionic transport DIDS, reducing depolarization, results in a decrease of given substrate inclusion into cells. Taking into consideration that fluorescein does not penetrate through anion channel, such reduction in the inclusion of mentioned substrate in erythrocytes is connected to the blocking of chloride release and correspondingly with depolarization inhibiting.

The work results allow to suppose that the level of fluorescein inclusion into erythrocytes is determined by membrane potential, i.e. substrate is transported inside a cell. One can trace a direct relation between transport parameters, membrane potential and medium ionic strength and this shows that the work of ionic transporters in a cell when changing the ratio of components of isoosmotic media is the factor, providing cell adaptation not only for limited number of substrates. In some cases this adaptation can be accomplished by means of another mechanisms, including the transfer via specific membrane sites.

REFERENCES

1. *Mchedlov-Petrosyan N. O.* Chemical balance of multifunctional compounds of xanten and triphenyl metane series in non-aqueous media: Thesis for obtaining doctor degree of chemical sciences.– Kharkov, 1992.– P. 29–42, 112–117.
2. *Cabantchik Z. I., Knauf P. A., Ronstein A.* The anion transport system of the red blood cells // Biochim. Biophys. Acta.– 1978.– 515.– P. 239–302.
3. *Darmon A., Zangvill M., Cabantchick Z. I.* New approaches for the reconstitution and functional assay of membrane transport proteins. Application to the anion transporter of human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1983.– 727.– P. 77–88.
4. *Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al.* Stationary ionic states of human red blood cells - consequence for planing and evaluation of experiments // Stud. Biophys.– 1980.– 81, № 1.– P. 43–47.

Accepted in 20.04.2000

Матеріал, захищений авторським правом

Ежегодная конференция молодых ученых "Холод в биологии и медицине" при участии кафедры ЮНЕСКО по криобиологии

Annual Conference of Young Scientists "Cold in Biology and Medicine" Jointly with the Meeting of the UNESCO Chair on Cryobiology

17–18 мая 2000 г. в Харькове (Украина) на базе Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины состоялась ежегодная конференция молодых ученых "Холод в биологии и медицине" совместно с очередным заседанием кафедры ЮНЕСКО по криобиологии, действующей на протяжении двух лет в ИПКиК НАН Украины.

В работе конференции приняли участие более 80 специалистов различных областей криобиологии и криомедицины, в том числе проф., д-р К. Грин, проф., д-р Б. Фуллер (Великобритания), академик НАН Украины В. И. Грищенко, д-р биол. наук Е. А. Гордиенко, д-р мед. наук Т. Н. Юрченко, д-р мед. наук А. А. Цуцаева, д-р биол. наук А. Ю. Петренко, д-р биол. наук Т. П. Бондаренко, д-р биол. наук В. А. Бондаренко (Украина). Рабочий язык конференции — английский.

В ходе конференции были заслушаны научные сообщения, представленные молодыми учеными научно-исследовательских и учебных заведений Харькова, охватывающие различные научные направления криобиологии и криомедицины. Многие участники конференции являются сотрудниками международной кафедры ЮНЕСКО по криобиологии.

При обсуждении результатов конференции отмечены мировой уровень исследований, проводимых в Харькове, свободное владение английским языком молодыми специалистами, намечены основные научные приоритеты в области фундаментальных и прикладных исследований по криобиологии и криомедицине.

Принято решение о целесообразности издания руководства по специальности "Криобиология и криомедицина".

May 17–18th, 2000 in Kharkov (Ukraine) at the base of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, the annual conference of young scientists "Cold in Cryobiology and Medicine" jointly with the meeting of the UNESCO Chair on Cryobiology, functioning within 2 years at the Institute, took place.

Foreign members of the Chair: Prof. Dr. C. Green, Prof. Dr. B. Fuller (UK), Academician V. I. Grischenko, Dr. Sc. (Biol.) E. A. Gordienko, Dr. Sc. (Med.) T. N. Yurchenko, Dr. Sc. (Med.) A. A. Tsutsaeva, Dr. Sc. (Biol.) A. Yu. Petrenko, Dr. Sc. (Biol.) T. P. Bondarenko, Dr. Sc. (Biol.) V. A. Bondarenko (Ukraine) as well as more then 80 experts of different fields of cryobiology and cryomedicine, young scientists participated in the work of the Conference. Working language of the Conference — English.

During the Conference scientific reports of young scientists of R&D Kharkov establishments, including-different scientific directions of cryobiology and cryomedicine, were presented. The majority of the participants were the members of International UNESCO Chair on cryobiology.

During the discussion of the Conference results a high level of investigations, conducted in Kharkov, was noted, as well as fluent English of reporters , the main scientific priorities in fundamental and applied investigations on cryobiology and cryomedicne were defined.

Besides the decision about the expediency of the publication of the manual on cryobiology and cryomedicine was discussed.

Матеріал, захищений авторським правом

К сведению авторов журнала "Проблемы криобиологии"

Статья представляется в 2 экз. с сопроводительным письмом и экспертным заключением (для авторов из Украины). Объем оригинальной статьи — не более 10, обзорной — 12 с. машинописного текста, включая список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к рисункам. Объем краткого сообщения — 3 с. Оба экземпляра подписывают авторы с указанием учреждения, фамилии, имени и отчества, домашнего и служебного адресов, номеров телефонов и даты.

Статья печатается на машинке черной лентой через 2 интервала на белой бумаге форматом 210×297 мм. Левое поле страницы — не менее 3, правое — 1, верхнее и нижнее — по 2 см. Абзацный отступ равен 5 знакам. В левом верхнем углу проставляется УДК, затем название статьи, инициалы и фамилия автора (авторов), название учреждения.

