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

Институт проблем криобиологии и криомедицины

1
2002

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

## 30 лет институту

# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Материал, захищений авторським 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. Вонг** (Канада)
**А. Н. Гольцев** (Харьков)
**В. М. Гордиенко** (Киев)
**К. Дж. Грин** (Великобритания)
**В. Н. Гурин** (Минск)
**Г. Ф. Жегунов** (Харьков)
**Ф. Ф. Круз-Санчес** (Испания)
**В. Де Лекер** (Бельгия)
**В. И. Луговой** (Харьков)
**В. Я. Малеев** (Харьков)
**Г. Маттес** (Германия)
**Г. Меримен** (США)
**П. Мержичка** (Чехия)
**Ю. Ф. Пастухов** (Санкт-Петербург)
**Е. Н. Попов** (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)
**F. F. Cruz-Sanchez** (Spain)
**E. Z. Emirbekov** (Makhachkala)
**A. N. Goltsev** (Kharkov)
**V. M. Gordiyenko** (Kiev)
**C. J. Green** (Great Britain)
**V. N. Gurin** (Minsk)
**W. De Loecker** (Belgium)
**V. I. Lugovoj** (Kharkov)
**V. Ya. Maleyev** (Kharkov)
**G. Matthes** (Germany)
**P. Mezrichka** (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**

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



Адрес редакции: *61015, Харьков, ул. Переяславская, 23, тел. (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Адрес ИПКиК в Интернете: www.users.itl.net.ua/ipcc

Address of the Editorial Office: *23, Pereyaslavskaya str., 61015 Kharkov, Ukraine. Tel.: (0572) 72-10-39*

e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Institute Internet Address: www.users.itl.net.ua/ipcc



Матеріал, захищений авторським правом

1
2002

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

## СОДЕРЖАНИЕ

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

*Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Жуликова Е. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее гипотермическом хранении . . . . . 3

*Грищенко В. И., Дунаевская А. В., Бабенко В. И.* К определению скорости охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах . . . . . 7

*Попова Л. Д.* Состояние системы антиоксидантной защиты у крыс с разным уровнем судорожной готовности после воздействия полиэтиленгликолей . . . . . 14

*Матвиенко Е. А., Коба Л. В., Шпакова Н. М., Бондаренко В. А.* Возрастные особенности устойчивости эритроцитов крыс к гипертоническому воздействию под влиянием хлорпромазина . . . . . 19

*Моисеева Н. Н., Кравченко Л. П., Семенченко О. А., Петренко А. Ю.* Влияние трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии 24

*Горбунов Л. В.* Контроль температуры и скорости ее изменения в среде, содержащей биообъект . . . . . 32

### КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ

*Бизикина О. В., Линник Т. П.* Криоконсервирование спермы петухов. III. Цитотоксичность и криопротекторная активность смеси N,N-диметилформамида с диолами . . . . . 39

*Сандомирський Б. П., Гальченко С. Є., Гальченко К. С.* Антиоксидантні властивості лактоферину з нативного, замороженого та ліофілізованого молозива корів . . . . . 45

*Або Жаяб Салех, Луговой С. В., Губина Н. Ф., Легач Е. И.* Влияние криоконсервирования на динамику базальной секреции тестостерона органной культуры семенников крыс . . . . . 50

### КРИОМЕДИЦИНА

*Грищенко В. И., Гольцев А. Н.* Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения . . . . . 54

*Бабийчук В. Г., Ершова О. В., Малышева Г. В., Козлов А. В., Ломакин И. И., Марченко В. С.* Клиническое применение ритмической гипотермии . . . . . 85

*Демин Ю. А.* Влияние трансплантаций криоконсервированных клеток эмбриональной печени на метаболические показатели больных с ретинальными ангиопатиями . . . . . 92

*Грищенко В. И., Снурников А. С., Еременко В. В., Муринец-Маркевич Б. Н., Гришина О. А., Лазуренко В. В., Грищенко О. В.* Низкотемпературные и другие немедикаментозные методы лечения и аппаратура, применяемые в гинекологической практике . . . . . 100

### ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

*Бондаренко Н. В., Рамазанов В. В.* Влияние гипертонических сред и барбитуратов на транспорт анионов в эритроцитах человека . . . . . 111

*Онищенко Е. В., Тимченко Н. Н.* Влияние низких температур, глицерина и 1,2-пропандиола на термоденатурацию фетального гемоглобина . . . . . 113

*Волкова Н. А., Божок Г. А., Алабедалькарим Н. М., Бондаренко Т. П.* Влияние трансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы на содержание нуклеиновых кислот в печени кроликов . 115

*Олейник О. А., Абу-аль Асаль Ф., Рамазанов В. В.* Влияние ингибиторов анионного канала на постгипертонический лизис эритроцитов . . . . . 117

*Холодный В. С.* Осмотическое поведение и транспортные характеристики плазматических мембран ядросодержащих клеток кордовой крови человека в гипертонических растворах проникающих криопротекторов 120

*Боброва Е. Н., Зинченко А. В.* О девитрификации в суспензиях эритроцитов кордовой крови при охлаждении и нагреве с 1,2-пропандиолом и глицерином . . . . . 122

*Сынчикова О. П., Шпакова Н. М.* Действие лидокаина на развитие гипертонического гемолиза эритроцитов при различных температурах . . . . . 124

*Бабенко Н. Н., Гольцев А. Н.* Органотипическое культивирование как метод оценки функциональной активности эмбриональной ткани мозга . . . . . 127

*Сомов А. Ю.* Чувствительность системы окислительного фосфорилирования к гипотермическому хранению печени . . . . . 129

*Рассоха И. В., Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д.* Оценка структурно-функциональных характеристик клеток моноцитарно-макрофагальной системы при применении продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса в условиях развития аутоиммунных заболеваний . . . . . 131

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 2002

Матеріал, захищений авторським правом

1 2002

# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

## CONTENTS


### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

*Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Zhulikova E. P., Sharlay T. M.* Dynamics of Oxidative and Recovering Activity of Enzymes in Placenta Tissue Under its Hypothermic Storage . . . . . 3

*Grischenko V. I., Dunaevskaya A. V., Babenko V. I.* To the Determination of Cooling Rate of Biological Objects in Cylindrical Containers . . . . . 7

*Popova L. D.* State of Antioxidant System in Rats with Different Seizure Susceptibility after Polyethylene Glycols Effect . . . . . 14

*Matviyenko Ye. A., Koba L. V., Shpakova N. M., Bondarenko V. A.* Age Peculiarities of Rat Erythrocytes' Resistance to Hypertonic Effect with Influence of Chlorpromasine . . . . . 19

*Moiseyeva N. N., Kravchenko L. P., Semenchenko O. A., Petrenko A. Yu.* Transplantation Effect of Subjected to Hypothermic Storage Hepatocytes on Rat's Liver Regeneration After a Partial Hepatectomy . . . . . 24

*Gorbunov L. V.* Control of the Temperature and its Rate Change in the Bioobject Comprising Medium . . . . . 32

### CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

*Bizikina O. V., Linnik T. P.* Fowl Sperm Cryopreservation. III. Citotoxicity and Cryoprotective Activity of N,N-Dimethyl Formamide with Diols Mixture . . . . . 39

*Sandomirsky B. P., Galchenko S. E., Galchenko E. S.* Antioxidative Properties of Lactoferrin Derived from Native, Frozen and Lyophilized Bovine Colostrum . . . . . 45

*Abujayyab Saleh, Lugovoj S. V., Gubina N. F., Legach E. I.* Cryopreservation Effect on the Dynamics of Basal Secretion of Rat's Testes Organ Culture Testosterone . . . . . 50

### CRYOMEDICINE

*Grischenko V. I., Goltsev A. N.* Transplantation of the Products of Embryofetoplacental Complex. From Understanding of Mechanism of the Effect to Increasing the Efficiency of Application . . . . . 54

*Babijchuk V. G., Ershova O. V., Malysheva G. V., Kozlov A. V., Lomakin I. I., Marchenko V. S.* Clinical Application of Rhythmic Hypothermia . . . . . 85

*Demin Yu. A.* Effect of Transplantation of Cryopreserved Cells of Embryonic Liver on Metabolic Indces of Patinets with Retinal Angiopathies . . . . . 92

*Grischenko V. I., Snurnikov A. S., Eremenko V. V., Murinetz-Markevich B. N., Grishina O. A., Lazurenko V. V., Grischenko O. V.* Low Temperature and Other Non-medicinal Treatment Methods and Apparatuses, Applied in Gynaecological Practice . . . . . 100

### ABSTRACTS OF THE REPORTS TO THE CONFERENCE OF YOUNG SCIENTISTS

*Bondarenko N. V., Ramazanov V. V.* Effect of Hypertonic Media and Barbiturates on Transport of Anions in Erythrocytes . . . . . 111

*Onischenko E. V., Timchenko N. N.* Effect of Low Temperatures, Glycerol and 1,2-Propane Diol on Thermodenaturation Of Fetal Hemoglobin . . . . . 113

*Volkova N. A., Bozhok G. A., Alabedalkarim N. M., Bondarenko T. P.* Transplantation Effect of Thyroid Gland's Cryopreserved Organ Culture on the Content of Nucleic Acids in Rabbit's Liver . . . . . 115

*Oleynik O. A., Abu-al Assal F., Ramazanov V. V.* Effect of Anionic Channel Inhibitors on Erythrocyte Posthypertonic Hemolysis . . . . . 117

*Kholodnyy V. S.* Osmotic Behaviour and Plasmatic Membrane Transport Characteristics of Human Cord Blood Nucleated Cells in Hypertonic Solutions of Penetrating Cryoprotectants . . . . . 120

*Bobrova E. N., Zinchenko A. V.* About Devitrification in Cord Blood Erythrocytes Suspensions When Cooling and Thawing with 1,2-propanediol And Glycerol . . . . . 122

*Synchykova O. P., Shpakova N. M.* Lidocaine Effect on the Development of Hypertonic Hemolysis of Erythrocytes at Various Temperatures . . . . . 124

*Babenko N. N., Goltsev A. N.* Organotypic Culturing as the Method for Estimating the Functional Activity of Embryonic Neural Tissue . . . . . 127

*Somov A. Yu.* Sensitivity of Oxidative Phosphorylation System to Hypothermic Storage of Liver . . . . . 129

*Rassokha I. V., Goltsev A. N., Ostankova L. V., Dubrava T. G., Lutsenko E. D.* Evaluation of Structural and Functional Characteristics of Monocyte-Macrophage System Cells when Applying the Products of Embryofetoplacental Complex under Conditions of Autoimmune Disease Development . . . . . 131


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

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, "Problems of Cryobiology", 2002

Матеріал, захищений авторським правом

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ**

УДК 611.013.85: 615.35: 577.15: 615.832.9

**THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY**

UDC 611.013.85: 615.35: 577.15: 615.832.9

# Динамика активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее гипотермическом хранении

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

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

# Dynamics of Oxidative and Recovering Activity of Enzymes in Placenta Tissue Under its Hypothermic Storage

T. N. YURCHENKO, A. P. BELONOZHKO, E. P. ZHULIKOVA, 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 СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, НАД·$H^2$ и НАДФ·$H^2$ в ткани плаценты в зависимости от сроков ее гипотермического хранения.

Методами кількісної гістохімії і кількісного фотометричного аналізу проведено дослідження зміни активності СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, НАД·$H^2$ і НАДФ·$H^2$ у тканині плаценти в залежності від термінів її гіпотермічного зберігання.

Using the methods of quantitative histochemistry and quantitative photometrical analysis we carried-out the investigation of change in SDG, LDG, α-GPDG, NAD·$H^2$, and NADP·$H^2$ activity in placenta tissue depending on terms of its hypothermic storage.

Исследование посвящено изучению активности некоторых окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты, а также анализу их изменений в процессе гипотермического хранения плаценты с применением метода количественной гистохимии и фотометрического анализа [1–4].

Образцы плаценты были забраны от женщин после родов или кесарева сечения. Часть этих образцов закладывалась в холодильную камеру ($t = 4$ °C) для их гипотермического хранения на протяжении 2-х суток. Из образцов контрольной группы, а также подвергшихся гипотермическому хранению на протяжении 1- и 2-х суток были приготовлены криостатные срезы толщиной 10 мкм, которые инкубировались с соответствующими субстратами и окрашивались нитросиним тетразолем (НСТ). В результате окрашивания в препаратах образовывался осадок диформазана, количество которого являлось критерием оценки активности ферментов. Для контроля за протеканием гистохимических реакций были использованы криостатные срезы печени интактных крыс. В результате проведенных реакций в ткани нативной и подвергшейся гипотермическому хранению плаценты были выявлены следующие ферменты: СДГ, ЛДГ, α-ГФДГ, а также НАД·$H^2$ и НАДФ·$H^2$-диафоразы.

Количественный учет содержания диформазана в срезах нативной плаценты и после ее гипотермического хранения на протяжении 1- и 2-х суток

The investigation is devoted to the study of the activity of some oxidative and recovering enzymes in placenta tissue, as well as to the analysis of their changes during the process of placenta hypothermic storage with the application of the method of quantitative histochemistry and quantitative photometrical analysis [1–4].

Placenta samples were obtained from women after labours or cesarean sections. Part of these samples was placed into a freezing chamber ($t = 4$ °C) for hypothermic storage for 2 days. From the samples of the control group, as well as from those, subjected to a hypothermic storage during 1 and 2 days, the cryostat sections (10 μm of section thickness), incubated with the corresponding substrates were prepared and stained with nitroblue tetrazolium (NBT). As a result of staining diformasane sediment, which amount was the criterion for enzyme activity estimation, was formed in the preparations. In order to control the proceeding of histochemical reactions we used liver cryostat sections of intact rats.

As a result of performed reactions in the tissue of native and subjected to hypothermic storage placenta the following enzymes were revealed: SDG, LDG, α-GFDG, as well as NAD·$H^2$ and NADP·$H^2$-diaphorase.

Quantitative account of diformasane content in the sections of native placenta and after its hypothermic storage within 1–2 days was conducted using the



Матеріал, захищений авторським правом

проводился методом фотометрического анализа с использованием телевизионного микроскопа-фотометра. На небольшом участке препарата (размер фотометрируемой площади составлял примерно 0,002–0,003 мм$^2$) в проходящем монохроматическом свете (длина волны 546 нм) определялась величина оптической плотности, что пропорционально концентрации диформазана, а следовательно, и удельной активности фермента.

На срезах одной плаценты было произведено по 30 измерений величины оптической плотности, в каждой группе препаратов (контрольная и после гипотермии различной продолжительности) было использовано по 5 плацент.

Результаты фотометрического анализа были обработаны статистически. Для каждой выборки (объем выборки — 30 измерений оптической плотности или 30 первичных дат) были рассчитаны величины среднего значения $M$, его ошибка репрезентативности $m$, по методу Стьюдента определен уровень достоверности $P$.

Для оценки однородности экспериментального материала были составлены выборки по средним значениям оптической плотности для каждой плаценты одной экспериментальной группы (выборки из 5 вторичных дат), для которых также были определены $M$, $m$ и $P$. Если выборки из вторичных дат были достоверны ($P > 0{,}95$), составляли суммарные выборки по всем первичным датам для экспериментальной группы (объем выборки — 150 первичных дат), для которых также определялись $M$, $m$ и $P$. Результаты статистического анализа приведены в табл. 1. Кроме того, был определен уровень достоверности различий между величинами среднего значения оптической плотности для различных групп каждого исследованного фермента.

Используя дисперсионный анализ однофакторных комплексов, оценивали силу влияния неоднородности экспериментального материала. Пять групп измерений по 30 в каждой группе (первичные даты) принимались как градации фактора. В результате факторного анализа были определены величины показателя силы влияния $F$, его ошибки репрезентативности $f$ и уровня достоверности, которые представлены в табл. 2.

Методом однофакторного дисперсионного анализа также была оценена степень влияния времени гипотермического хранения плаценты на изменение в ней активности ферментов. Было определено 3 градации фактора времени: 0 (контрольная группа), 1- и 2-х суток гипотермического хранения, каждая из них была представлена 150 измерениями (первичные даты) величины оптической плотности. Величины $F$, $f$ и $P$, полученные в результате дисперсионного анализа, даны в табл. 3.

method of photometrical analysis with usage of TV microscope-photometer. On a small site of preparations (size of photometring area made about 0.002–0.003 mm$^2$) in a passing monochrome light (wavelength was 546 nm) one determined the value of optical density, that was proportional to diformasane concentration and, consequently, to enzyme specific activity. In the sections of one placenta we carried-out by 30 measurements of optical density value, in each group of preparations (the control and after hypothermia of various duration) we used by 5 placentas.

Results of photometrical analysis were statistically processed. For each sample (sample volume was 30 measurements of optical density or 30 primary dates) one calculated the values of the mean $M$, its error of representativity $m$, according to the Student's method one determined the level of statistical significance $P$.

In order to estimate the homogeneity of experimental material we made the samples by average values of optical density for each placenta of one experimental group (samples from 5 secondary dates), for each one determined $M$, $m$ and $P$ as well. If the samples from secondary dates were statistically true ($P > 0.95$), we made total samples according to all primary dates for experimental group (sample volume was 150 primary dates), for which we also determined $M$, $m$ and $P$. The results of statistical analysis are

**Таблица 1**

**Динамика активности окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее гипотермическом хранении**

**Table 1**

**Dynamics of oxidative and recovering activity of enzymes in placenta tissue under its hypothermic storage**

| Фермент Enzyme | Статистические показатели Statistical indices | Контроль Control | Срок хранения, сут Storage term, days | |
|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 |
| СДГ SDG | $M \pm m$ | 114,5 ± 3,5 | 122,1 ± 4,3 | 120,2 ± 5,3 |
| | $P_1$ | | < 0,95 | < 0,95 |
| | $P_2$ | | | < 0,95 |
| ЛДГ LDG | $M \pm m$ | 125,3 ± 3,8 | 120,2 ± 3,9 | 103,0 ± 3,7 |
| | $P_1$ | | < 0,95 | < 0,999 |
| | $P_2$ | | | < 0,999 |
| α-ГФДГ α-GPDG | $M \pm m$ | 96,1 ± 4,7 | 106,7 ± 4,7 | 95,9 ± 3,8 |
| | $P_1$ | | < 0,95 | < 0,95 |
| | $P_2$ | | | < 0,95 |
| НАД·Н$^2$ NAD·H$^2$ | $M \pm m$ | 158,2 ± 7,4 | 184,0 ± 6,6 | 171,7 ± 7,5 |
| | $P_1$ | | > 0,99 | < 0,95 |
| | $P_2$ | | | < 0,95 |
| НАДФ·Н$^2$ NADP·H$^2$ | $M \pm m$ | 158,4 ± 6,3 | 145,1 ± 6,4 | 142,6 ± 8,4 |
| | $P_1$ | | < 0,95 | < 0,95 |
| | $P_2$ | | | < 0,95 |

**Примечание.** Уровень достоверности результатов $P > 0{,}999$; $P_1$ — достоверность различий по сравнению с контролем; $P_2$ — достоверность различий по сравнению с 1-ми сутками хранения.

**Notes.** The level of significance $P > 0.999$; $P_1$ — statistical significance of differences in comparison with control; $P_2$ — statistical significance of differences in comparison with the 1st day of storage.



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 2** **Table 2**

**Влияние неоднородности экспериментального материала на суммарную активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты при ее гипотермическом хранении**

**Effect of inhomogeneity of experimental material on total activity of oxidative and recovering enzymes in placenta tissue under its hypothermic storage**

| Фермент Enzyme | Статистические показатели $F \pm f$ при сроке хранения, сут Statistical indices $F \pm f$ during storage, days | | |
|---|---|---|---|
| | 0 (контроль) 0 (control) | 1 | 2 |
| СДГ SDG | 0,185 ± 0,022 | 0,147 ± 0,024 | 0,091 ± 0,025 |
| ЛДГ LDG | 0,355 ± 0,018 | 0,364 ± 0,018 | 0,407 ± 0,016 |
| α-ГФДГ α-GPDG | 0,376 ± 0,017 | 0,303 ± 0,019 | 0,252 ± 0,021 |
| НАД·$H^2$ NAD·$H^2$ | 0,719 ± 0,008 | 0,245 ± 0,021 | 0,395 ± 0,017 |
| НАДФ·$H^2$ NADP·$H^2$ | 0,392 ± 0,017 | 0,443 ± 0,015 | 0,535 ± 0,013 |

**Примечание.** Уровень достоверности $P > 0,99$.

**Notes.** The level of significance $P > 0.99$

Результаты гистохимического и фотометрического анализа, приведенные в табл. 1, позволяют судить о поведении окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты в процессе ее гипотермического хранения, при этом наблюдаются некоторые изменения активности таких ферментов, как СДГ, α-ГФДГ и НАДФ·$H^2$-диафоразы. Однако ни между контрольной группой образцов и группами, прошедшими гипотермическое хранение, ни между группами, обследованными на различных этапах гипотермии (1- и 2-е сутки) эти изменения не носят статистически достоверного характера ($P < 0,95$).