Для ускорения редакционной обработки и выхода в свет авторы могут присылать статьи, кроме напечатанного на бумаге варианта, также в виде файлов на дискетах. **Текст статьи** необходимо набирать с помощью программ редактирования текста, поддерживающих альтернативную кодировку: ЛЕКСИКОН, MultiEdit, Microsoft Word (версии 1, 2, 6), и не использовать программы типа ChiWriter.

В тексте обязательна расшифровка аббревиатур-терминов; ссылки на номера статей по списку литературы даются в квадратных скобках.

Таблицы печатают на отдельных страницах, помещают в рукописи вслед за страницей, содержащей первую ссылку на эту таблицу. Слово "Таблица" с указанием ее порядкового номера печатается в одну строку с ее названием. Примечания к таблице даются непосредственно под ней. Листы с таблицами включают в общую нумерацию страниц рукописи.

Формулы и буквенные обозначения должны быть выполнены четко, крупно; индексы и показатели степени печатаются или вписываются ниже или выше строки и размечаются дужками: верхние индексы и показатели степени — ∪, нижние — ∩. Штрихи должны отличаться от единицы, *a* от α, *l* от *e* и *i*, *h* от *n*, *I* прописное от *J*. В формулах и обозначениях следует разметить сходные по написанию прописные и строчные буквы, подчеркнув прописную букву двумя черточками снизу, а строчную — двумя черточками сверху. Курсивные буквы подчеркиваются волнистой линией, прямые буквы, а также нуль, sin, cos, exp и т.д. размечаются на прямое начертание квадратной скобкой снизу. Греческие буквы подчеркиваются или обводятся красным карандашом, готические — синим. Нестандартные знаки (математические, физические, химические) выписываются на поле (один раз с указанием их значения). Нумерация формул должна быть сквозной в пределах статьи (арабскими цифрами в круглых скобках).

Рисунки в количестве не более 5 выполняются черной тушью на кальке, чертежной бумаге или в виде фотографий. Компоновка рисунков должна учитывать их размещение в пределах одной или двух колонок текста: ширина рисунка, предназначенного для одной колонки, не должна превышать 8 см, а общая высота рисунков, объединенных одной подрисуночной подписью (рис. 1, *а, б, в*). — 18 см. Соответственно максимальные размеры рисунка, предназначенного для размещения в двух колонках, составляют 16×18 см. Не перегружайте рисунки второстепенными деталями, наносите только необходимые условные обозначения, расшифровка которых дается в подписи к рисунку или в тексте. На обороте рисунка указываются его порядковый номер, фамилия автора, название статьи и журнала. Для сканирования без угловых искажений оси графиков на рисунках должны быть параллельны краю листа. Представленные фотоснимки должны быть четкими, контрастными, с указанием верхнего края.

При подготовке иллюстраций на компьютере используйте лазерный принтер, желательно представить в редакцию графические файлы рисунков. Допустимо применение расширений PCX, TIF, GEM, MAC, HPG, CGM, PIC; предпочтительнее использовать PCX и TIF, так как рисунки обрабатываются в графическом редакторе PhotoFinish.

Список литературы составляется в алфавитном порядке. В списке необходимо привести следующие сведения: фамилия и инициалы автора в оригинальной транскрипции, название статьи, журнала или книги и далее: для периодических изданий — год издания, том, номер, номера страниц; для монографий — место издания, название издательства, год издания, общее количество страниц. Названия периодических изданий на иностранных языках сокращаются в соответствии с правилами, принятыми в изданиях ВИНИТИ.

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

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

Редакция отсылает автору одну корректуру. Допустимы лишь те исправления, которые приводят верстку в соответствие с исходным текстом статьи. Внесение существенных изменений затрудняет работу издательства и приводит к задержке публикации статьи. Корректуру с указанием даты и подписью автора(ов) следует выслать в редакцию в течение суток с момента получения.

Материалы направлять по адресу: 61015, Харьков-15, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, редакция журнала "Проблемы криобиологии".

Матеріал, захищений авторським правом

PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

SUBSCRIPTION RENEWAL FOR 2000

You are invited to renew/start subsription for 2000. Please return your renewal instructions as soon as possible to

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grischenko Institute for Problems of Cryobioilogy and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
23, Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax. (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

For individual subscribers:

Please renew/start a new subscription for 2000 at the individual rate of U.S.$ 40.00 (postage included)

I am enclosing a cheque for $40.00 and cerify that subscription is for my personal use only.
Signature _____

Date _____
A remittance must accompany all orders for individual subscriptions

For institutional subscribers:

Please renew/start a new subscription for 2000 at the individual rate of U.S.$ 150.00 (postage included)

We enclose our cheque for $150.00

Cheques should be made out to INSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOILOGY AND CRYOMEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE and addressed to

a/c 4070104/001, EXIMBANK UKRAINE, Branch in Kharkov, 61005 Kharkov, Ukraine

Name and mailing address _____

_____

_____

_____

Матеріал, захищений авторським правом

Научные редакторы *В. И. Луговой, Т. Н. Юрченко*
Редактор *Е. Д. Пазыч*
Компьютерный набор и верстка:
И. Г. Пятигорская

Scientific Editors *V. I. Lougovoy, T. N. Yurchenko*
Editor *E. D. Pazych*
DTP-work by *I. G. Pyatigorskaya*

Подписано в печать 10.07.2000. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,95. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ 2 PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Индекс 70474 2000 Index 70474

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 journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to

Editor-in-Chief V. I. Grishchenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine
23 Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkov, Ukraine
Tel. (0572) 72-41-43
Fax (0572) 72-00-84
E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Материал, защищенный авторским правом