Рассматривая изменение активности ЛДГ в процессе гипотермического хранения плаценты, следует отметить снижение активности фермента ко 2-м суткам относительно уровня этого показателя в контрольной группе ($P > 0,999$) и группе, соответствующей 1-м суткам хранения ($P > 0,999$).

Активность НАД·$H^2$-диафоразы увеличивается к 1-м суткам гипотермического хранения плаценты ($P > 0,99$), после чего этот показатель снижается до величины, которая не отличается достоверно ни от уровня в контрольной группе ($P < 0,95$), ни от уровня в группе, соответствующей 1-м суткам гипотермии ($P < 0,95$).

Следует отметить, что изменение активности ферментов в каждой исследованной группе объектов (контроль, 1- и 2-е сутки гипотермического хранения плаценты) в значительной степени связано с тем, что ее определение было проведено на 5 различных объектах (плацентах). Результаты дисперсионного анализа (табл. 2) указывают на то, что в каждой экспериментальной группе изменение

**Таблица 3** **Table 3**

**Влияние срока гипотермического хранения на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты**

**Effect of hypothermic storage term on the activity of oxidative and recovering enzymes in placenta tissue**

| Фермент Enzyme | Статистические показатели Statistical indices | Фактор времени хранения Storage time factor |
|---|---|---|
| СДГ SDG | $F \pm f$ $P$ | 0,004 ± 0,004 < 0,95 |
| ЛДГ LDG | $F \pm f$ $P$ | 0,041 ± 0,004 > 0,999 |
| α-ГФДГ α-GPDG | $F \pm f$ $P$ | 0,009 ± 0,004 < 0,95 |
| НАД·$H^2$ NAD·$H^2$ | $F \pm f$ $P$ | 0,014 ± 0,004 > 0,95 |
| НАДФ·$H^2$ NADP·$H^2$ | $F \pm f$ $P$ | 0,006 ± 0,004 < 0,95 |

presented in the Table 1. In addition, we determined the level of statistical significance of differences between the values of the mean of optical density for various groups of each studied enzyme (Table 1).

Using a dispersive analysis of one-factor complexes we realised the power estimation of inhomogeneity effect of experimental material. Five groups of measurements by 30 ones (primary dates) in each group were assumed as the factor gradations. As a result of factor analysis we determined the values of the index of effect power $F$, its errors of representativity $f$ and the level of significance, that were presented in the Table 2.

Using the method of one-factor dispersive analysis one estimated the effect degree of placenta hypothermic storage time on the change in enzyme activity in it. One detected 3 gradations of time factor: 0 (the control group), 1 and 2 days of hypothermic storage, each of them was presented by 150 measurements (primary dates) of the value of optical density. The values of $F$, $f$ and $P$, obtained as a result of a dispersive analysis, are demonstrated in the Table 3.

The results of histochemical and photometrical analysis (Table 1) allow to judge about the behaviour of oxidative and recovering enzymes in placenta tissue during the process of its hypothermic storage, thereat certain changes in the activity of such enzymes as SDG, α-HPDG and NADP·$H^2$-diaphorase. However, these changes do not have statistically true character ($P < 0.95$) neither between the control group of samples and those, passed hypothermic storage, nor between the groups, observed at different stages of hypothermia (1 and 2 day).

Considering the changes in LDG activity during the process of placenta hypothermic storage we should note a decrease in enzyme activity by the 2nd day in respect to the level of this index in the control group



Матеріал, захищений авторським правом

активности ферментов в 20–40% случаев связано с неоднородностью экспериментального материала.

Результаты дисперсионного анализа оценки силы влияния времени гипотермического хранения плаценты на активность окислительно-восстановительных ферментов в ее структурных элементах (табл. 3) подтверждают, что только для ЛДГ и НАД·$H^2$ время хранения в 4,1 ± 0,4% и 1,4 ± 0,4% случаев соответственно влияет на изменение активности ферментов.

ЛДГ – это фермент, который принимает участие в третьем этапе гликолиза, катализируя восстановление пирувата до лактата, отражает анаэробный вариант утилизации сахаров, находясь в непрочной связи с мембранами эндоплазматической сети и являясь НАД-зависимым энзимом. В свою очередь НАД·$H^2$-дегидрогеназа служит общим показателем активности энергообеспечения клетки и локализуется как внутри митохондрий, так и во внемитохондриальном пространстве.

Из вышеизложенного можно предположить, что недолговременное гипотермическое хранение плаценты не приводит к существенному нарушению ферментативного профиля в ее клетках и имеется лишь небольшое нарушение процесса гликолиза, связанное с утилизацией сахаров и энергообменом между мембранами митохондрий и эндоплазматической сетью.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Барков Л. А., Алещенко И. Е.* Морфофункциональная характеристика плаценты при физиологической беременности и идиопатических нарушениях внутриутробного развития // Архив патологии.– 1990.– 52, № 7.– С. 35–39.
2. *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.
3. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.* Динамика активности НАД·$H^2$ и НАДФ·$H^2$ диафораз в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 31–35.
4. *Юрченко Т. Н., Белоножко А. П., Шарлай Т. М.*. Динамика активности ЛДГ и МДГ в клетках растущего и обновляющегося эпителия роговицы в процессе ее гипотермического хранения // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 38–43.


Поступила 17.12.2001

($P > 0.999$) and in the group, corresponding to the 1st day of storage ($P > 0.999$).

NAD·$H^2$-diaphorase activity increases by the 1st day of placenta hypothermic storage ($P > 0.99$), then this index reduces down to the value, which does not statistically and significantly differ neither from the level in the control group ($P < 0.95$), nor from that in the group, corresponding to the 1st day of hypothermia ($P < 0.95$).

It should be noted, that the change in enzyme activity in each studied group of objects (control, 1st and 2nd day of placenta hypothermic storage) is related in a greater extent to the fact, that its determination was carried-out in 5 various objects (placentas). The results of dispersive analysis (Table 2) point to the fact, that in each experimental group the change in enzyme activity in 20–40% of cases is related to the inhomogeneity of experimental material.

The results of dispersive analysis of power estimation of placenta hypothermic storage time on the activity of oxidative and recovering enzymes in its structural elements (Table 3) confirm the fact, that only for LDG and NAD·$H^2$ the storage time affects the change in enzyme activity in 4.1 ± 0.4% and 1.4 ± 0.4% of cases, correspondingly.

LDG is the enzyme, participating in the third stage of glycolysis, by catalysing the recovery of pyruvate to lactate, reflects an anaerobic effect of sugar utilisation, being located in a non-solid bound with the membranes of endoplasmic net and being a NAD-dependent enzyme. In its turn NAD·$H^2$-dehydrogenase serves as a general index for the activity of cell power supply and is located both inside of mitochondria and into an extramitochondrial space.

From the mentioned above we can suppose that placenta short-term hypothermic storage does not result in a considerable disorder of enzymatic profile in its cells and there is a slight impairment of glycolysis process, related to the sugar utilisation and energy exchange between mitochondria membranes and endoplasmic net.

## REFERENCES


1. *Barkov L. A., Aleschenko I. E.* Morphofunctional characteristics of placenta at physiological pregnancy and idiopathic disorders of intrauterine development // Arkhivy patologii.– 1990.– 52, № 7.– P. 35–39.
2. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of α-GPDG activity in cells of growing and renewing epithelium of cornea during its hypothermic storage // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 3.– P. 21–26.
3. *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 // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 2.– P. 31–35.
4. *Yurchenko T. N., Belonozhko A. P., Sharlay T. M.* Dynamics of LDG and MDG activity in cells of growing and renewing epithelium of cornea during its hypothermic storage // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 3.– P. 38–43.


Accepted in 17.12.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 536.2: 519.6

UDC 57.043: 536.2: 519.6

# К определению скорости охлаждения биологических объектов в цилиндрических контейнерах

В. И. ГРИЩЕНКО, А. В. ДУНАЕВСКАЯ

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

В. И. БАБЕНКО

*Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины, г. Харьков*

# To the Determination of Cooling Rate of Biological Objects in Cylindrical Containers

V. I. GRISCHENKO, A. V. DUNAEVSKAYA

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

V. I. BABENKO

*B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Описан модельный эксперимент охлаждения биообъекта в цилиндрическом контейнере при прямом его погружении в жидкий азот. Даны теплофизический расчет и анализ теплообмена в системе контейнер–биообъект.

Описано модельний експеримент охолодження біооб'єкта в циліндричному контейнері при прямому його зануренны у рідкий азот. Дано теплофізичний розрахунок і аналіз теплообміну в системі контейнер–біооб'єкт.

The model experiment of cooling of biological object in the cylindric container at direct its immerging into liquid nitrogen. The thermophysical calculation and analysis of thermoexchange in the system of container–biological object.

Одним из важнейших факторов, влияющих на выживаемость биологических объектов после криоконсервирования, является скорость охлаждения. Криоконсервирование с использованием низких скоростей охлаждения, как правило, проводится с помощью программируемых замораживателей, в которых регулируется режим охлаждения. При криоконсервировании погружением в жидкий азот и другие хладоносители достигаются высокие скорости замораживания, которые определяются либо эмпирически, либо расчетным методом.

В работах [3, 4] было исследовано влияние криоконсервирования с высокими скоростями охлаждения на выживаемость спермиев после отогрева. Замораживание проводилось прямым погружением контейнеров с образцами в жидкий азот. Температуру криозащитной среды при охлаждении измеряли с помощью медь - константановой термопары. В ходе экспериментов использовали криозащитные среды со сложным составом и различным соотношением компонентов. Теплофизические свойства этих сред не были изучены, что не позволило в указанных работах провести теплофизический расчет теплопередачи в процессе охлаждения. Поэтому для анализа процесса охлаждения нами был поставлен тестовый эксперимент, в котором вместо криозащитной среды использовали жидкость с известными теплофизическими свойствами — этиловый спирт. В данной работе описан этот эксперимент и дан теплофизический расчет теплопередачи в процессе охлаждения.

Для эксперимента был взят один из использованных в [3, 4] контейнеров — катетер, представ-

Cooling rate is one of the most important factors, affecting the biological object viability after cryopreservation. Cryopreservation using low cooling rates, as a rule, is accomplished with programmable freezers with regulated cooling regimen. High freezing rates during cryopreservation, determined both empirically or by means a calculation, have been achieved by immerging into liquid nitrogen or other coolants.

In the works [3, 4] the effect of cryopreservation with high cooling rates on the spermatozoa viability after thawing, has been investigated. Freezing was done by a direct immerging of containers with the samples into liquid nitrogen. The temperature of cryoprotective medium during cooling was measured by means of a copper-constant thermocouple. During the experiment cryoprotective media with a complicated composition and various ratio of components have been used. Thermophysical properties of these media were not studied, this fact did not allow accomplishing the thermophysical calculation of a thermotransfer during a cooling process in the mentioned works. Therefore to analyze a cooling process we have set a testing experiment, where instead of a cryoprotective medium a fluid with known thermophysical properties, ethyl alcohol was used. In this work we described this experiment and demonstrated a thermophysical calculation for thermotransfer during cooling.

Catheter, one of the containers used in the works [3, 4], which is a hollow thick-wall cylinder with an outer diameter of $2r_c = 0.5$ cm and inner one of $2r_m = 0.27 \div 0.28$, and the length of 7.26 cm, was used for experiment. Catheter is made of a high-pressure



This One
A4GZ-RR6-CA4R
Матеріал захищений авторським правом

ляющий собой полый толстостенный цилиндр с диаметром внешним $2r_c = 0{,}5$ см, внутренним $2r_м = 0{,}27 \div 0{,}28$ см и длиной 7,26 см. Катетер изготовлен из полиэтилена высокого давления низкой плотности. Один из торцов катетера запаивали, а через второй заполняли 96%-й по объему этиловый спирт и вводили один из спаев медь-константановой термопары. Сигнал от термопары подавался на осциллограф. Осциллограммы снимались на видеокамеру и сканировались. Используемая в эксперименте термопара позволяет свести к минимуму статические погрешности измерения температуры [6]. Динамическую погрешность, привносимую инерционностью термопары, оценивали исходя из элементарной теории тепловой инерции измерителей температуры [5, 6]. Согласно этой теории температура $T_t(\tau)$, показываемая термометром, и измеряемая температура среды $T_m(\tau)$ в момент времени $\tau$ связаны дифференциальным уравнением

$$\varepsilon_1 \frac{dT_t(\tau)}{d\tau} + T_t(\tau) = T_m(\tau); \qquad (1)$$

$$T_t(0) = T_m(0), \qquad (2)$$

где $\varepsilon_1$ — показатель инерционности термопары, определяемый экспериментально по переходному процессу после скачкообразного изменения температуры среды (в нашем случае после прямого погружения термопары в жидкий азот). Используя методику, описанную в [6], было показано, что для нашей термопары $\varepsilon_1 = 0{,}1 \pm 0{,}02$. Полученные результаты измерения температуры спирта при прямом погружении катетера со спиртом в жидкий азот представлены экспериментальными точками на рис. 1.

Теплофизический расчет теплообмена в процессе охлаждения спирта в контейнере в описанном выше эксперименте сводится к нестационарной, одномерной, осесимметричной задаче определения радиального распределения температуры $T(r, \tau)$ в любой момент времени $\tau$ в бесконечно длинной цилиндрической оболочке (контейнере), заполненной спиртом. В начальный момент времени $\tau = 0$ система контейнер–спирт, имеющая одинаковую начальную температуру $T_0$, погружается в среду (жидкий азот) с температурой $T_N < T_0$ так, что ограничивающая систему поверхность мгновенно охлаждается до температуры $T_N$, которая остается постоянной в процессе охлаждения. Математически эта задача сводится к решению дифференциального уравнения теплопроводности:

$$c(T)\,\rho(T)\frac{\partial T}{\partial \tau} = -\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}(rW);$$

$$W = -\lambda(T)\frac{\partial T}{\partial r} \quad (\tau > 0,\ 0 < r < r_c), \qquad (3)$$

при начальном условии

$$T(r, 0) = T_0 \qquad (4)$$

и при краевых условиях

low density polyethylene oxide. One end of the catheter was soldered, and through another one it was filled with ethyl alcohol by 96% on the volume, one of the junctions of a copper-constant thermocouple. Signal from a thermocouple was applied to the oscillographer. Oscillograms were recorded by means of video camera and scanned. Used in the experiment thermocouple allowed to minimize statistical deviations of a temperature measuring [6]. Dynamical deviation, introduced by a thermocouple sluggishness, was evaluated proceeding from an elementary theory of heat inertia of thermometers [6, 15]. According to this theory, $T_t(\tau)$ temperature, showed in a thermometer and $T_m(\tau)$, the medium temperature, measured at the moment of $\tau$ time were connected by a differential equation:

$$\varepsilon_1 \frac{dT_t(\tau)}{d\tau} + T_t(\tau) = T_m(\tau); \qquad (1)$$

$$T_t(0) = T_m(0), \qquad (2)$$

where $\varepsilon_1$ — index for the inertness degree of a thermocouple, determined experimentally according to a transition process after a jump-like change of the medium temperature (in this case after a direct thermocouple immersion into liquid nitrogen). Using the method [6], it was demonstrated that for our thermocouple $\varepsilon_1 = 0.1 \pm 0.02$. The obtained results as for the measuring of an alcohol temperature during a direct catheter immersion with alcohol into liquid nitrogen are presented by experimental points in Fig. 1.

Thermophysical calculation of heat-exchange during the process of an alcohol cooling in a container in the described experiment consists in non-stationery, one-dimensional, axis-symmetrical problem of the determination of a radial temperature $T(r, \tau)$ redistribution at any moment of $\tau$ time in an infinitely long cylindrical membrane (container), filled with an alcohol. At an initial moment of time $\tau = 0$ the container–alcohol system with the same initial temperature $T_0$, is immerged into the medium (liquid nitrogen) with the temperature of $T_N < T_0$ in such a way that the surface, limiting a system, immediately has been cooled down to $T_N$ temperature, which remained constant during cooling process. Mathematically this problem consists in solving the differential equation of heat conductivity:

$$c(T)\,\rho(T)\frac{\partial T}{\partial \tau} = -\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}(rW);$$

$$W = -\lambda(T)\frac{\partial T}{\partial r} \quad (\tau > 0,\ 0 < r < r_c) \qquad (3)$$

under an initial condition:

$$T(r, 0) = T_0 \qquad (4)$$

under boundary conditions:



Матеріал, захищений авторським правом

$$\frac{\partial T(0,\tau)}{\partial r}=0\,,\quad T(0,\tau)\neq\infty\,; \tag{5}$$

$$T(r_c\,,\tau)=T_N\,, \tag{6}$$

где $r$ — радиальное расстояние до оси симметрии цилиндрической оболочки; $\tau$ — время; $T(r,\tau)$ — температура; $c(T)$, $\rho(T)$, $\lambda(T)$ — соответственно удельная теплоемкость, плотность, коэффициент теплопроводности жидкости (при $0\le r<r_m$) и материала оболочки (при $r_m<r\le r_c$), т.е. уравнение (3) квазилинейное с разрывными коэффициентами с разрывами при $r=r_m$ на границе раздела жидкость–твердое тело.

Краевая задача (3)–(6) решалась численно. Для нее интегро-интерполяционным методом [5, 8] была построена сквозная разностная схема с весами. Именно задаче (3)–(6) ставим в соответствие нелинейную разностную краевую задачу на неравномерной сетке $(r_i\,,\tau_j)$.

$$\tilde{\rho}_i^{(\sigma)}\frac{\hat{T}_i-T_i}{\Delta\tau}=(L[T_i])^{(\sigma)}\,;\quad (i=1,2,...,n-2;\ \tau_j=j\Delta\tau>0); \tag{3'}$$

$$T(r_i\,,0)=T_0\,; \tag{4'}$$

$$\left(\bar{\lambda}_1\frac{T_1-T_0}{h_0}\right)^{(\sigma)}=\frac{h_0}{4}(c_0\rho_0)^{(\sigma)}\frac{\hat{T}_0-T_0}{\Delta\tau}\,; \tag{5'}$$

$$T(r_c\,,\tau_j)=T_N\,, \tag{6'}$$

где

$$L[T_i]=\frac{1}{r_i\bar{h}_i}\left\{\bar{r}_{i+1}W_{i+1}-\bar{r}_iW_i\right\};$$

$$W_i=-\bar{\lambda}_i\frac{T_i-T_{i-1}}{h_{i-1}}\,;\ \tilde{\rho}_i=\frac{c_i^-\rho_i^-h_{i-1}+c_i^+\rho_i^+h_i}{2\bar{h}_i}\,, \tag{7'}$$

$r_0=0$; $r_{i+1}=r_i+h_i$ $(i=0,1,...,n-2)$; $r_{n-1}=r_c$; $h_i$ — шаг неравномерной сетки на интервале $[0,r_c\,]$, которая строилась так, чтобы один из ее узлов $i_m$ совпадал с границей раздела жидкость–твердое тело: $r_{i_m}=r_m$; $\Delta\tau$ — шаг временной сетки; $\tau_0=0$; $\tau_{j+1}=\tau_j+\Delta\tau$.

Пусть $f=f(r,\tau)$, тогда полагаем: $f_i=f(r_i\,,\tau_j)$, $\hat{f}_i=f(r_i\,,\tau_{j+1})$, $f_i^{\pm}=f(r_i\pm0,\tau_j)$, $\bar{f}_i=1/2(f_i^-+f_{i-1}^+)$, $f_i^{(\sigma)}=\sigma\hat{f}_i+(1-\sigma)f_i$ — среднее значение $f$ по $\tau$ с весом $\sigma$ $(0\le\sigma\le1)$.

Краевая задача (3')–(6') на каждом временном слое $\tau_{j+1}$ (при $\sigma\neq0$) нелинейна относительно искомых величин $\hat{T}_i$. Ее решение мы находили методом итераций [5, 8], беря в качестве начальной итерации $T_i$ решение на предыдущем шаге по времени $\tau_j$. Линеаризованная таким образом краевая задача на каждом шаге итерации решалась методом прогонки. Решение строилось по чисто неявной (монотонной) схеме, когда $\sigma=1$, и по симметричной (не монотонной, но более точной) схеме Кранка–

$$\frac{\partial T(0,\tau)}{\partial r}=0\,,\quad T(0,\tau)\neq\infty\,; \tag{5}$$

$$T(r_c\,,\tau)=T_N\,, \tag{6}$$

where $r$ — a radial distance to a symmetry axis of a cylindrical membrane; $\tau$ — time; $T(r,\tau)$ — temperature; $c(T)$, $\rho(T)$, $\lambda(T)$ — correspondingly, specific heat, density, coefficient heat conductivity in a fluid (at $0\le r<r_m$) and the cover material (at), i.e. the equation (3) quasi-linear with discontinued coefficients with breaks at $r=r_m$ in liquid–solid body boundary.

Boundary problem (3)–(6) was solved numerically. Through differential scheme with balance was built with this aim by means of integral-interpolation method. Namely to the problem (3)–(6) we bring into accordance a non-linear differential boundary problem at non-uniform grid $((r_i\,,\tau_j))$:

$$\tilde{\rho}_i^{(\sigma)}\frac{\hat{T}_i-T_i}{\Delta\tau}=(L[T_i])^{(\sigma)}\,;\quad (i=1,2,...,n-2;\ \tau_j=j\Delta\tau>0); \tag{3'}$$

$$T(r_i\,,0)=T_0\,; \tag{4'}$$

$$\left(\bar{\lambda}_1\frac{T_1-T_0}{h_0}\right)^{(\sigma)}=\frac{h_0}{4}(c_0\rho_0)^{(\sigma)}\frac{\hat{T}_0-T_0}{\Delta\tau}\,; \tag{5'}$$

$$T(r_c\,,\tau_j)=T_N\,, \tag{6'}$$

where

$$L[T_i]=\frac{1}{r_i\bar{h}_i}\left\{\bar{r}_{i+1}W_{i+1}-\bar{r}_iW_i\right\};$$

$$W_i=-\bar{\lambda}_i\frac{T_i-T_{i-1}}{h_{i-1}}\,;\ \tilde{\rho}_i=\frac{c_i^-\rho_i^-h_{i-1}+c_i^+\rho_i^+h_i}{2\bar{h}_i}\,, \tag{7'}$$

$r_0=0$; $r_{i+1}=r_i+h_i$ $(i=0,1,...,n-2)$; $r_{n-1}=r_c$; $h_i$ — a spacing of non-uniform grid at interval $[0,r_c\,]$, built in such a way, that one of its points $i_m$ coincided with the boundary of a liquid–solid body: $r_{i_m}=r_m$; $\Delta\tau$ — a step of temporary grid; $\tau_0=0$; $\tau_{j+1}=\tau_j+\Delta\tau$.

When $f=f(r,\tau)$, then we supposed that: $f_i=f(r_i\,,\tau_j)$, $\hat{f}_i=f(r_i\,,\tau_{j+1})$, $f_i^{\pm}=f(r_i\pm0,\tau_j)$, $\bar{f}_i=1/2(f_i^-+f_{i-1}^+)$, $f_i^{(\sigma)}=\sigma\hat{f}_i+(1-\sigma)f_i$ — an average value $f$ on $\tau$ with $\sigma$ weight $(0\le\sigma\le1)$.

Boundary problem (3')–(6') at each time layer $\tau_{j+1}$ (at $\sigma\neq0$) is non-linear as for to be determined values $\hat{T}_i$. Its solution we found by the method of iterations [5, 8], considering the solution at previous step according to time $\tau_j$ as an initial iteration $T_i$. Boundary task, being linearized in such a way at each step of iteration was solved by run method. The solution was built according to absolutely monotonous scheme, when $\sigma=1$, and on a symmetric Crank–Nikolson one (not monotonous, but more exact), when $\sigma=1/2$. Counting results at $\sigma=1$ and $\sigma=1/2$ differed



Матеріал, захищений авторським правом

Николсона, когда $\sigma = 1/2$. Результаты счета при $\sigma = 1$ и $\sigma = 1/2$ отличались незначительно. Численный счет был проведен при $r_c = 0{,}25$ см; $r_m = 0{,}55 r_c$; $\varepsilon_t = 0{,}1$; $T_0 = 290$ К; $T_N = 77{,}2$ К. Зависимости $\rho(T)$, $c(T)$, $\lambda(T)$ были взяты для 96% (по объему) этилового спирта из [1, с. 413; 2, табл. 174; 7, с. 54, 56; 13], а для полиэтилена высокого давления с низкой плотностью $\rho(290\ \text{К}) = 0{,}918$ г/см$^3$ из [10; 11, табл. 4.79; 14, с. 49; 52]. Результаты счета представлены на рис. 1–5.

Нас интересовала скорость охлаждения спирта в диапазоне температур $268\ \text{К} \geq T \geq 193$ К, в которой находится зона кристаллизации охлажденной вне- и внутриклеточной воды. Однако для наглядности мы произвели расчеты и при $T < 193$ К, экстраполируя значения функций $c(T)$, $\rho(T)$, $\lambda(T)$ на более низкие значения температуры, но без учета появления в дальнейшем твердой фазы. Если учесть образование твердой фазы спирта, то зависимость $T(r, \tau)$ при $T < 193$ К несколько изменится и будет лучше согласовываться с экспериментальными точками. При необходимости ее можно построить аналогичным численным методом [8], учтя известное условие в задаче Стефана на дополнительной подвижной точке разрыва — на границе двух фаз. Оценка инерционности термопары показала, что измеренное термопарой изменение температуры (в рассматриваемом интервале) следует почти с постоянным запаздыванием примерно на 0,1 с.

Рис. 1 иллюстрирует изменение во времени температуры спирта. Максимальная скорость снижения температуры $\max(-\partial T/\partial\tau)$ соответственно равна: для $T(0, \tau)$ — 2065; для $T(r_m, \tau)$ — 3850; для $\overline{T}_m(\tau)$ — 1740; для $T_t(\tau)$ — 1500; для $\overline{T}_{0,4}$ — 1750 град/мин (см. также рис. 3 и 4). Как и следовало ожидать, экспериментальные точки (рис. 1, кривая *4*) близки к расчетной кривой *5* в интервале температур $\overline{T}_{0,4} = 290 \div 213$ К, где достоверны используемые нами в расчетах значения теплофизических параметров $\rho, c, \lambda$. Со временем разность $T_t - \overline{T}_{0,4}$ монотонно растет, достигая ~10% на 5-й секунде, когда $\overline{T}_{0,4} = 193$ К. Обратим внимание и на то, что кривая *2* расположена между кривыми *1* и *3* так, что в процессе охлаждения точки кривой *2*, удаляясь от кривой *3*, приближаются к кривой *1*, т.е. если в начале процесса охлаждения средняя по объему спирта температура $\overline{T}_m$ больше определяется температурой слоя спирта у внутренней поверхности контейнера, то со временем на нее все большее влияние оказывает температура спирта, расположенного в центральной части контейнера. Это приводит к заметному уменьшению скоростей снижения осредненных температур $\overline{T}_m(\tau)$, $\overline{T}_{0,4}$ и $T_t(\tau)$ по сравнению со скоростью снижения температуры в любой точке объема спирта. Эта тенденция легко усматривается и при анализе рис. 2, где показано изменение температуры в радиальном направлении в системе контейнер–спирт при различных значениях времени $\tau$. Качественный анализ

slightly. A numeric counting was done at $r_c = 0{,}25$ cm; $r_m = 0{,}55 r_c$; $\varepsilon_t = 0{,}1$; $T_0 = 290$ K; $T_N = 77{,}2$ K. Dependencies $\rho(T)$, $c(T)$, $\lambda(T)$ were taken for 96% ethyl alcohol (on volume) using the works [1, p 413; 2, Table 174; 7, P. 54, 66, 13], as for high pressure polyethylene with low density $\rho(290\ \text{K}) = 0{,}918$ г/cm$^3$ the following works were used [10; 11, Table 4.79; 14, P. 49, 52]. Counting results are presented in Fig. 1–5.

A cooling rate of an alcohol within the temperature range of $268\ \text{K} \geq T \geq 193$ K, where a crystallization zone of being cooled extra- and intracellular water was present, was of great interest for us. However for and evidence we also calculated at $T < 193$ K, extrapolating the values of the following functions: $c(T)$, $\rho(T)$, $\lambda(T)$ on lower temperature values, but not considering a solid phase for further. Dependence $T(r, \tau)$ at $T < 193$ K slightly changing and better matching with experimental points if the formation of a solid phase of alcohol is considered. In the case of necessity it could be built by an analogous numeric method [8], considering well-known condition in the Stefan's problem in an additional breaking point, at the boundary of two phases. Estimation of a thermocouple sluggishness demonstrated, that measured by thermocouple the temperature change (within the considered range) followed almost with a constant slag of about 0.1 s.

Fig. 1 illustrates the change of an alcohol temperature within the time. The maximum rate for a temperature decrease $\max(-\partial T/\partial\tau)$ is 2065 degrees/min for $T(0, \tau)$; 3850 degrees/min for $T(r_m, \tau)$; 1740 degrees/min for $\overline{T}_m(\tau)$ —; 1500, for $\overline{T}_{0,4}$ — 1750 degrees/min for $T_t(\tau)$, correspondingly (see also Fig. 3 and 4). As it should be expected, experimental points (Fig. 1, curve *4*) are close to theoretical curve *5* in the interval of temperatures of $\overline{T}_{0,4} = 290$–$213$ K, where the used by us in the calculations values of therphysical parameters $\rho, c, \lambda$ are statistically significant. With time the difference $T_t - \overline{T}_{0,4}$ monotoneously increases, reaching ~10% at the 5th second, when of $\overline{T}_{0,4} = 193$ K. Let's pay the attention also should be paid to the fact that the curve *2* is located between the curves *1* and *3* in such a way, that during a cooling process the points of curve *2*, leaving out the curve *3*, are approaching to the curve *1*, i.e. if at the beginning of a cooling process an average on an alcohol volume $\overline{T}_m$ temperature has been considerably determined by the temperature of an alcohol layer near a container inner surface, then in due course an alcohol temperature, located in a central part of container, affects it much stronger. This results in a significant reduction in the decrease rates of averaged temperatures $\overline{T}_m(\tau)$ and $T_t(\tau)$ comparing to a decrease rate of the temperature in any point of an alcohol volume. This tendency is easily noted also during the analysis (Fig. 2), where the temperature change has been demonstrated in a radial direction in a container–alcohol system at vari-



Матеріал, захищений авторським правом

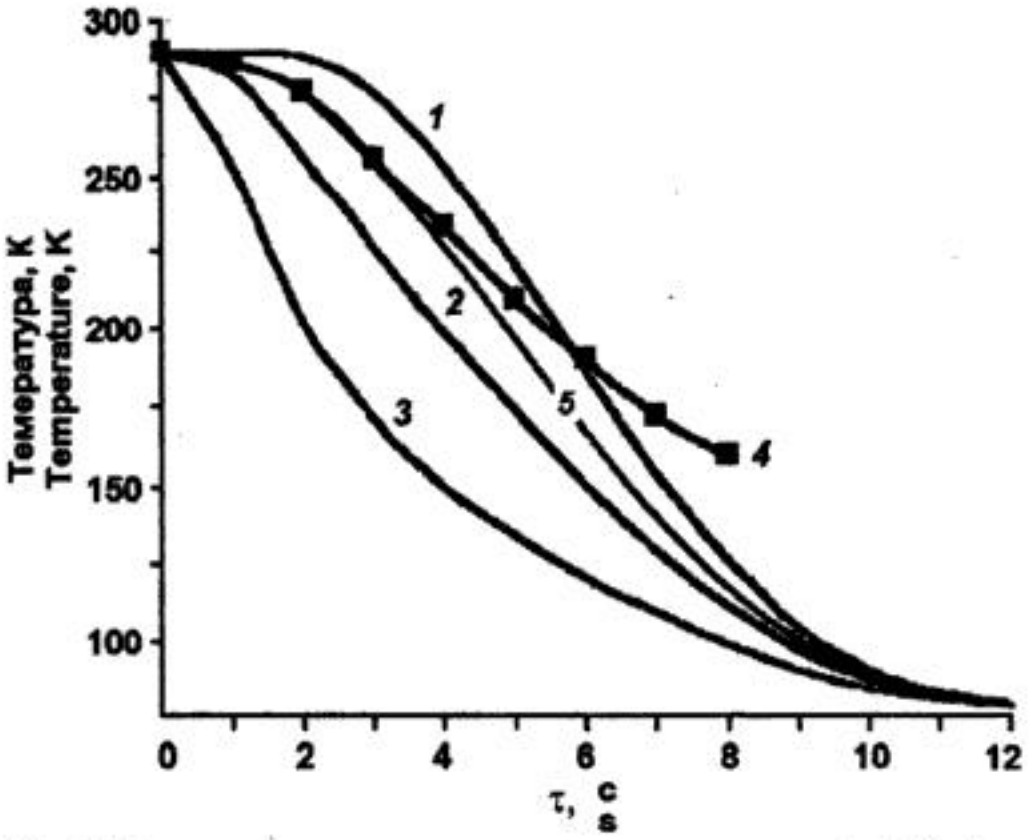



**Рис. 1.** Изменение во времени температуры спирта: *1* – $T(0, \tau)$ – температура в окрестности оси симметрии контейнера; *2* – $T_m(\tau)$ – температура, средняя по объему спирта; *3* – $T(r_m, \tau)$ – температура в окрестности внутренней поверхности контейнера; *4* – $T_t(\tau)$ – температура, измеренная термопарой в эксперименте в окрестности оси симметрии контейнера; *5* – $T_{0,4}$ – температура, средняя по части объема спирта ($r \le 0{,}4r_c$), где находилась термопара.

**Fig. 1**. The change of an alcohol temperature within the time: *1* – $T(0, \tau)$ – temperature at a symmetry axis of container; *2* – $T_m(\tau)$ – temperature an average on a small volume of alcohol; *3* – $T(r_m, \tau)$ – temperature at the inner surface of container; *4* – $T_t(\tau)$ – temperature measured by the thermocouple in the experiment at a symmetry axis of container; *5* – $T_{0,4}$ – the temperature, average by the part of alcohol volume ($r \le 0{,}4r_c$), where the thermocouple was placed.

кривых рис. 1 и 2 показывает, что в начале процесса охлаждения наиболее интенсивное снижение температуры происходит в пристенном к контейнеру слое спирта. Затем этот процесс интенсивного охлаждения спирта смещается в центральную часть контейнера. Некоторую количественную характеристику этого процесса дают рис. 3 и 4. На рис. 3 кривая *1* показывает, как изменяется со временем максимальная по объему скорость охлаждения спирта $\max\limits_{(r)}(-\partial T(r, \tau)/\partial\tau)$, а кривая *2* – как смещается со временем точка максимума $r_{max}$, где указанный выше максимум достигается. На рис. 4 показано изменение скорости охлаждения спирта $(-\partial T(r, \tau)/\partial\tau)$ в радиальном направлении при различных значениях времени τ. В рассматриваемом интервале температур процесс охлаждения спирта продолжается ~6 с. При τ ~ 3,4 с скорость охлаждения спирта более-менее выравнивается по его объему. Начиная уже с τ = 0,5 с, она существенно неравномерна по объему спирта.

На практике фактически интересует средняя скорость охлаждения биообъектов в определенном интервале температур (в нашем случае от 268 до 193 К). Из рис. 1 видно, что время δτ охлаждения спирта в этом интервале, а значит, и средняя скорость охлаждения $V_{ср} = 60{\cdot}75\ \text{К}/\delta\tau$ в различных точках объема спирта будут также различными.

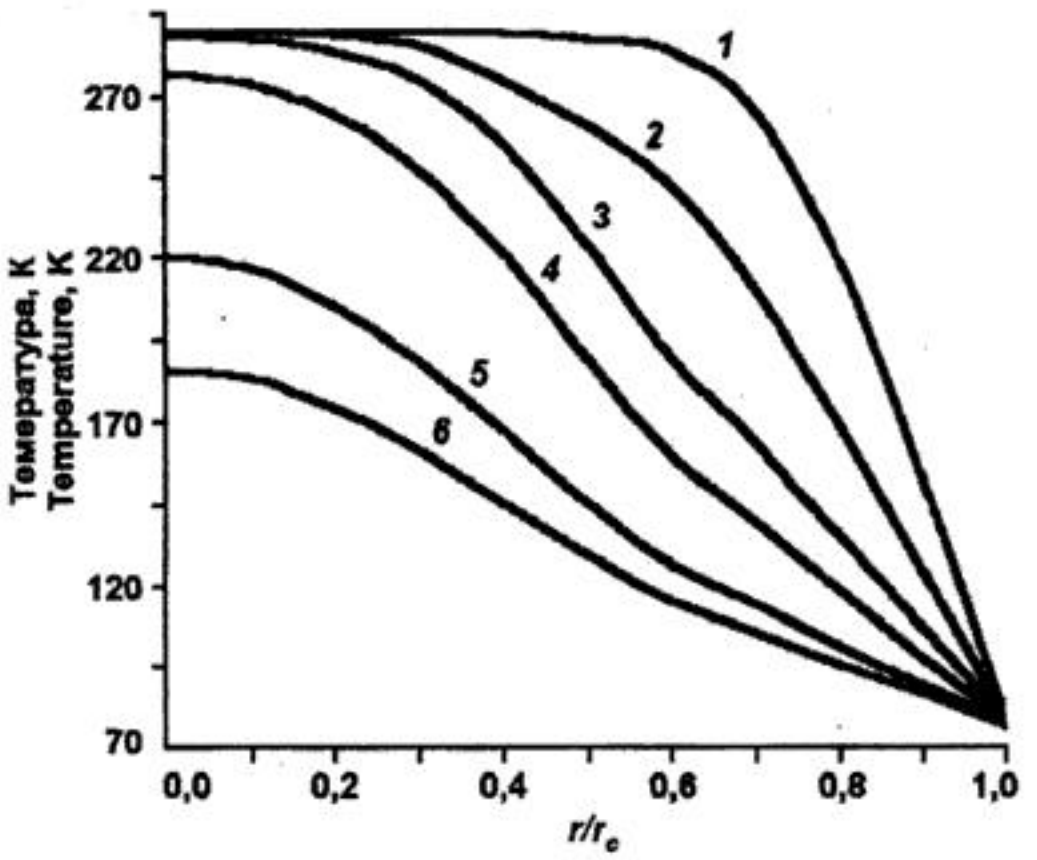



**Рис. 2.** Изменение температуры в радиальном направлении в системе контейнер–спирт при различных значениях времени τ, с: *1* – 0,5; *2* – 1; *3* – 2; *4* – 3; *5* – 5; *6* – 6.

**Fig. 2**. Temperature measurement in radial direction in a container–alcohol system at various values of τ time, s: *1* – 0.5; *2* – 1; *3* – 2; *4* – 3; *5* – 5; *6* – 6.

ous values of τ time. Qualitative analysis of the curves (Fig. 1 and 2) shows, that at the beginning of a cooling process the most intensive temperature decrease occurs in the close to a wall an alcohol layer. After this the process of an alcohol intensive cooling is shifted to a central part of container. Certain quantitative characteristics of this process were shown in Fig. 3 and 4. In the Fig. 3 the curve *1* shows, how the maximum on a volume cooling rate of an alcohol $\max\limits_{(r)}(-\partial T(r, \tau)/\partial\tau)$ is changed, and the curve *2* demonstrates how the maximum point $r_{max}$, where this maximum is achieved. Fig. 4 shows the change in an alcohol cooling rate $(-\partial T(r, \tau)/\partial\tau)$ in a radial direction at various values of τ time. Within the described temperature range the process of an alcohol cooling takes about 6 s. At τ ~ 3.4 s the rate of an alcohol cooling more or less is matched on its volume. Starting from τ = 0.5 s, this value is significantly ununiform on an alcohol volume.

Practically we are interested in an average cooling rate of bioobjects within a certain temperature range (in our case within 268 to 193 K). Fig. 1 shows that δτ time of an alcohol cooling within this range, as well as an average cooling rate $V_{av} = 60{\cdot}75\ \text{K}/\delta\tau$ in various points of an alcohol volume, are also different. The change $V_{av}(r)$ in a radical direction was shown in Fig.4, curve 1. It was found that the central part ($r \le 0.44r_m$) of an alcohol volume, i.e. 64% of its total volume was cooled within the rate of 1700 ÷ 2100 degrees/min, its close to the container wall part ($0.5 \le r/r_m \le 0.55$), i.e. 17% of a total volume was cooled within an average rate of 2500 ÷ 3000 degrees/min, and an average part of an alcohol volume ($0.44 \le r/r_m \le 0.5$), i.e. 19% of a total volume cooled with an average rate of 2100 ÷ 2500 degrres/min.



Матеріал, захищений авторським правом

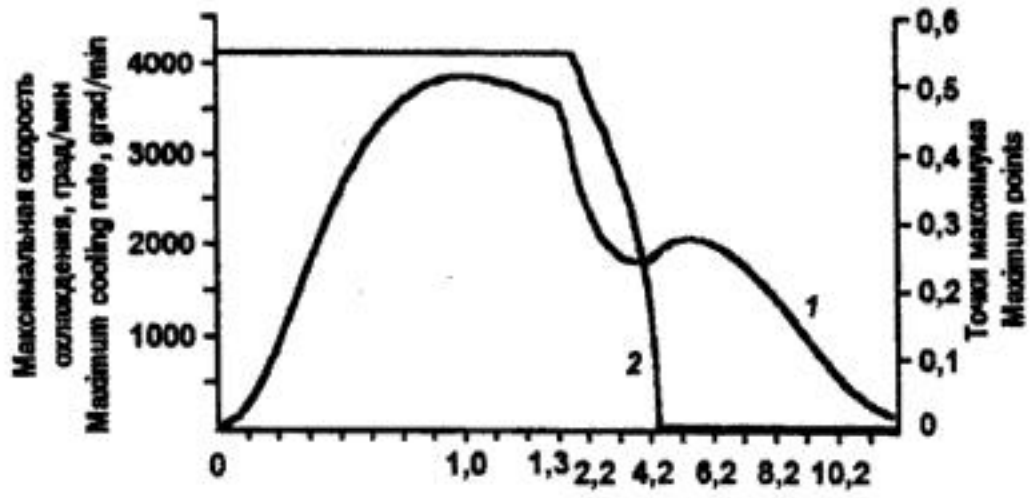



**Рис. 3.** Динамика смещения максимальной скорости охлаждения спирта: *1* — максимальная (в радиальном направлении) скорость охлаждения спирта $\max\limits_{(r)}(-\partial T/\partial\tau)$; *2* — координаты $r_{\max}/r_c$, где указанный выше максимум достигается.

**Fig. 3**. Dynamics of a shift of maximum cooling rate of alcohol: *1* — maximum (in radial diracrion) cooling rate of alcohol $\max\limits_{(r)}(-\partial T/\partial\tau)$; *2* — a coordinate of $r_{\max}/r_c$, where this maximum is achieved.

Изменение $V_{\text{ср}}(r)$ в радикальном направлении показано на рис. 4 кривой *1*. Оказалось, что центральная часть ($r \le 0{,}44 r_m$) объема спирта, т.е. 64% всего его объема охлаждается со скоростью 1700 ÷ 2100 град/мин; его пристенная к контейнеру часть ($0{,}5 \le r/r_m \le 0{,}55$), т.е. 17% всего объема — со средней скоростью 2500 ÷ 3000 град/мин, а остальная, средняя часть объема спирта ($0{,}44 \le r/r_m \le 0{,}5$), т.е. 19% всего объема — со средней скоростью 2100 ÷ 2500 град/мин.

Интересно отметить, что скорость_снижения средней по объему спирта температуры $T_m$ и $T_{0,4}$ от 268 до 193 К составляет ~1650 град/мин, а экспериментальных значений температуры $T_t(\tau)$ — 1400 град/мин, что меньше от минимального значения $V_{\text{ср}}$ в первом случае примерно на 3%, а во втором — на 18%.

Рис. 5 иллюстрирует корректность выбора краевого условия (6) при моделировании теплообмена контейнера с окружающей средой — азотом. Это условие является предельным случаем более общего, так называемого краевого условия третьего рода, учитывающего конвективный теплообмен. Нами рассмотрен также второй возможный предельный случай — краевое условие второго рода, когда вместо условия (6) задается при $r = r_c$ зависимость теплового потока $W$ от разности температур поверхности контейнера $T(r_c, \tau)$ и жидкого азота $T_N$ при различных режимах кипения азота [12, рис. 4.4]. Полученная при этом краевом условии зависимость $T(0, \tau)$ показана на рис. 5 кривой *2*. Она существенно отличается от кривой *1* — решения задачи (3)–(6), а значит и от экспериментальных данных. Там же кривой *3* представлена зависимость $T(0, \tau)$, полученная без учета зависимости коэффициентов $c$, $\rho$, $\lambda$ в (3) от изменения температуры. Оказалось, что пренебрежение изменяемостью этих коэффициентов на значительном интервале изменения температуры приводит к существенным погрешностям, в частности, к почти двукратному снижению средней скорости охлаждения спирта $V_{\text{ср}}$ в окрестности оси симметрии контейнера.

Изложенные выше результаты позволяют сделать следующие выводы. Расчетная средняя скорость охлаждения $V_{\text{ср}}$ (в рассматриваемом интервале температур) жидкости в цилиндрическом контейнере при быстром погружении его в жидкий

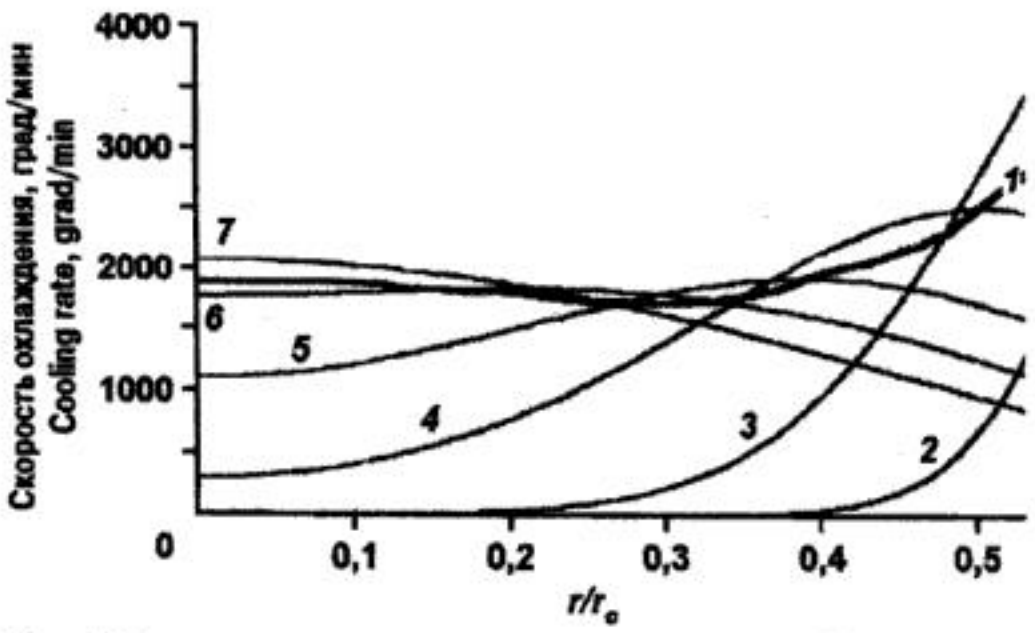



**Рис. 4.** Изменение скорости охлаждения спирта ($-\partial T/\partial\tau$) в радиальном направлении при различных значениях времени $\tau$: *1* — $V_{\text{ср}}(r)$ — средняя скорость охлаждения спирта в различных точках его объема; *2* — $\tau = 0{,}5$ с; *3* — $\tau = 1$ с; *4* — $\tau = 2$ с; *5* — $\tau = 3$ с; *6* — $\tau = 4$ с; *7* — $\tau = 5{,}4$ с.

**Fig. 4.** The change of cooling rate of alcohol ($-\partial T/\partial\tau$) in a radical direction at different values of time $\tau$: *1* — $V_{\text{ср}}(r)$ — an average cooling rate of alcohol in the different points of its volume; *2* — $\tau = 0.5$ s; *3* — $\tau = 1$ s; *4* — $\tau = 2$ s; *5* — $\tau = 3$ s; *6* — $\tau = 4$ s; *7* — $\tau = 5.4$ s.

It would be interesting to note that the rate of the temperature decrease on an alcohol volume $\overline{T}_m$ and $T_{0,4}$ from 268 down to 193 K makes ~1650 degrees/min, and of experimental values of the temperature $T_t(\tau)$ it is 1400 degrees/min, that is less than the minimum $V_{\text{av}}$ value in the first case by about 3%, and in the second one this value is less by 18%.

Fig. 5 illustrates the correctness of the selection of a boundary condition (6) when modeling a heat exchange in a container with an environment, that is liquid nitrogen. This condition is a limiting case of general, so-called boundary condition of the third type, taking into consideration a convective heat exchange. We also considered the second possible boundary case, a boundary condition of the second type, when instead of the condition (6) at $r = r_c$ the dependence of a heat flow $W$ on the temperature difference on a container surface $T(r_c, \tau)$ and liquid nitrogen $T_N$ at various regimens of a nitrogen melting [12, Fig. 4.4]. The dependence $T(0, \tau)$ obtained at this boundary condition was demonstrated in Fig. 5 curve *2*. It significantly differs on the curve *1*, which is the problem solution (3)–(6), and thus also on experimental data. At the same place the dependence $T(0, \tau)$, obtained without considering the dependence of $c$, $\rho$, $\lambda$ coefficients in (3) on a temperature change has been presented by a curve *3*. As it has been found, neglecting the change rate of these coefficients with a considerable interval of a temperature change results in significant errors, in particular, in practically twice decrease of an average rate of an alcohol cooling $V_{\text{av}}$ in the vicinity of a symmetry axis of a container.

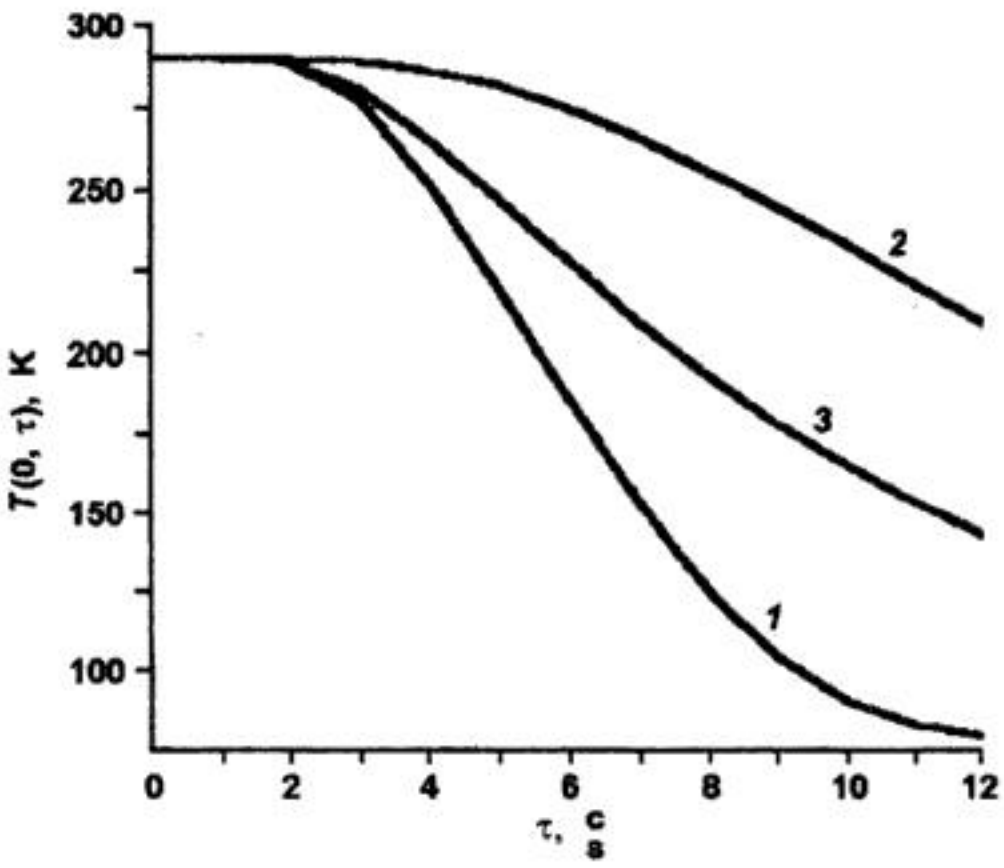
Presented above results allow to conclude, that counting an average rate of a liquid cooling $V_{\text{av}}$ (within the given temperature interval) in cylindrical container during its rapid immerging into liquid nitrogen is minimum and practically the same for bigger (central) part of volume. Experimental value of an average cooling rate is close to the minimum value (on a liquid volume) of



Матеріал, захищений авторським правом

**Рис. 5.** Изменение во времени температуры спирта $T(0, \tau)$ в окрестности оси симметрии контейнера: *1* – решение задачи (3)–(6); *2* – решение задачи (1)–(5) при условии, что на внешней поверхности контейнера задан тепловой поток; *3* – решение задачи (1)–(6) без учета зависимости от температуры теплофизических характеристик системы контейнер–спирт.

**Fig. 5**. The change of an alcohol temperature within the time $T(0, \tau)$ at a symmetry axis of container: *1* – the solution of a task (3)–(6); *2* – the solution of a task (1)–(5) at the condition that the heat flow is given on the outer surface of a container; *3* – the solution of a task (1)–(6) when the dependence of thermophysical properties of the container–alcohol system on temperature is not consedering.




азот минимальна и примерно одинакова для большей (центральной) части объема жидкости. Эта скорость резко (почти в 1,5 раза) возрастает у пристенной к контейнеру части объема. Экспериментальное значение средней скорости охлаждения близко к минимальному (по объему жидкости) значению средней скорости ее охлаждения $V_{ср}$. Отсюда, в частности, следует, что возможен подбор толщины цилиндрического контейнера для получения режима быстрого замораживания биообъекта с достаточно малым разбросом средних скоростей его охлаждения. Так, проведенный нами дополнительный расчет показал, что при $r_m = 0{,}4r_c$ средние скорости охлаждения $V_{ср}(0)$ и $V_{ср}(r_m)$ (в рассматриваемом интервале температур) соответственно равны 2130 и 2367 град/мин, т.е. разность между ними составляет ~11% вместо 60% при $r_m = 0{,}55r_c$.

an average rate of its cooling $V_{av}$. This testifies, that the possibility to select the thickness of cylindrical container for the obtaining of a rapid freezing regimen of a bioobject with quite spread average rates of its cooling. Thus, the carried out by us additional calculation demostrated, that at $r_m = 0.4r_c$ the average rates of cooling $V_{av}(0)$ and $V_{av}(r_m)$ (in the considered interval of temperatures) was correspondingly equal to 2130 and 2367 degrees/min, i.e. the differency between them made ~11%, instead of 60% at $r_m = 0.55r_c$

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Варгафтик Н. Б.* Справочник по теплофизическим свойствам газов и жидкостей.– М.: Наука, 1972.– 720 с.
2. *Варгафтик Н. Б., Филиппов Л. П., Тарзиманов А. А., Тоцкий Е.Е.* Теплопроводность жидкостей и газов.– М.: Изд-во стандартов, 1978.– 470 с.
3. *Грищенко В. И., Дунаевская А. В., Калугин Ю. В.* Влияние быстрых и сверхбыстрых скоростей замораживания на сохранность спермиев человека // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 52–57.
4. *Дунаевская А. В., Крамар М. И.* Изменение состояния нуклеарного хроматина спермиев человека в процессе криоконсервации // Медицина сегодня и завтра.– 2000.– № 3.– С. 13–15.
5. *Калиткин Н. Н.* Численные методы.– М.: Наука, 1978.– 512 с.
6. *Линевег Ф.* Измерение температур в технике.– М.: Металлургия, 1980.– 543 с.
7. *Перри Дж.* Справочник инженера-химика. Т. 1.– М.: Химия, 1969.– 639 с.
8. *Самарский А. А.* Однородные разностные схемы для нелинейных уровнений параболического типа // ЖВМ и МФ.– 1962.– 2, № 1.– С. 25–56.
9. *Самарский А. А.* Введение в теорию разностных схем.– М.: Наука, 1971.– 552 с.
10. *Сочава И. В., Трапезникова О. Н.* Теплоемкость цепных структур при низких температурах // ДАН СССР.– 1957.– 113, № 14.– С. 784–786.
11. *Справочник* по физической химии полимеров. Т. 2.– Киев: Наук. думка, 1984.– 330 с.
12. *Теплопередача* при низких температурах / Под ред. У. Фроста.– М.: Мир, 1977.– 391 с.
13. *Шейндлин А. Е., Шлейфер С. Г.* Экспериментальное определение теплоемкости $c_p$ этилового спирта при давлении до 118 атм и температуре от –57,22 до +252,23 °С // ЖТФ.– 1953.– 23, Вып. 8.– С. 1411–1426.
14. *Шифрина В. С., Самосатский Н. Н.* Полиэтилен.– М.: Химия, 1961.– 320 с.
15. *Ярышев Н. А.* Теоретические основы измерения нестационарной температуры.– Л.: Энергоатомиздат, 1990.– 254 с.


Поступила 4.12.2001

## REFERENCES


1. *Vargaftik N. B.* Manual on heat-physical properties of gases and liquids.– M: Nauka, 1972.– 720 p.
2. *Vargaftik N. B., Filippov L. P., Tarzimanov A. A., Totsky E. E.* Heat-conductivity of liquids and gases.– M: Publishing house of standards, 1978.– 470 p.
3. *Grischenko V. I., Dunayevskaya A. V., Kalugin Yu. V.* Effect of rapid and ultrarapid freezing rates on the integrity of human spermatozoa // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 2.– P. 52–57.
4. *Dunayevskaya A. V., Kramar M. I.* The change in the state of nuclear chromatin of human spermatozoa in cryopreservation process // Medicine today and tomorrow.– 2000.– № 3.– P. 3–15.
5. *Kalitkin N. N.* Numeric methods.– M: Nauka, 1978.– 512 p.
6. *Lineveg F.* Measurement of temperatures in technique.– M: Metallurgy, 1980.– 543 p.
7. *Perry J.* Manual of engineer-chemist. V. 1.– M: Chemistry, 1969.– 639 p.
8. *Samarsky A. A.* Introduction into the theory of difference schemes.– M: Nauka.– 1971.– 552 p.
9. *Samarsky A. A.* Uniform difference schemes for non-linear equations of parabolic type // Zhurnal Vysshej Matematiki i Matfiziki.– 1962.– 2, № 1.– P. 25–56.
10. *Sochava I. V., Trapeznikova O.N.* Heat capacity of chain structures at low temperatures // DAN SSSR.– 1957.– 113, № 14.– P. 784–786.
11. *Manual* on physical chemistry of polymers. V. 2.– Kiev: Naukova Dumka, 1984.– 330 p.
12. *Heat* transfer at low temperatures / Ed. by W. Frost.– M: Mir, 1977.– 391 p.
13. *Sheindlin A. E., Shleifer S. G.* Experimental determination of C# heat capacity of ethyl alcohol under the pressure up to 118 atm and temperature from –57.22 to +252.23 °C // Zhurnal Tehnicheskoj Fiziki.– 1953.– 23, Issue 8.– P. 1411–1426.
14. *Shifrina V. S., Samosatsky N.N.* Polyethylene.– M: Chemistry, 1961.– 320 p.
15. *Yaryshev N. A.* Theoretical bases of measurement of non-stationary temperature.– L: Energoatomizdat.– 1990.– 254 p.


Accepted in 4.12.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.009.12-092.9: 612.015.11

UDC 616.009.12-092.9: 612.015.11

# Состояние системы антиоксидантной защиты у крыс с разным уровнем судорожной готовности после воздействия полиэтиленгликолей

Л. Д. ПОПОВА

*Харьковский государственный медицинский университет*

# State of Antioxidant System in Rats with Different Seizure Susceptibility after Polyethylene Glycols Effect

L. D. POPOVA

*Kharkov State Medical University*

Изучено влияние полиэтиленгликолей (ПЭГ) на состояние системы антиоксидантной защиты в крови крыс с разным уровнем судорожной готовности. У животных, затравленных ПЭГ Л-502, наблюдалось значительное повышение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) при одновременном падении активностей каталазы (КТ) и глутатионпероксидазы (ГП), снижении содержания глутатиона восстановленного (GSH), церулоплазмина (ЦП) и гаптоглобина. Влияние Л-502 на концентрацию гаптоглобина и активность глутатионпероксидазы было более выраженным у крыс с высоким уровнем судорожной готовности, что, очевидно, является следствием повышенной генерации активных форм кислорода и напряжения системы антиоксидантной защиты у этих животных.

Вивчено вплив поліетиленгліколей (ПЕГ) на стан системи антиоксидантного захисту у крові щурів з різним рівнем судомної готовності. У тварин, токсикованих ПЕГ Л-502, спостерігалось значне зростання продуктів перекисного окислення ліпідів: дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду з одночасним падінням активностей каталази та глутатіонпероксидази, зниженням вмісту глутатіону оновленого, церулоплазміну та гаптоглобіну. Вплив Л-502 на концентрацію гаптоглобіну та активність глутатіонпероксидази був більш виразним у щурів з високим рівнем судорожної готовності, що, вірогідно, є наслідком підвищеної генерації активних форм кисню та напруження системи антиоксидантного захисту у цих тварин.

Polyethylene glycols (PEG) effect on the state of antioxidant system in rats with different seizure susceptibility was studied. After exposure to PEG L-502 the considerable increase in levels of lipid peroxidation products (LPO) (conjugated diens (CD) and malonic dialdehyde (MDA) together with decreased catalase (CT) and glutathione peroxidase (GP) activities, diminished glutathione reduced (GSH), ceruloplasmin and haptoglobin levels were observed. The influence of L-502 on haptoglobin concentration and glutathione peroxidase activity was more expressed in rats with a high seizure susceptibility evidently in result of increased generation of reactive oxygen forms and antioxidant system stress in these animals.

Полиэтиленгликоли являются липофильными веществами. Их превращение в организме катализируется монооксигеназной системой (МОС) микросомального окисления. Известно, что важное место в процессах метаболизма чужеродных соединений занимает МОС гепатоцитов, которая осуществляет детоксикацию ксенобиотиков путем последовательного ряда окислительных реакций [8]. Нами было показано [10], что ПЭГ вызывают активацию МОС в гепатоцитах крыс, что выражалось в повышении НАД(Ф)Н-цитохром с-редуктазной активности и возрастании содержания цитохрома Р450. МОС является важнейшим источником образования активных форм кислорода (АФК), поэтому ее активация приводит к усилению свободнорадикальных процессов и, как следствие, ПОЛ. Следует отметить, что активацию МОС вызывают не только исходные вещества, но и продукты их деструкции, в частности этанол, метанол и др. Из трех основных ферментных систем, окисляющих этанол в печени, — алкогольдегидрогеназы, каталазы и микросомальной этанолокисляющей системы — последняя наиболее важный источник образования свободных радикалов. Индуцированный этанолом цитохром Р450 2Е1 явля-

Polyethylene glycols (PEG) are lipophil substances. Their transformation in an organism is catalised by monooxygenase system (MOS) of microsomal oxidation. It is of common knowledge, that MOS of hepatocytes, performing xenobiotics detoxication via successive series of oxidative reactions [8], takes the important place in heterologous compounds metabolism processes. We demonstrated [10], that PEG caused the MOS activation in rat's hepatocytes, that was manifested in an increase in NAD(P)H-cytochrome C-reductase activity and the augmentation of cytochrome P450 content. MOS is the important source of the formation of reactive oxygen species (ROS), therefore its activity results in a strengthening of free-radical processes and LPO, consequently. It should be noted, that MOS activation is caused not only by initial substances, but by the products of their destruction as well, in particular ethanol, methanol etc. Among three main enzyme systems, oxidising ethanol in liver: alcohol dehydrogenase, catalase and microsomal ethanol-oxidising system, the latter is the most important source of free-radical creation. Cytochrome P450 2El induced by ethanol is the main in ethanol oxidation in liver microsomes. In addition it was re-



Матеріал, захищений авторським правом

ется основным в окислении этанола в микросомах печени. К тому же обнаружено, что, по сравнению с другими формами, он генерирует наибольшее количество таких АФК, как супероксидный анион, перекись водорода, а также 1-гидроксильный радикал [15].

Помимо того, что ПЭГ нашли широкое применение в различных отраслях промышленности, они используются в медицине как пролонгаторы лекарственных веществ, консерванты трансплантатов мозговой ткани, крови, жидких сред глаза и т.д.

Учитывая полученные нами данные, свидетельствующие о повышенном образовании АФК – инициаторов свободнорадикальных процессов – у крыс с высокой судорожной готовностью [11], можно предположить, что система антиоксидантной защиты животных с низкой (Н) и высокой (В) возбудимостью будет по-разному реагировать на введение ксенобиотиков. В связи с этим целью работы было изучение состояния системы антиоксидантной защиты у крыс с разным уровнем судорожной готовности после воздействия ПЭГ. Были исследованы следующие параметры крови: содержание ДК, МДА, GSH, ЦП, гаптоглобина, активность ГП и КТ.

Работа выполнена на крысах линии Вистар, тестированных по чувствительности к аудиогенному раздражителю [2]. Использовали звуковой раздражитель (звонок) силой 96 дБ. Время действия звука – 120 с. Из общей популяции крыс были отобраны 2 группы: с Н и В судорожной готовностью. Животных брали в эксперимент через 2 недели после тестирования.

Ежедневно (30 сут) с помощью зонда вводили ПЭГ Л-502 в дозе 1/100 $ДЛ_{50}$. Использовали химически чистый образец ПЭГ Л-502, синтезированный и предоставленный НИИ и НПО "Синтез ПАВ" (г. Шебекино, Российская Федерация).

Определение ДК проводили на основании их способности поглощать в ультрафиолетовой области спектра (при 233 нм). Предварительно ДК очищали экстракцией гептано-изопропаноловой смесью [4]. В основе метода определения МДА лежит реакция между МДА и тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре и в кислой среде протекает с образованием окрашенного комплекса, имеющего максимум поглощения при длине волны 532 нм [16]. Определение GSH основано на способности дитионитробензойной кислоты взаимодействовать с соединениями, содержащими SH-группы. Один из продуктов этой реакции дает желтую окраску, интенсивность которой измеряется спектрофотометрически при длине волны 412 нм [7]. Активность ГП устанавливали по убыли GSH [7]. Об активности каталазы судили по расщеплению перекиси водорода [3]. Гаптоглобин и ЦП рассчитывали унифицированными биохимическими методами [6, 9]. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента–Фишера [5].

vealed, that in comparison with other forms, it generated the greatest number of AOF, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, as well as 1-hydroxyl radical [15].

At the same time PEG gained a wide application in different industrial fields, they are used in medicine as prolongators of medicinal substances, preservatives of brain tissue transplants, blood, eye liquid media etc.

Taking into consideration the obtained by us data, testifying to an increased formation of ROS (the initiators of free-radical processes) in rats with a high seizure susceptibility [11], we can suppose, that the system of antioxidant protection in animals with low (L) and high (H) excitability will differently respond to xenobiotics introduction. In this connection the aim of this work was to study the state of antioxidant protective system in rats with different seizure susceptibility after PEG effect. The following blood parameters were investigated: content of CD, MDA, GSH, CP, haptoglobin, GP and CT activity.

The work was performed in Wistar line rats, tested by the sensibility to an audiogenic irritant [2]. Sound irritant (bell) of 96 dB intensity was used. Sound effect duration was 120 s. We selected 2 groups from total population of rats: with L and H seizure susceptibility. Animals were involved in the experiment in 2 weeks after testing. PEG L-502 in 1/100 $DL_{50}$ dose was daily (within 30 days) introduced using a probe. We used chemically pure sample of PEG L-502, synthesised and offered by R&D Institute and Scientific and Production Unit "Sintez PAV" (Shebekino city, Russian Federation).

CD determination was accomplished basing on their possibility to absorb within spectrum ultraviolet area (at 233 nm). CD was preliminarily purified by means of the extraction of heptane-isopropanol mixture [4]. The base of the MDA determination method is the reaction between MDA and thiobarbituric acid, which under high temperature and acid medium proceeds with the stained complex formation, having the maximum of sorption at 532 nm wavelength [16]. GSH determination is based on the capability of dithionitrobenzoic acid to interact with the compounds, containing SH-groups. One of the products of this reaction gives yellow staining, which intensity is spectrophotometrically measured at the wavelength of 412 nm [7]. GP activity was established by GSH diminution [7]. One judged about catalase activity by hydrogen peroxide disintegration [3]. Haptoglobin and CP were counted by means of unified biochemical methods [6, 9]. Statistical processing was done using the Student–Fisher's method [5].

During the experiment no differences in primary (CD) and secondary (MDA) LPO products in rats' blood serum with low and high seizure susceptibility were revealed (Figure).

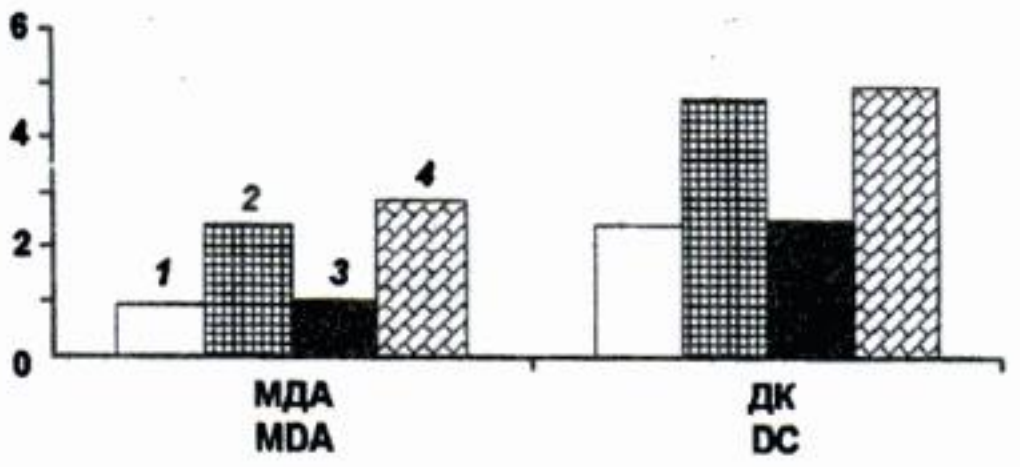
The majority of studied components of antioxidant system in rats of L and H groups did not differ as well. Haptoglobin and CT made the exclusion (Table).



Матеріал, захищений авторським правом

В ходе эксперимента не было обнаружено различий в накоплении первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов ПОЛ в сыворотке крови крыс с низкой и высокой судорожной готовностью (рисунок). Большинство исследованных компонентов антиоксидантной системы у крыс групп Н и В также не отличались. Исключение составляли гаптоглобин и КТ (таблица). Тем не менее, нами было обнаружено [11], что, несмотря на отсутствие различий в уровне спонтанной хемилюминесценции сыворотки крови между группами, спонтанная и люминолзависимая хемилюминесценция в головном мозге животных с В судорожной готовностью значительно выше по сравнению с группой Н, что свидетельствует о повышенном образовании АФК в головном мозге этой группы животных [4]. Возможность усиленного образования свободных радикалов в головном мозге крыс с высокой возбудимостью подтверждается результатами повышенного содержания хинолиновой кислоты в некоторых регионах мозга этих животных [12], а также данными о возрастании в 30 раз концентрации гидроксильного радикала в условиях инфузии хинолиновой кислоты в стриатум [20]. Однако накопления продуктов ПОЛ у крыс группы В не выявлено, так как, очевидно, происходит быстрая элиминация радикалов-инициаторов, главным образом, за счет компонентов неферментативной антиоксидантной системы, в частности токоферола [11].

Помимо антиоксидантной защиты токоферолом, возможным механизмом поддержания стабильности синаптосомальных мембран у крыс с высокой судорожной готовностью является возрастание скорости обновления фосфолипидных фракций. Хотя головной мозг способен синтезировать все фракции фосфолипидов, процесс синтеза зависит от поступления эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и линоленовой). Эти жирные кислоты служат исходным материалом для синтеза других полиненасыщенных жирных кислот, в том числе арахидоновой. Десатурация жирных кислот происходит в эндоплазматическом ретикулуме, наиболее интен-




Влияние ПЭГ Л-502 (1/100 $ДЛ_{50}$) на содержание (нмоль/ мл) МДА и ДК в крови крыс с Н и В судорожной готовностью: *1* – группа Н, контроль; *2* – группа Н, влияние Л-502; *3* – группа В, контроль; *4* – группа В, влияние Л-502.

Effect of PEG L-502 (1/100 $DL_{50}$) on MDA and CD content (nM/ml) in rat's blood with L and H seizure susceptibility: *1* – group L, the control; *2* – group L, L-502 effect; *3* – group H, the control; *4* – group H, L-502 effect

Nevertheless we have found [11], that in spite of the absence of differences in the level of blood serum spontaneous chemiluminescence between the groups, the spontaneous and luminol-dependent chemiluminescence in the brain of animals with H seizure susceptibility is considerably higher in comparison with the group H, that testifies to an increased ROS formation in brain of this group of animals. The possibility of an intensive formation of free radicals in rat's brain with a high irritability is confirmed by the results of an increased content of quinoline acid in some brain region of these animals [12], as well as by the data about the augmentation in 30 times of hydroxyl radical concentration under conditions of quinoline acid infusion in striatum [20]. However no accumulation of LPO products in rats of the group H was revealed, since a rapid elimination of radicals-initiators obviously occurred mainly due to the components of non-enzyme antioxidant system, tocopherol in particular [11].

Besides of antioxidant protection by tocopherol, an increase in renewal rate of phospholipid fractions is a possible mechanism of maintenance of synaptosomal membrane stability in rats with high seizure susceptibility. Although the brain is capable to synthesise

**PEG L-502 (1/100 $DL_{50}$) effect on the state of blood antioxidant system in rats with L and H seizure susceptibility ($M \pm m$)**

| Indices | Control group | | Experimental group | |
|---|---|---|---|---|
| | L | H | L | H |
| GSH, mg% | 4.82 ± 0.42 | 6.20 ± 0.81 | 3.60 ± 0.25• | 3.22 ± 0.33• |
| GP, mM GSH/min per 1 l of erythrocyte mass | 58.4 ± 2.3 | 62.5 ± 3.2 | 48.4 ± 1.1••• | **43.2 ± 0.7••• |
| CT, catalase number | 5.21 ± 0.30 | 7.42 ± 0.28** | 4.10 ± 0.16• | 3.50 ± 0.22••• |
| Haptoglobin, g/l | 1.83 ± 0.06 | 1.58 ± 0.04** | 1.22 ± 0.08••• | *0.97 ± 0.06••• |
| CP, mg/l | 90.8 ± 3.2 | 96.7 ± 5.8 | 56.3 ± 4.4••• | 57.5 ± 4.1••• |

**Notes**: ** — $P < 0.01$ — statistical significance of differences between the groups L and H; • — $P < 0.05$, ••• — $P < 0.001$ — statistical significance of differences between the control and experimental groups.

**Влияние ПЭГ Л-502 (1/100 $ДЛ_{50}$) на состояние антиоксидантной системы крови у крыс с Н и В судорожной готовностью ($M \pm m$)**

| Показатели | Контрольная группа | | Опытная группа | |
|---|---|---|---|---|
| | Н | В | Н | В |
| GSH, мг% | 4,82 ± 0,42 | 6,20 ± 0,81 | 3,60 ± 0,25• | 3,22 ± 0,33• |
| ГП, ммоль GSH/мин на 1 л эритроцитарной массы | 58,4 ± 2,3 | 62,5 ± 3,2 | 48,4 ± 1,1••• | **43,2 ± 0,7••• |
| КТ, кат.число | 5,21 ± 0,30 | 7,42 ± 0,28** | 4,10 ± 0,16• | 3,50 ± 0,22••• |
| Гаптоглобин, г/л | 1,83 ± 0,06 | 1,58 ± 0,04** | 1,22 ± 0,08••• | *0,97 ± 0,06••• |
| ЦП, мг/л | 90,8 ± 3,2 | 96,7 ± 5,8 | 56,3 ± 4,4••• | 57,5 ± 4,1••• |

**Примечания.** ** — $P < 0,01$ — достоверность различий между группами Н и В; • — $P < 0,05$, ••• — $P < 0,001$ — достоверность различий между контрольной и опытной группами.



Матеріал, захищений авторським правом

сивно процесс микросомального окисления протекает в печени. Учитывая то, что эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты в любом случае должны быть доставлены в головной мозг липопротеинами крови в составе фосфолипидов, можно предположить, что транспортироваться будут не исходные, а необходимые полиненасыщенные жирные кислоты, которые образуются в микросомах печени. Это подтверждается данными о повышенном содержании цитохрома $b_5$ в печени крыс с высокой возбудимостью [13]. Таким образом, источником образования АФК в экстрацеребральных тканях, в частности в печени, является усиление МОС гепатоцитов, о чем свидетельствует накопление МДА в печени высоковозбудимых крыс (0,64 ± 0,06 нмоль/мг белка — группа Н; 0,96 ± 0,08 нмоль/мг белка — группа В).

Повышение активности КТ крови у этих животных следует рассматривать как компенсаторную реакцию в ответ на усиление свободнорадикальных процессов [17].

Как известно, главной функцией гаптоглобина является связывание гемоглобина, который поступает в плазму крови при внутрисосудистом распаде эритроцитов [18], тем самым предотвращая его фильтрацию через почки. Однако в данном случае снижение гаптоглобина невозможно объяснить повышенным гемолизом эритроцитов, так как концентрация гемоглобина у высоковозбудимых крыс остается без изменений. Более вероятно предположение о снижении синтеза гаптоглобина в печени вследствие повреждающего действия вторичных продуктов ПОЛ.

Полиэтиленгликоль Л-502 приводил к существенному повышению накопления ДК (в 2 раза) и МДА (в 2,5–2,8 раз) у животных как с Н, так и с В судорожной готовностью (рисунок). Это сопровождалось снижением всех исследованных компонентов системы антиоксидантной защиты организма: активности КТ, расщепляющей перекись водорода, системы ГП–GSH, играющей важную роль в обезвреживании перекиси водорода и липоперекисей, содержания гаптоглобина и ЦП. Считают, что ЦП выполняет роль универсального "чистильщика" свободных радикалов. Это связано с несколькими причинами. Во-первых, благодаря оксидазной активности он регулирует уровень биогенных аминов и аскорбиновой кислоты [1]. Во-вторых, ЦП обладает феррооксидазной активностью, в результате чего тормозит свободнорадикальные процессы. В-третьих, с помощью ионов меди ЦП обезвреживает супероксидный анион, восстанавливая его до кислорода и воды [19].

Снижение всех перечисленных показателей у животных, затравленных Л-502, свидетельствует об истощении системы антиоксидантной защиты. Резкое падение гаптоглобина в крови является следствием как снижения биосинтетической функции печени, так и усиленного гемолиза эритроцитов [14]. Более существенное уменьшение концентрации

all fractions of phospholipids, the process of synthesis depends on entering the essential polyunsaturated fat acids (linolic and linolenic). These fat acids serve as an initial material to synthesise other polyunsaturated fat acids, including arachidonic one. Desaturation of fat acids occurs in endoplasmatic reticulum, the most intensively the process of microsomal oxidation proceeds in liver. Taking into consideration the fact, that essential polyunsaturated fat acids should be delivered anyway to the brain by blood lipoproteins in phospholipid composition, we can suppose, that essential polyunsaturated fat acids, formed in liver micorsomes, but not initial ones, will be transported. This is confirmed by the data about an increased cytochrome $b_5$ content in rat's liver with a high irritability [13]. Thus, the strengthening of hepatocyte MOS is a source of ROS formation in extracerebral tissues, in liver in particular, that is testified by MDA accumulation in liver of highly irritated rats (0.64 ± 0.6 nM/mg of protein — group L; 0.96 ± 0.08 nM/mg of protein — group H).

Increase in CT activity of blood in these animals should be considered as a compensatory reaction in response to the strengthening of free-radical processes [17].

As it is known, the main function of haptoglobin is the haemoglobin binding, which comes into blood plasm at an intravascular decay of erythrocytes [18], preventing by this its filtration through kidneys. However, in this case the haptoglobin decrease is impossible to explain by an increased erythrocyte hemolysis, since haemoglobin concentration in highly irritated rats remains without changes. The supposition about a decrease in haptoglobin synthesis in liver as a result of a damaging effect of LPO secondary products seems more probable.

Polyethylene glycol L-502 resulted in a considerable augmentation of CD accumulation (in 2 times) and MDA (in 2.5–2.8 times) in animals both with L and H seizure susceptibility (Figure). This was accompanied by a decrease in all studied components of an organism's antioxidant protection system: CT activity, disintegrating hydrogen peroxide, GP-GSH system, playing an important role in the neutralisation of hydrogen peroxide and lipoperoxides, haptoglobin and CP content. It is believed, that CP accomplishes the role of universal "scavenger" of free radicals. This is related to some reasons. Firstly, due to an oxidase activity it regulates the level of biogenic amines and ascorbic acid. Secondly, CP possesses a ferrooxidase activity, in result of that inhibits free-radical processes. Thirdly, by means of copper ions the CP neutralises a superoxide anion, reducing it down to oxygen and water [19].

The decrease of all mentioned indices in animals, injected with L-502, testifies to the system exhausting of antioxidant protection. A sharp fall of haptoglobin in blood is a result of both decrease in biosynthetic function of liver and strengthened erythrocyte



Матеріал, захищений авторським правом

гаптоглобина и активности ГП у крыс с высокой судорожной готовностью, очевидно, является результатом повышенной генерации АФК и напряжения системы антиоксидантной защиты у этих животных.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Абрамова Ж. И., Оксенгендлер Г. И.* Человек и противоокислительные вещества.– Л.: Наука, 1985.– 230 с.
2. *Захария Б. А.* Предрасположенность организма к эпилептическим припадкам.– Киев: Здоров'я, 1974.– 200 с.
3. *Королюк М. А., Иванов Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– № 1.– С. 16–18.
4. *Косухин А. Б., Ахметова Б. С.* Экстракция липидов смесью гептан-изопропанол для определения диеновых конъюгатов // Лаб. дело.– 1987.– № 5.– С. 335–337.
5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1980.– 293 с.
6. *Мешкова М. П., Северин С. Е.* Практикум по биохимии.– М.: МГУ, 1979.– 428 с.
7. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.– 1986.– № 12.– С. 724–727.
8. *Падалко В. И.* Влияние длительного введения тироксина на микросомальное окисление в печени крыс разного возраста // Биол. вестник.– 1997.– 1, № 1.– С. 40–46.
9. *Подильчак М. Д.* Клиническая энзимология.– Киев: Здоров'я, 1967.– 286 с.
10. *Попова Л. Д.* Влияние простых полиэфиров на состояние микросомальной окислительной системы печени крыс // Материалы научно-техн. конф. "Экология и здоровье человека. Охрана водного и воздушного бассейнов. Утилизация отходов".– Харьков, 2001.– Т. 1.– С. 106–109.
11. *Попова Л. Д.* Перекисное окисление липидов в головном мозге крыс с разным уровнем судорожной готовности // Биол. вестник.– 1998.– 2, № 1.– С. 46–49.
12. *Попова Л. Д., Стеценко С. А., Павиченко Ю. В.* Содержание хинолиновой кислоты и ее предшественников в головном мозге крыс с разной судорожной готовностью // Эксперим. и клин. мед.– 1998.– № 1.– С. 148–150.
13. *Попова Л. Д.* Влияние полиэтиленгликолей на микросомальную систему гепатоцитов у крыс с разным уровнем судорожной готовности // Експерим. та клін. мед.– 2001.– № 4.– С. 14–17.
14. *Попова Л. Д.* Влияние диолов на антиоксидантную систему эритроцитов // Гигиена населенных мест: Сб. науч. тр.– Киев, 2000.– № 37.– С. 117–120.
15. *Пронько П. С., Кузьмич А. Б., Абакумов Г. З.* Влияние алкогольной интоксикации и ингибиторов альдегиддегидрогеназы на пероксидное окисление липидов в печени крыс // Укр. біохім. журнал.– 1999.– 71, № 4.– С. 79–83.
16. *Сукоян Г. В., Андреадзе Н. А., Виразанашвили Н. А. и др.* Корреляционная взаимосвязь нарушений в системе транспорта электронов в митохондриях, активности энзиматической системы антиоксидантной защиты с клинико-гемодинамическими показателями при остром инфаркте миокарда после тромболизисной терапии // Вопр. биол. мед. и фарм. химии.– 2001.– № 2.– С. 34–40.
17. *Федорова Т. Н., Коршунова Т. С., Ларская Э. Г.* Реакция с тиобарбитуровой кислотой для определения МДА крови методом флуориметрии // Лаб. дело.– 1983.– № 3.– С. 25–28.
18. *Golstein J. M., Kaplan H. B., Edelson H. S.* Ceruloplasmin-a scavenger of superoxide anion radicals // J. Biol. Chem.– 1979.– 254, № 10.– P. 4040–4045.
19. *Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.* Harper's Biochemistry. Neu Jersey: Prentice Hall, 1996.– 868 p.
20. *Santamaria A., Jimenez-Capdeville M. E., Camacho A. et al.* In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum // Neuroreport.– 2001.– № 12.– P. 2693–2696.


Поступила 12.02.2002

hemolysis [14]. More considerable decrease in haptoglobin concentration and GP activity in rats with a high seizure susceptibility is evidently the result of an increased generation in ROS and the tension of antioxidant protection system in these animals.

## REFERENCES


1. *Abramova Zh. I., Oksengendler G.I.* Human being and antioxidant substances.– L.: Nauka, 1985.– 230 p.
2. *Zakhariya B. A.* Organism's predisposition to epileptic seizures.– Kiev: Zdorov'ya, 1974.– 200 p.
3. *Korolyuk M. A., Ivanov L. I., Majorova I. G., Tokarev V. E.* The method for catalase activity determination // Laboratornoe delo.– 1988.– № 1.– P. 16–18.
4. *Kosukhin A. B., Akhmetova B. S.* Lipid extraction by means of heptane-isopropanol mixture for conjugated diens determination // Laboratornoe delo.– 1987.– № 5.– P. 335–337.
5. *Lakin G. F.* Biometry.– M.: Vysshaya shkola, 1980.– 293 p.
6. *Meshkova M. P., Severin S. E.* Practical work on biochemistry.– M.: Moscow State University, 1979.– 428 p.
7. *Moin V. M.* Simple and specific method for glutathione peroxidase activity determination in erythrocytes // Laboratornoe delo.– 1986.– № 12.– P. 724–727.
8. *Padalko V. I.* Effect of a long-term thyroxin introduction on microsomal oxidation in rat's liver of different age // Biologicheskiy vestnik.– 1997.– 1, № 1.– P. 40–46.
9. *Podil'chak M. D.* Clinical enzymology.– Kiev: Zdorov'ya, 1967.– 286 p.
10. *Popova L. D.* Effect of simple polyethers to the state of rat's liver microsomal oxidative system // Materials of scientific and technical conference "Ecology and human health. Protection of aqueous and aerial basins. Utilisation of wastes".– Kharkov, 2001.– V. 1.– P. 106–109.
11. *Popova L. D.* Lipid peroxidation in rat's brain with different level of seizure susceptibility // Biologicheskij vestnik.– 1998.– 2, № 1.– P. 46–49.
12. *Popova L. D., Stetsenko S. A., Pavichenko Yu. V.* Content of quinoline acid and its precursors in rat's brain with different seizure susceptibility // Eksperimental'naya i klinicheskaya meditsina.– 1998.– № 1.– P. 148–150.
13. *Popova L. D.* Polyethylene glycols effect on hepatocyte microsomal system in rats with different seizure susceptibiltiy // Eksperymental'na ta klinychna medytsyna.– 2001.– № 4.– P. 14–17.
14. *Popova L. D.* Diol effect on erythrocyte antioxidant system // Hygiene of populated areas: Collection of scientific papers.– Kiev, 2000.– № 37.– P. 117–120.
15. *Pron'ko P. S., Kuz'mich A. B., Abakumov G. Z.* Effect of alcohol intoxication and aldehyde dehydrogenase inhibitors on lipid peroxidation in rat's liver // Ukrainskij biokhimichnyj zhurnal.– 1999.– 71, № 4.– P. 79–83.
16. *Fedorova T. N., Korshunova T. S., Larskaya E. G.* Reaction with thiobarbituric acid for blood MDA determination using the method of fluorimetry // Laboratornoe delo.– 1983.– № 3.– P. 25–28.
17. *Sukoyan G. V., Andreadze N. A., Virazanashvili N.A. et al.* Correlational interaction of disorders in electron transport system in mitochondria, enzymatic system activity of antioxidant protection with clinical and hemodynamical indices at an acute myocardial infarction after thrombolysis therapyn // Voprosy biologicheskoj meditsinskoj i farmatsevticheskoj khimii.– 2001.– № 2.– P. 34–40.
18. *Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.* Harper's Biochemistry.– New Jersey: Prentice Hall, 1996.– 868 p.
19. *Golstein J. M., Kaplan H. B., Edelson H. S.* Ceruloplasmin-a scavenger of superoxide anion radicals // J. Biol. Chem.– 1979.– 254.– № 10.– P. 4040–4045.
20. *Santamaria A., Jimenez-Capdeville M. E., Camacho A. et al.* In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum // Neuroreport.– 2001.– № 12.– P. 2693–2696.


Accepted in 12.02.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 612.111: 352.462

UDC 57.043: 612.111: 352.462

# Возрастные особенности устойчивости эритроцитов крыс к гипертоническому воздействию под влиянием хлорпромазина

Е. А. МАТВИЕНКО, Л. В. КОБА

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина*

Н. М. ШПАКОВА, В. А. БОНДАРЕНКО

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

# Age Peculiarities of Rat Erythrocytes' Resistance to Hypertonic Effect with Influence of Chlorpromasine

Ye. A. MATVIYENKO, L. V. KOBA,

*Kharkov National University named by Karazin*

N. M. SHPAKOVA, V. A. BONDARENKO

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

Исследованы особенности реакции эритроцитов крыс разного возраста на гипертоническое воздействие 4,0 М NaCl при 37 и 0 °С в присутствии хлорпромазина (ХПМ). Показано, что чувствительность эритроцитов крыс к 4,0 М NaCl выше при 37 °С. Установлено, что возрастные различия гипертонического лизиса эритроцитов, обнаруживаемые при введении ХПМ, проявляются при 37 °С. Влияние ХПМ на развитие гипертонического шока эритроцитов зависит от его концентрации и возраста животных. В концентрациях от 20 до 80 мкМ ХПМ ингибирует гипертоническое повреждение, а присутствие вещества в 4,0 М NaCl в высоких концентрациях оказывает стимулирующее влияние на гемолиз эритроцитов. Показано, что при 37 °С наиболее устойчивы клетки 12-месячных крыс. Обнаруженные возрастные различия осмотической чувствительности эритроцитов крыс могут быть связаны с особенностями состояния мембраны и цитоскелета в различные периоды онтогенеза.

Досліджено особливості реакції еритроцитів щурів різного віку на гіпертонічний вплив 4,0 М NaCl при 37 і 0 °С у присутності хлорпромазіну (ХПМ). Показано, що чутливість еритроцитів щурів до 4,0 М NaCl вище при 37 °С. Установлено, що вікові відмінності гіпертонічного лізису еритроцитів, які виявляються при введенні ХПМ, проявляються при 37 °С. Вплив ХПМ на розвиток гіпертонічного шоку еритроцитів залежить від його концентрації і віку тварин. У концентраціях від 20 до 80 мкМ ХПМ інгібує гіпертонічне пошкодження, а присутність речовин в 4,0 М NaCl у високих концентраціях виявляє стимулюючий вплив на гемоліз еритроцитів. Показано, що при 37 °С найбільш стійкі клітини 12-місячних щурів. Виявлені вікові відмінності осмотичної чутливості еритроцитів щурів можуть бути пов'язані з особливостями стану мембрани і цитоскелету в різні періоди онтогенезу.

The authors studied the peculiarities in responce of erythrocytes of differently aged rats to hypertonic effect of 4.0 M NaCl at 37 and 0 °C in presence of chlorpromasine (CPM). It is shown, that sensitivity of rat erythrocytes to 4.0 M NaCl is higher at 37 °C. It is established that the age differences in a hypertonic lysis of erythrocytes, which appeared when introducing CPM, are manifested at 37 °C. CPM effect on development of erythrocytes' hypertonic shock depends on its concentration and animals' age. In concentrations of 20 to 80 μM CPM inhibits hypertonic damage, and its presence in 4.0 M NaCl solution in high concentrations causes a stimulating effect on erythrocytes haemolysis. It is shown, that at 37 °C the cells from 12-month rats are more resistant. Appeared age differences in osmotic sensibility of rats erythrocytes can be caused by the peculiarities in membrane and cytoskeleton state at various periods of ontogenesis.

Возрастной статус организма может проявляться в различиях устойчивости клеток к стрессовым воздействиям, способным изменить функциональное состояние клеток, а также состояние структурных компонентов. Чувствительность клеток к нефизиологическим условиям детерминируется как возрастом клеток, так и возрастом организма, причем устойчивость к неблагоприятным факторам связывают в первую очередь с функционированием цитоплазматической мембраны [5]. Изменения структурно-функционального состояния мембраны клеток может проявиться в изменении устойчивости эритроцитов к осмотическому и температурному воздействиям.

Установлено, что модифицирующим действием на плазматическую мембрану обладают амфипатические соединения, способные эффективно распределяться как в гидрофобной, так и водной фазе [6,

Age status of an organism can be manifested in different resistance of cells to stress effects, being able to change the functional state of cells and structural components. Sensitivity of cells to non-physiological conditions is determined both by cells age, and by organism age; the resistance to unfavourable factors is bound first of all to the state of cytoplasmatic membrane [5]. Changes in structural and functional state of cell membrane can be manifested in the ones in erythrocytes resistance to osmotic and temperature effects.

It is established, that amphipatic substances have a modifying effect on plasmatic membrane and they can effectively be distributed both in hydrophobic, and in aqueous phase [6, 7]. Using of CPM allows the sufficient increasing of erythrocytes resistance to hypertonic shock, that is associated with action of am-



Матеріал, захищений авторським правом

7]. Использование ХПМ позволяет существенно повысить устойчивость эритроцитов к гипертоническому шоку, что связано с действием амфипата на процессы возникновения и замыкания трансмембранной поры [3].

Цель работы — исследование возрастных особенностей осмотического поведения эритроцитов крыс в растворе, содержащем 4,0 М NaCl, а также изучение влияния разных доз ХПМ на гипертонический лизис эритроцитов при 37 и 0 °С.

Объектом исследования служили эритроциты самцов белых крыс линии Вистар 1-, 6- и 12-месячного возраста. Кровь получали декапитацией животных (стабилизатор — гепарин 500 ед/мл). Эритроциты получали трехкратным центрифугированием при 600*g* в течение 10 мин в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 М NaCl, 5 мМ фосфатный буфер, $pH = 7{,}4$).

Гипертонический шок осуществляли перенесением аликвот (50 мкл) суспензии эритроцитов в пробирки, содержащие 1 мл 4,0 М NaCl, на 5 мин при 37 и 0 °С. ХПМ (20–360 мкМ) находился в литической среде до внесения в нее эритроцитов. Уровень гемолиза определяли спектрофотометрически при длине волны 543 нм и выражали в процентах. Полученные результаты статистически обрабатывали, используя t-критерий Стьюдента.

Известно, что при перенесении эритроцитов человека и животных в высококонцентрированные солевые среды клетки гемолизируют [3, 4]. Из данных, представленных на рис. 1, видно, что при температуре 37 °С гипертонический гемолиз эритроцитов крыс всех возрастных групп находится практически на одном уровне, т.е. существенных возрастных различий в повреждении клеток не наблюдается.

Снижение температуры до 0 °С позволяет выявить возрастные различия чувствительности эритроцитов крыс к действию 4,0 М NaCl (рис. 1). Наиболее высокий уровень гемолиза характерен для эритроцитов 1-месячных крыс (61,7%), а наиболее низкий — для крыс 12-месячного возраста (46%), т.е. при 0 °С наблюдается снижение чувствительности эритроцитов к гипертоническому воздействию с увеличением возраста животных. Возможно, наблюдаемые различия осморезистентности клеток связаны с возрастными особенностями ассоциации компонентов цитоскелета и мембраны. Взаимодействие цитоскелета с мембраной зависит от многих факторов: уровня фосфорилирования белков и полифосфоинозитидов, соотношения между олигомерными, тетрамерными и димерными формами спектрина, концентрации ионов $Ca^{2+}$, уровня сшивок между белками и т.д. Эти связи чувствительны к изменению осмолярности, ионной силы и *pH* среды, а также температуры, которая является дополнительным стрессовым фактором, проявляющим возрастные различия устойчивости клеток.

Эритроциты крыс всех возрастных групп менее чувствительны к гипертоническому воздействию при температуре 0 °С по сравнению с воздействием при температуре 37 °С. Возможно, это объясняется тем, что при 0 °С затруднено образование трансмембранных дефектов, инициированных гипертонией.

phipate to processes of appearing and closing-up of a transmembrane pore [3].

The aim of this work was to study the age peculiarities of osmotic behaviour of rats erythrocytes in the solution, containing 4.0 M NaCl, and to investigate the effect of various doses of CPM to hypertonic lysis of erythrocytes at 37 and 0 °C.

The investigations were conducted in erythrocytes of 1-, 6- and 12-month's aged Wistar male rats. Blood was obtained during animal's decapitation and stabilised with heparin (500 units per ml). Erythrocytes were obtained by three-fold centrifugation at 600*g* during 10 min in ten-fold volume of physiological solution (0.15 M NaCl, 5 mM phosphate buffer, *pH* 7.4)

Hypertonic shock was performed by removing the erythrocytes suspension aliquots (50 μl) to tubes, containing 1 ml of 4.0 M NaCl, for 5 min at 37 and 0 °C. CPM (20–360 μM) was in lytic medium before the erythrocytes transferring. Hemolysis value was spectrophotometrically determined at wavelength of 543 nm and expressed in percentage. Obtained results were statistically evaluated using Student's t-criterion.

It is known, that when transferring human and animals erythrocytes to highly concentrated salines the cells getting hemolysed [3, 4]. Data, presented in Fig. 1, shows that at temperature of 37 °C a hypertonic hemolysis of erythrocytes in all age groups of rats has almost equal values, i.e. no considerable age differences in cells' damage were observed.

Decreasing of temperature down to 0 °C allows the revealing of age differences in sensitivity of rat erythrocytes to 4.0 M NaCl action (Fig. 1). The highest hemolysis level is characteristic for the erythrocytes of 1-month's rats (61.7%), and the lowest one is characteristic for 12-month's rats (46%), i.e. at 0 °C the decrease in erythrocytes sensitivity to hypertonic effect is observed with increase in animals' age. Probably, the observed differences in cells osmotic resistance are related to the age peculiarities of membrane and cytoskeleton components association. Cytoskeleton interaction with membrane is affected by many factors, they are: value of proteins and polyphosphoinositides phosphorylation, ratio between tetramere and dimere spectrin forms, $Ca^{2+}$ ions concentration,

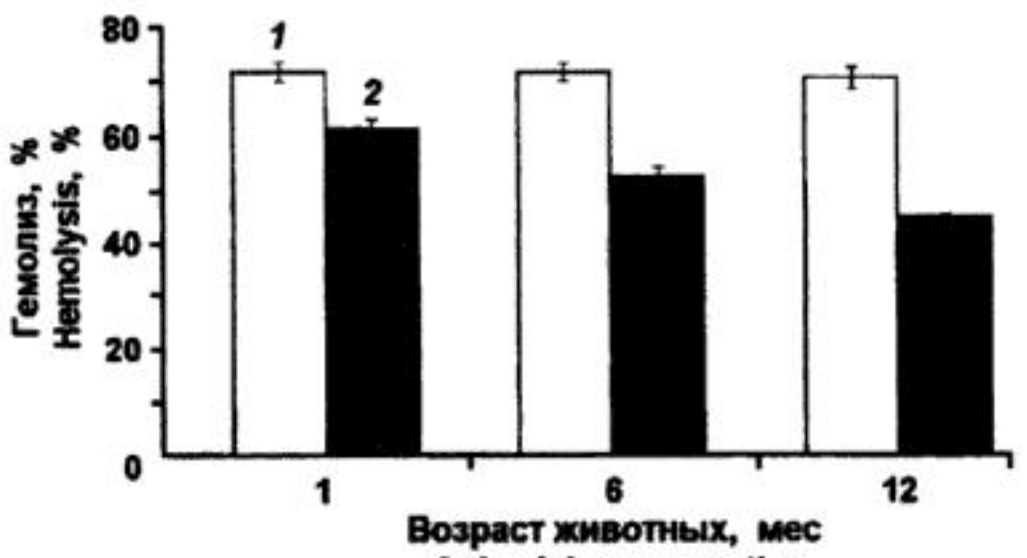



**Рис. 1.** Уровень гемолиза эритроцитов крыс разного возраста в растворе, содержащем 4,0 М NaCl, при температуре: *1* — 37 °С; *2* — 0 °С. Различия между группами животных достоверны, $p < 0{,}05$; $n = 6$.

**Fig. 1.** Values of hemolysis of erythrocytes from rats of various age in solution, containing 4.0 M NaCl at temperature: *1* — 37 °C; *2* — 0 °C. The differences between groups are statistically significant, $p < 0.05$; $n = 6$.



Матеріал, захищений авторським правом

Кинетическая кривая изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в процессе гипертонического шока (рис. 2) отражает развитие гемолиза эритроцитов во времени при перенесении клеток из физиологической среды в 4,0 М NaCl ($t = 23$ °C). Из представленных данных видно, что гемолиз развивается достаточно быстро и завершается к концу первой минуты. Сопоставляя полученные результаты со сравнительными данными по этому показателю, можно отметить, что клетки крыс гемолизируют без латентного периода, характерного для эритроцитов человека, и процесс гемолиза происходит гораздо быстрее [4].

Применение ХПМ позволяет снизить уровень повреждения эритроцитов в условиях гипертонического стресса. На рис. 3 показаны кривые зависимости гемолиза эритроцитов крыс разного возраста от концентрации ХПМ в среде, содержащей 4,0 М NaCl при температуре 37 °С. Как видно, формы кривых сходны для эритроцитов всех исследуемых возрастов. Для каждой кривой характерны 3 фазы, т. е. области концентраций амфипата, в пределах которых развитие гипертонического гемолиза проявляется неодинаково.

Первая, так называемая нисходящая фаза, фактически идентичная для клеток крыс всех возрастных групп, охватывает интервал концентраций ХПМ от 20 до 80 мкМ. В этой области наблюдается снижение уровня гипертонического гемолиза при введении ХПМ в среду.

Вторая фаза соответствует минимальному повреждению эритроцитов в определённом диапазоне концентраций амфипата. Следует отметить, что для эритроцитов крыс старшего возраста (6–12 мес) область оптимальных концентраций ХПМ, обеспечивающих минимальный гемолиз клеток, расширяется, т.е при повышении содержания ХПМ в среде устойчивость эритроцитов крыс разного возраста к осмотическому воздействию изменяется неодинаково (рис. 3). По-видимому, в этом случае речь идет не только об осмотической чувствительности, но и о чувствительности клеток к повреждающему действию ХПМ. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что наибольшей устойчивостью в данных экспериментальных условиях обладают эритроциты 12-месячных крыс.

Влияние высоких концентраций ХПМ на устойчивость эритроцитов также зависит от возраста экспериментальных животных (третья фаза — восходящая ветвь кривой). ХПМ в высоких дозах оказывает не протектирующее, а гемолитическое действие на клетки, причем более устойчивыми являются эритроциты крыс 12-месячного возраста. Уровень гемолиза при максимальных концентрациях амфипата существенно ниже для эритроцитов крыс этой возрастной группы по сравнению с эритроцитами 1- и 6-месячных животных.

Таким образом, степень влияния ХПМ на устойчивость эритроцитов крыс к действию 4,0 М NaCl при температуре 37 °С зависит от возраста

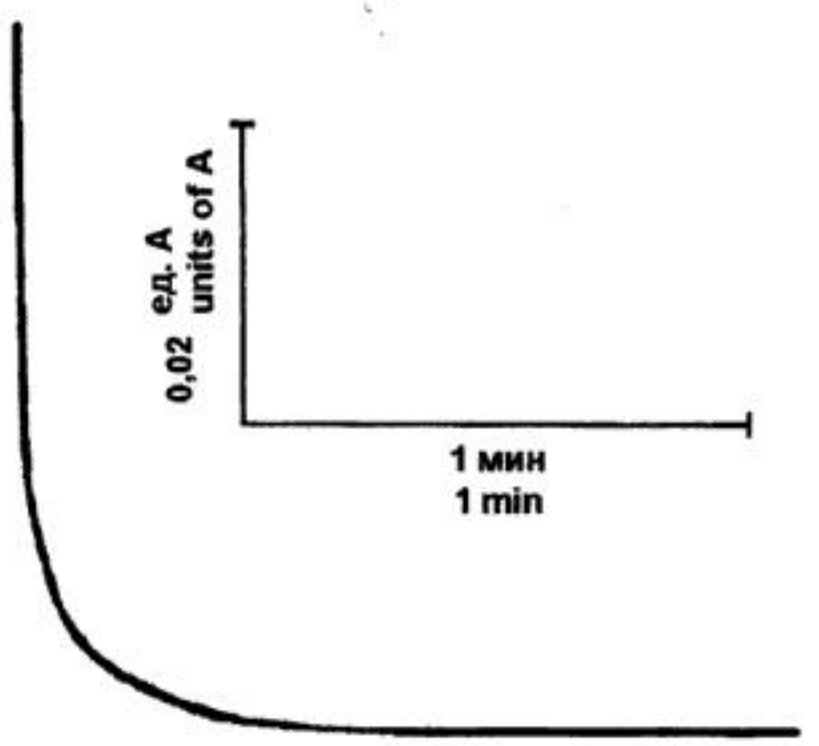



**Рис. 2.** Изменение во времени оптической плотности суспензии эритроцитов при гемолизе клеток в 4,0 М NaCl. Температура 23 °С, А — оптическая плотность.

**Fig. 2.** Temporal changes of optical density of erythrocyte suspension at cell hemolysis in 4.0 M NaCl. Temperature is 23 °C, A is optical density.

number of proteins cross-linkings etc. These interactions are sensitive to osmolarity changes, ionic force and pH of medium, and temperature, being the additional stress factor, expressing the age differences in cells resistance.

Erythrocytes of rats in all age groups are less sensitive to hypertonic effect at temperature of 0 °C comparing with that at temperature of 37 °C. Probably, it could be explained by difficulties in appearing of hypertony-initiated transmembrane defects.

Kinetic curve of alterations in optical density of erythrocytes suspension in process of hypertonic shock (Fig. 2) reflects the temporal development of erythrocytes hemolysis when transferring the cells out of physiological medium to 4.0 M NaCl solution ($t = 23$ °C). The presented data show that the hemolysis develops quite rapidly and terminates to the end of the first minute. When tracing the obtained data with this index in respect of comparative ones, it can be noted, that rat erythrocytes get hemolysed without latent period, which is characteristic for human erythrocytes, and the hemolysis process occurs more rapidly [4].

Using of CPM allows the reducing of erythrocytes damage value in hypertonic stress conditions. Fig. 3 shows the curves of dependence of hemolysis of erythrocytes, derived from variously aged rats on the concentration of CPM in medium, containing 4.0 M of NaCl at temperature of 37 °C. As it is seen, curves shapes are similar for erythrocytes from rats of all studied ages. For each curve three phases are inherent, i.e. these are the amphipate concentrations areas, in which limits the development of hypertonic hemolysis is shown unsimilar.

The first one, so-called descending phase, is actually identical for cells of rats from all age groups, covers the concentration interval of CPM from 20 to 80 μM. In this area the decrease of hypertonic hemolysis value is observed when introducing CPM in medium.

The second phase corresponds to the minimum erythrocytes damage in a distinct range of amphipate concentration. It is noted, that for erythrocytes from more aged rates (6–12 month) the region of optimal CPM concentrations, providing minimal hemolysis of



Матеріал, захищений авторським правом

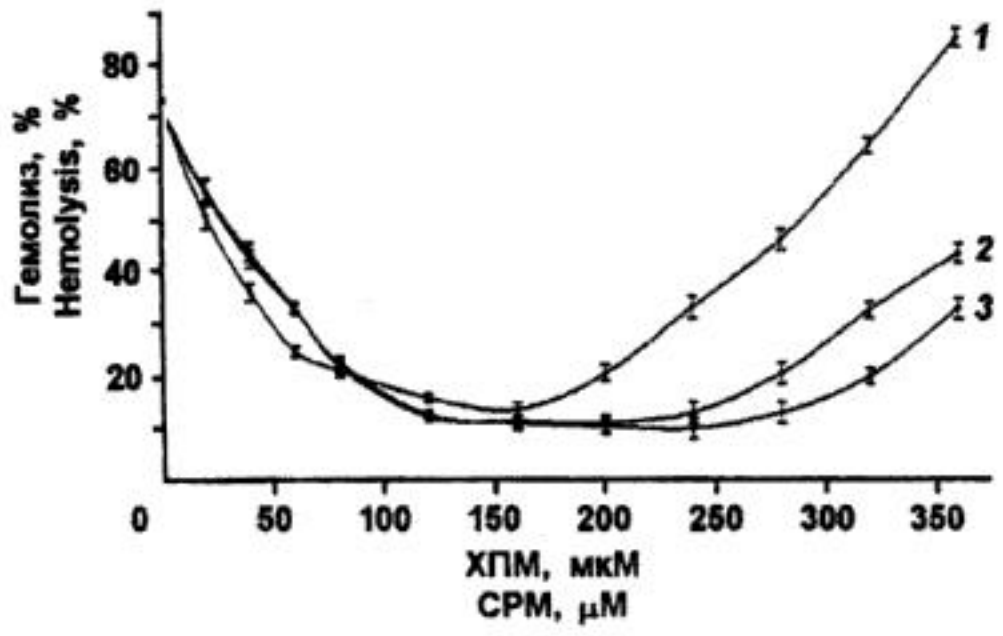



**Рис. 3.** Зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов 1- (*1*), 6- (*2*) и 12-месячных (*3*) крыс от содержания ХПМ в среде при 37 °С; $n = 6$.

**Fig. 3.** Dependence of value of hypertonic hemolysis of erythrocytes from 1- (*1*), 6- (*2*) and 12-month (*3*) rats from content of CPM in medium at 37 °C; n=6.

животных. Известно, что с увеличением возраста организма эритроциты претерпевают некоторые модификации [1, 2]. Так, изменяется характер взаимодействия цитоскелета с мембраной [1], что проявляется в изменении латеральной подвижности липидов и белков. Старение организма сопровождается увеличением содержания холестерина и сфингомиелина в эритроцитарных мембранах, изменением жирнокислотного состава фосфолипидов, вымыванием фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина из мембран [2]. Все эти изменения приводят к повышению вязкости эритроцитарной мембраны [1]. Увеличение содержания холестерина в эритроцитах старых доноров приводит к уменьшению проницаемости мембраны для воды и водорастворимых ионов и молекул.

Исходя из этих данных можно предположить, что выявленные различия в осмотической чувствительности эритроцитов крыс разного возраста могут быть обусловлены структурно-функциональными особенностями клеток, детерминированными возрастом организма. Вероятной причиной изменений состояния эритроцитов, циркулирующих в кровеносном русле, является изменение микроокружения в различные периоды жизни организма.

На рис. 4 представлены данные о влиянии ХПМ на гипертонический гемолиз эритроцитов крыс разного возраста к гипертоническому воздействию при 0 °С. При низкой температуре ХПМ проявляет антигемолитическую активность при использовании его в более низких концентрациях. Минимальное значение гипертонического гемолиза наблюдается в присутствии 40 мкМ амфипата, причем эта концентрация является оптимальной для клеток крыс всех исследуемых возрастов. Дальнейшее повышение содержания ХПМ в среде при 0 °С ведет к повышению уровня гемолиза эритроцитов животных всех возрастных групп. Таким образом, при 0 °С в присутствии ХПМ возрастные различия реакции эритроцитов крыс на гипертоническое воздействие не обнаруживаются.

cells, is extended, i.e. when increasing the CPM concentration in medium the resistance of erythrocytes from variously aged rats to osmotic effect varies unsimilarly (Fig. 3). Apparently, in this case not only osmotic sensitivity is observed, but also the sensitivity of cells to CPM damaging effect. The results of our work testify to the highest resistance of 12-aged rats erythrocytes in these experimental conditions.

Effect of high CPM concentrations to erythrocytes resistance also depends on age of experimental animals (the third phase – ascending branch of the curve). CPM in high doses does not protect, but affects cells hemolitically, and erythrocytes from 12-month rats are more resistant. Hemolysis value at maximal concentrations of amphipath is sufficiently lower for erythrocytes from rats of this age group comparing with erythrocytes from 1- and 6-month's animals.

Thus the extent of CPM effect on resistance of rats erythrocytes to effect of 4.0 M NaCl at temperature of 37 °C depends on animals age. It is known that with an increase in organism's age the erythrocytes are undergone some modifications [1, 2]. So the character of cytoskeleton and membrane interaction varies [1], and it is expressed in changes in lateral motility of lipids and proteins. The ageing of organism is accompanied with increase in content of cholesterol and sphingomyelin in erythrocyte membranes, changes in phospholipids' fatty acids content, loosing of phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine by membrane [1]. Increase in cholesterol content in erythrocytes from old donors results to decrease in membrane permeability for water and water soluble ions and molecules.

Proceeding from these data it can be assumed that the revealed differences in osmotic sensitivity of erythrocytes from variously aged rats can be caused by cells' structural and functional peculiarities, determined by an organism's age. The possible reason of changes in state of erythrocytes, circulating in blood channel, is the microenvironment change in various periods of organism's life.

Fig. 4 shows the data on CPM influence on hypertonic hemolysis of erythrocytes from rats of various age at 0 °C. At low temperature CPM express the antihemolytic activity when using it in lower concentrations. The minimal value of hypertonic hemolysis is observed in presence of 40 μM of amphipate, and this concentration is optimal for cells of rats from all studied ages. The further increasing of CPM content in medium at 0 °C leads to increase of hemolysis of erythrocytes from animals of all age groups. Thus at 0 °C in presence of CPM the age differences in response of rats erythrocytes to hypertonic effect are not found.

It is known, that when cooling and increasing of medium osmolarity the phase separation of lipids occurs and microdomens with various fluidity are formed in membrane [8]. CPM distributes in fluid crystal regions of erythrocytes membranes. Apparently, the increase in cells sensitivity for hyperosmotic



Матеріал, захищений авторським правом

Известно, что при охлаждении и повышении осмолярности среды в мембране происходит фазовое разделение липидов и формируются микродомены с различной текучестью [8]. ХПМ распределяется в жидкокристаллические области эритроцитарных мембран. По-видимому, повышение чувствительности клеток к гиперосмотическому воздействию при 0 °С в присутствии ХПМ может быть обусловлено вытеснением амфипата в области с более высокой текучестью и накоплением его в значительных локальных концентрациях. Вероятно, с этим связано снижение оптимальной антигемолитической концентрации ХПМ до 40 мкМ и повышение осмотической чувствительности эритроцитов при 0 °С.

Таким образом, результаты исследования позволяют сделать следующие выводы:

уровень гипертонического гемолиза эритроцитов крыс выше при 37 °С;.

возрастные особенности чувствительности эритроцитов крыс проявляются при их перенесении в 4,0 М NaCl при 0 °С (наибольший уровень гипертонического повреждения выявлено для эритроцитов 1-месячных крыс);

влияние ХПМ на чувствительность эритроцитов крыс к 4,0 М NaCl зависит от концентрации амфипата, возраста животных и температуры среды инкубации;

возрастные различия чувствительности эритроцитов к гипертоническим средам в присутствии ХПМ выявлены только при 37 °С (эритроциты 12-месячных крыс характеризуются наибольшей устойчивостью).

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Дужак Г. В., Саркисов К. Г.* Физико-химические свойства эритроцитов при старении организма. Биологические механизмы старения: Тезисы докладов, 12–14 мая 1994 г.– Харьков, 1994.– С. 60.
2. *Лопухин Ю. М.* Холестериноз.– М.: Медицина, 1983.– 352 с.
3. *Панталер Е. Р.* Исследование устойчивости дегидратированных эритроцитов к действию осмотического и механического стресса: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1995.– 20 с.
4. *Сынчикова О. П.* Влияние глюкопиранозидов на устойчивость эритроцитов человека к гиперосмотическому стрессу // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 3.– С. 77–79.
5. *Федосова С. Н.* Факторы, контролирующие чувствительность эритроцитов к осмотическим и температурным воздействиям: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1994.– 16 с.
6. *Шпакова Н. М., Бондаренко В. А.* Действие хлорпромазина на температурную и осмотическкую чувствительность эритроцитов // Биохимия.– 1991.– 56, № 12.– С. 2125–2130.
7. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.
8. *Quinn P. J.* A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes // Cryobiology.– 1985.– 22, № 2.– P. 128–147.


Поступила 02.10.2001

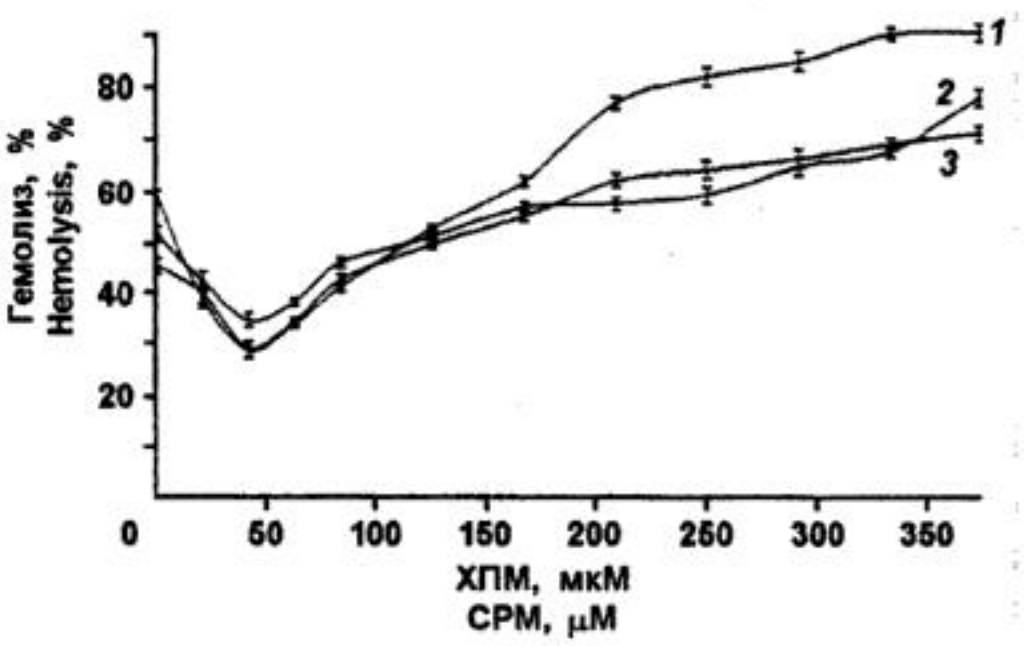



**Рис. 4.** Зависимость уровня гипертонического гемолиза эритроцитов 1- (*1*), 6- (*2*) и 12-месячных (*3*) крыс от содержания ХПМ в среде при 0 °С; $n = 6$.

**Fig. 4.** Dependence of value of hypertonic hemolysis of erythrocytes from 1- (*1*), 6- (*2*) and 12-month (*3*) rats from content of CPM in medium at 0 °C; n=6.

effect at 0 °C in presence of CPM can be caused by amphipate replacement to more fluid areas and its accumulation in considerable local concentrations. Perhaps this is the reason for decrease of CPM optimal antihemolytic concentration down to 40 μM and increase of erythrocytes sensitivity at 0 °C.

Thus the results of this study allow the concluding: the value of hypertonic hemolysis of rat erythrocytes is higher at 37 °C; the age peculiarities in sensitivity of rat erythrocytes are expressed when transferring them to 4.0 M NaCl solution at 0 °C (the highest value of hypertonic damage was found in erythrocytes from 1-month's rats); effect of CPM to sensitivity of erythrocytes to 4.0 M NaCl depends on amphipath concentration, animals age and temperature of incubation medium; age differences in erythrocytes sensitivity to hypertonic media are found only at 37 °C (erythrocytes from 12-month's rats are the most resistant).

## REFERENCES


1. *Duzhak G. V., Sarkisov K. G.* Physical and chemical properties of erythrocytes at organism ageing. Biological mechanisms of ageing: Proc. of reports, May 12–14, 1994.– Kharkov, 1994.– P. 60.
2. *Lopukhin Yu. M.* Cholesterinosis.– Moscow: Meditsina, 1983.– 352 p.
3. *Pantaler E. R.* The study of resistance of dehydrated erythrocytes to osmotic and mechanic stress action: The authors abstract of thesis for cand. biol. sci.– Kharkov, 1995.– 20 p.
4. *Synchikova O. P.* Glycopyranosides effect on human erythrocyte resistance to hyperosmotic stress // Problems of Cryobiology.– 1999.– № 3.– P. 77–79.
5. *Fedosova S. N.* Factors, controlling the erythrocytes sensitivity for osmotic and temperature influence: The authors abstract of thesis for cand. biol. sci.– Kharkov, 1994.– 16 p.
6. *Shpakova N. M., Bondarenko V. A.* Chlorpromasine effect to erythrocytes temperature and osmotic sensitivity // Biokhimia.– 1991.– 56, № 12.– P. 2125–2130.
7. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A.* Antihemolytic effect of chlorpromasine in hyperosmotic and cooling shock of erythrocytes // Biokhimia.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
8. *Quinn P. J.* A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes // Cryobiology.– 1985.– 22, № 2.– P. 128–147.


Accepted in 02.10.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 611.36.018.1: 57.043: 612.683: 57.085.1 UDC 616-089.843: 611.36.018.1: 57.043: 612.683: 57.085.1

# Влияние трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии

Н. Н. МОИСЕЕВА, Л. П. КРАВЧЕНКО, О. А. СЕМЕНЧЕНКО, А. Ю. ПЕТРЕНКО
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# Transplantation Effect of Subjected to Hypothermic Storage Hepatocytes on Rat's Liver Regeneration After a Partial Hepatectomy

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

Изучено влияние трансплантации в пульпу селезенки свежевыделенных гепатоцитов и клеток после гипотермического хранения в сахарозосодержащем растворе (ССР) на функциональное состояние регенерирующей печени крыс после 70%-й гепатэктомии. Установлено, что трансплантация гепатоцитов увеличивала массу и степень регенерации печени гепатэктомированных крыс, приводила к нормализации продолжительности медикаментозного сна через сутки после операции. В течение 3-х дней восстанавливалось содержание общего билирубина. Содержание альбумина в сыворотке крови не изменялось ни после 70%-й гепатэктомии, ни после трансплантации гепатоцитов. Трансплантация свежевыделенных и после гипотермического хранения клеток способствовала снижению концентрации лейкоцитов и изменению их соотношения в формуле крови, но не влияла на количество эритроцитов. Морфологическая оценка показала, что в селезенке крыс после введения гепатоцитов регистрируется полноценный трансплантат, выявленный реактивом Шиффа.

Вивчено вплив трансплантації в селезінку свіжовиділених гепатоцитів і клітин після гіпотермічного зберігання в сахарозомісткому розчині на функціональний стан печінки щурів, що регенерує після 70%-ї гепатектомії. Установлено, що трансплантація гепатоцитів викликала збільшення ваги та ступеня регенерації печінки гепатектомованих щурів, призводила до нормалізації тривалості медикаментозного сну через добу після операції. Протягом 3-х діб відновлювався вміст загального білірубіну. Вміст альбуміну в сироватці крові не змінювався ні після 70%-ї гепатектомії, ні після трансплантації гепатоцитів. Трансплантація свіжовиділених і після гіпотермічного зберігання клітин сприяла зниженню вмісту лейкоцитів та зміні їх співвідношення у формулі крові, але не впливала на кількість еритроцитів. Морфологічна оцінка показала, що у селезінці щурів після введення гепатоцитів реєструється повноцінний трансплантат, виявлений реактивом Шиффа.

Transplantation effect of freshly isolated hepatocytes and cells after hypothermic storage in a sucrose-based solution (SBS) into a spleen pulp on functional state of functional state of rat's regenerating liver after a 70% hepatectomy, was studied. It was established, that hepatocyte transplantation augmented the mass and regeneration degree of liver of hepatectomised rats, resulted in the normalisation of duration of medication sleep in a day after operation. The content of total bilirubin was recovered during 3 days. Albumin content in blood serum changed neither after a 70% hepatectomy, nor after hepatocyte transplantation. Transplantation of freshly isolated and after hypothermic storage cells contributed to a decrease in leukocyte concentration and a change in their ratio in blood formula, but did not affect erythrocyte number. Morphological estimation showed, that in rat's spleen after hepatocyte introduction an integral transplant, revealed by Shiff reagent, was recorded.

Известно, что изолированные клетки печени при патологии органа могут частично замещать его функцию [10, 12, 13, 16]. Однако эффективность трансплантации гепатоцитов при частичной гепатэктомии печени не оценивалась. Поскольку трансплантационный материал необходим постоянно, интересно было исследовать эффективность не только свежевыделенных клеток печени, но и подвергнутых гипотермическому хранению. В ИПКиК НАН Украины разработан метод гипотермического хранения (4 °С) изолированных гепатоцитов крыс с использованием оригинального ССР, позволяющий поддерживать высокую жизнеспособность клеток в течение 3-х суток [8].

Цель работы — изучение влияния трансплантации изолированных гепатоцитов, в том числе и

It is of common knowledge, that isolated cells of liver at the organ pathology can partially substitute its function [10, 12, 13, 16]. However the efficiency of hepatocyte transplantation at a partial hepatectomy was not estimated. Since a transplantation material is constantly in need, it would be interesting to investigate the efficiency not only of freshly isolated liver cells but subjected to hypothermic storage ones too. The method for hypothermic storage of rat's isolated hepatocyte (4 °C) by using the original SBS, allowing to maintain a high viability of cells for 3 days, was developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [8].

The aim of the work was to study the effect of isolated hepatocyte transplantation, including post-



Матеріал, захищений авторським правом

после гипотермического хранения, на регенерацию печени гепатэктомированных крыс.

Эксперименты проводили на лабораторных крысах-самцах весом 140–160 г. Частичную гепатэктомию выполняли по Higgins, Anderson [14]. Изолированные клетки печени получали модифицированным неферментативным методом [6]. Для оценки органозаместительной способности гепатоцитов клетки трансплантировали в селезенку одновременно с 70%-й гепатэктомией. Суспензии клеток $1 \cdot 10^7$ вводили в пульпу селезенки (0,3 мл). Контролем служили крысы, которым в селезенку вводили равный объем среды выделения гепатоцитов.

Белоксинтетическую функцию печени изучали по концентрации альбумина в сыворотке экспериментальных крыс с помощью диагностического набора "Агат". Детоксикационную функцию печени оценивали по продолжительности гексеналового сна [8]. Гексенал вводили внутрибрюшинно из расчета 40 мг на 1 кг веса животного. Уровень билирубина в сыворотке крови определяли спектрофотометрически с помощью диагностического набора "Лахема".

Систему гемопоэза изучали по мазкам периферической крови крыс, окрашенных по методу Романовского–Гимзы. Количество клеточных элементов подсчитывали унифицированным методом в счетной камере Горяева. Степень регенерации печени определяли по формуле, предложенной Child et al. [11].

Для гистологических исследований селезенку и печень фиксировали в кальций-формоле по Холту, после чего препараты промывали, обезвоживали в батарее спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм анализировали с помощью светооптического микроскопа после окрашивания гематоксилином Эрлиха и эозином. Степень выраженности дистрофических, некротических, воспалительных, регенеративных процессов оценивали по специфическому гистохимическому окрашиванию: наличие гликогена выявляли реактивом Шиффа, соединительную ткань в гистологических срезах печени и селезенки — методом аллохромного окрашивания соединительной ткани по Лилли [5].

Для проведения исследований животные были разделены на экспериментальные группы: группа неоперированных крыс (натив); группа 1 — крысы после 70%-й гепатэктомии, которым в пульпу селезенки вводили среду выделения клеток (0,3 мл); группа 2 — крысы после 70-%-й гепатэктомии, которым в пульпу селезенки вводили $1 \cdot 10^7$ свежевыделенных гепатоцитов (0,3 мл); группа 3 — крысы после 70%-й гепатэктомии, которым в пульпу селезенки вводили $1 \cdot 10^7$ изолированных гепатоцитов (0,3 мл) после суточного гипотермического хранения клеток при 4 °С; группа 4 — крысы после 70%-й гепатэктомии, которым в пульпу селезенки вводили

hypothermic storage, on liver regeneration of hepatoectomised rats.

The experiments were performed in male rats of 140–160 g weight. Partial hepatectomy was carried-out according to Higgins, Anderson [14]. Liver isolated cells were obtained using a modified non-enzymic method [6]. In order to evaluate the organ-substitutive capabilities of hepatocytes cells were transplanted into a spleen simultaneously with a 70% hepatectomy. Cell suspensions of $1 \cdot 10^7$ (0.3 ml) were introduced into a spleen pulp. The rats, received an equal volume of medium of hepatocyte isolation, served as the control.

Liver protein-synthetic function was studied by albumin concentration in serum of experimental rats using the diagnostic set "Agat". Detoxication function of liver was estimated by hexenal sleep duration [8]. Hexenal was intraperitoneously introduced in respect of 40 mg per 1 kg of animal weight. Bilirubin effect in blood serum was spectrophotometrically determined using the "Lakhema" diagnostic set.

Hemopoiesis system was studied by rat's peripheral blood smears, stained by Romanovsky–Gimza's method. Number of cellular elements was counted using the unified method in Goryaev's chamber. The degree of liver regeneration was determined according to the formula, proposed by Child et al. [11]. For histological study spleen and liver were fixed in calcium-formol by Holt, after that the preparations were washed out, dehydrated in an alcohol battery of ascending concentration, made light in xylol and filled in paraffin. Histological sections of 4–5 μm thickness were analysed using a light-optical microscope after staining with Erlich's hematoxylin and eosin according to the methods. Manifestation degree of dystrophic, necrotic, inflammatory, regenerative processes was estimated by a specific hisochemical staining: glycogen presence was revealed by Shiff reagent, connective tissue in liver and spleen hisological sections was detected by the method of connective tissue allochrome staining by Lilli [5].

In order to conduct the investigations the animals were divided in experimental groups: the group of non-operated rats (native); the group 1 — the rats after a 70% hepatectomy, to which one introduced the medium of cell isolation (0.3 ml) into a spleen pulp; the group 2 — the rats after a 70% hepatectomy, to which one introduced $1 \cdot 10^7$ of freshly isolated hepatocytes (0.3 ml) into a spleen pulp; the group 3 — the rats after a 70% hepatectomy, to which one introduced $1 \cdot 10^7$ of isolated hepatocytes (0.3 ml) after daily hypothermic storage of cells at 4 °C; the group 4 — the rats after a 70% hepatectomy, to whom one introduced $1 \cdot 10^7$ of isolated hepatocytes (0.3 ml) after 2 days' hypothermic storage of cells at 4 °C.

In 3 days after hepatectomy performance and introduction into spleen of cells with different storage terms, the animals were removed from the experiment, liver was taken, weighed and the degree of organ's



Матеріал, захищений авторським правом

$1 \cdot 10^7$ изолированных гепатоцитов (0,3 мл) после 2-суточного гипотермического хранения клеток при 4 °С.

Через 3-е суток после проведения гепатэктомии и введения в селезенку клеток с различными сроками хранения животных выводили из эксперимента, печень изымали, взвешивали и определяли степень регенерации органа. Установлено, что в группе 1 масса печени составляла 3,2 ± 0,3 г (рис. 1), в группе 2 она достигала 4,4 ± 0,1 г. Введение в селезенку гепатоцитов после суточного гипотермического хранения (группа 3) способствовало восстановлению массы печени до 3,9 ± 0,2 г. Масса регенерирующей печени достоверно превышала значения в группе 1 и практически не отличалась от значений, полученных при трансплантации свежевыделенных гепатоцитов (группа 3). Масса печени у гепатэктомированных животных с гепатоцитами, трансплантированными после 2-суточного гипотермического хранения, составляла 3,8 ± 0,3 г, что достоверно превышает данные группы 1, но незначительно меньше массы печени после трансплантации как свежевыделенных клеток, так и хранившихся сутки (рис. 1).

Аналогичные результаты получены и при изучении степени регенерации органа (рис. 2), которая в группе 1 составляла 61,6 ± 6,4%, в группе 2 — 85,8 ± 5,4%, в группе 3 — 79,0 ± 5,0%, в группе 4 — 78,8 ± 2,3%. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс регенерации печени после частичной гепатэктомии может быть ускорен введением в селезенку изолированных гепатоцитов клеток как свежевыделенных, так и после гипотермического хранения в ССР при 4 °С.

В работе оценивалось восстановление функциональной активности гепатэктомированной печени. Для этого в каждой группе провели исследования регенерации. Установлено, что в группе 1 масса печени составляла 3,2 ± 0,3 г (рис. 1), в группе 2 она достигала 4,4 ± 0,1 г. Введение в селезенку гепатоцитов после суточного гипотермического хранения (группа 3) способствовало восстановлению массы печени до 3,9 ± 0,2 г. Масса регенерирующей печени достоверно превышала значения в группе 1 и практически не отличалась от значений, полученных при трансплантации свежевыделенных гепатоцитов (группа 3). Масса печени у гепатэктомированных животных с гепатоцитами, трансплантированными после 2-суточного гипотермического хранения, составляла 3,8 ± 0,3 г, что достоверно превышает данные группы 1, но незначительно меньше массы печени после трансплантации как свежевыделенных клеток, так и хранившихся сутки (рис. 1).

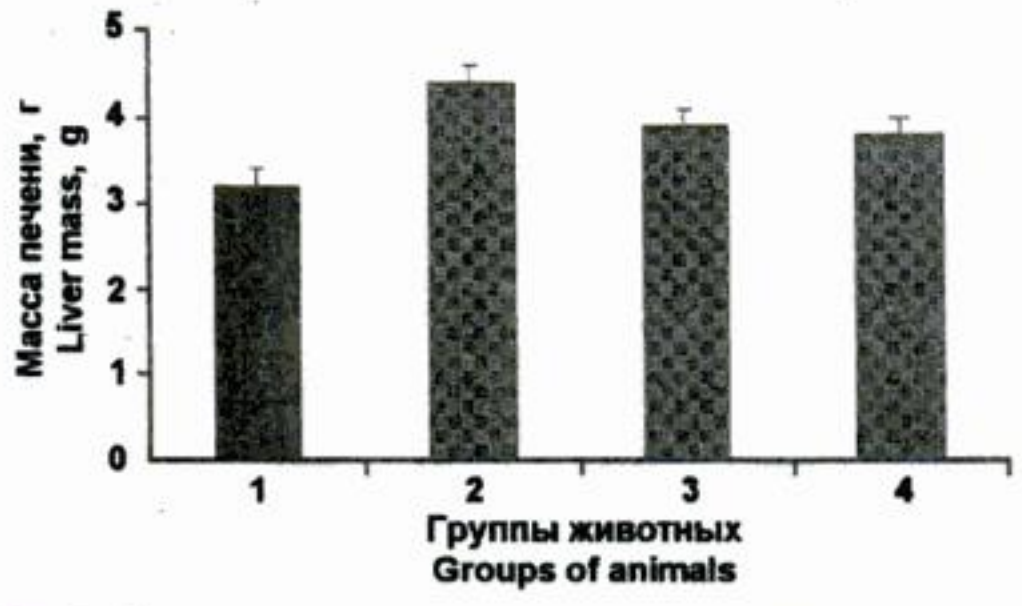



**Рис. 1.** Масса печени после трансплантации гепатоцитов у гепатэктомированных крыс: *1* — гепатэктомия; *2* — трансплантация свежевыделенных гепатоцитов; *3* — трансплантация гепатоцитов после суточного гипотермического хранения; *4* — трансплантация гепатоцитов после 2-х суток гипотермического хранения, $n = 7–41$.

**Fig. 1.** Liver mass after hepatocyte transplantation in hepatectomised rats: *1* — hepatectomy; *2* — transplantation of freshly isolated hepatocytes; *3* — hepatocyte transplantation after daily hypothermic storage; *4* — hepatocyte transplantation after 2 days of hypothermic storage, $n = 7–41$.

Аналогичные результаты получены и при изучении степени регенерации органа (рис. 2), которая в группе 1 составляла 61,6 ± 6,4%, в группе 2 — 85,8 ± 5,4%, в группе 3 — 79,0 ± 5,0%, в группе 4 — 78,8 ± 2,3%. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс регенерации печени после частичной гепатэктомии может быть ускорен введением в селезенку изолированных гепатоцитов клеток как свежевыделенных, так и после гипотермического хранения в ССР при 4 °С.

В работе оценивалось восстановление функциональной активности гепатэктомированной печени. Для этого в каждой группе провели исследования регенерации. Установлено, что в группе 1 масса печени составляла 3,2 ± 0,3 г (рис. 1), в группе 2 она достигала 4,4 ± 0,1 г. Введение в селезенку гепатоцитов после суточного гипотермического хранения (группа 3) способствовало восстановлению массы печени до 3,9 ± 0,2 г. Масса регенерирующей печени достоверно превышала значения в группе 1 и практически не отличалась от значений, полученных при трансплантации свежевыделенных гепатоцитов (группа 3). Масса печени у гепатэктомированных животных с гепатоцитами, трансплантированными после 2-суточного гипотермического хранения, составляла 3,8 ± 0,3 г, что достоверно превышает данные группы 1, но незначительно меньше массы печени после трансплантации как свежевыделенных клеток, так и хранившихся сутки (рис. 1).

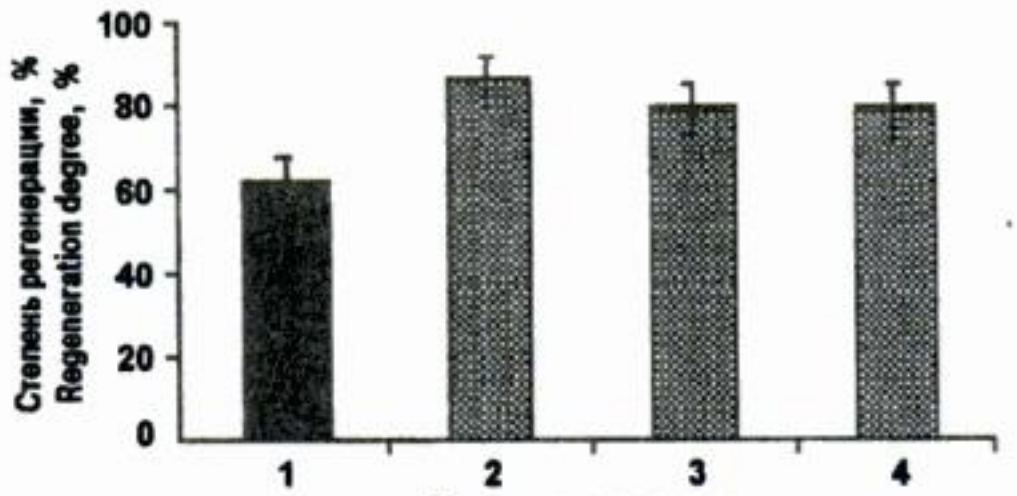



**Рис. 2.** Степень регенерации у гепатэктомированных крыс: *1* — гепатэктомия; *2* — трансплантация свежевыделенных гепатоцитов; *3* — трансплантация гепатоцитов после суточного гипотермического хранения; *4* — трансплантация гепатоцитов после 2-х суток гипотермического хранения, $n = 7–41$.

**Fig. 2.** Regeneration degree in hepatectomised rats: *1* — hepatectomy; *2* — transplantation of freshly isolated hepatocytes; *3* — hepatocyte transplantation after daily hypothermic storage; *4* — hepatocyte transplantation after 2 days of hypothermic storage, $n = 7–41$.

Аналогичные результаты получены и при изучении степени регенерации органа (рис. 2), которая в группе 1 составляла 61,6 ± 6,4%, в группе 2 — 85,8 ± 5,4%, в группе 3 — 79,0 ± 5,0%, в группе 4 — 78,8 ± 2,3%. Эти данные свидетельствуют о том, что процесс регенерации печени после частичной гепатэктомии может быть ускорен введением в селезенку изолированных гепатоцитов клеток как свежевыделенных, так и после гипотермического хранения в ССР при 4 °С.

В работе оценивалось восстановление функциональной активности гепатэктомированной печени. Для этого в каждой группе провели исследования регенерации органа. Установлено, что в группе 1 масса печени составляла 3,2 ± 0,3 г (рис. 1), в группе 2 она достигала 4,4 ± 0,1 г. Введение в селезенку гепатоцитов после суточного гипотермического хранения (группа 3) способствовало восстановлению массы печени до 3,9 ± 0,2 г. Масса регенерирующей печени достоверно превышала значения в группе 1 и практически не отличалась от значений, полученных при трансплантации свежевыделенных гепатоцитов (группа 3). Масса печени у гепатэктомированных животных с гепатоцитами, трансплантированными после 2-суточного гипотермического хранения, составляла 3,8 ± 0,3 г, что достоверно превышает данные группы 1, но незначительно меньше массы печени после трансплантации как свежевыделенных клеток, так и хранившихся сутки (рис. 1).



Матеріал, захищений авторським правом

ния по сохранению детоксикационной функции органа. Критерием ее оценки считается продолжительность медикаментозного сна после введения ксенобиотика гексенала. Параллельно в сыворотке крови животных измеряли концентрацию общего билирубина и альбумина, уровень которых косвенно свидетельствует о функциональном состоянии печени.

Время гексеналового сна у здоровых крыс — 14 ± 0,1 мин. После 70%-й гепатэктомии его продолжительность превышала исходные значения на протяжении 3-х суток после операции во всех исследуемых группах (рис. 3). В группе 2 время гексеналового сна было значительно меньше, чем в группе 1 ($p < 0,01$), но достоверно больше контрольной группы. Время сна в группе 3 снижалось по сравнению с группой 1 уже на 1-е сутки после операции. Однако до исходных значений здоровых крыс время медикаментозного сна не восстанавливалось, т.е. полученные результаты коррелируют с данными группы 2. Аналогичные данные имели и в группе 4 (рис. 3).

Еще одним показателем детоксикационной функции печени является уровень общего билирубина в сыворотке крови. Согласно [7, 9] 70%-я гепатэктомия приводит к снижению содержания билирубина и восстановлению его уровня по мере регенерации печени. Нами установлено, что концентрация общего билирубина снижалась от 14 ± 0,1 до 5,4 ± 0,4 мкмоль/л в группе 1 на 2-е сутки после гепатэктомии (рис. 4). Через 3-е суток содержание билирубина было также ниже контрольного уровня.

Трансплантация гепатэктомированным крысам свежевыделенных и хранившихся 1 сутки изолированных клеток печени способствовала нормализа-

time of hexenal sleep was considerably less, than in the group 1 ($p < 0.01$), but statistically and considerably higher than the control group. Sleep duration in the group 3 decreased in comparison with the group 1 even to the first day after operation. However the duration of medication sleep did not recover up to initial values, i.e. the results obtained correlated with those in the group 2. The same data we had in the group 4 (Fig. 3).

The level of total bilirubin in blood serum is one more index of liver detoxication function. According to the data [7, 9] 70% hepatectomy resulted in a reduction of bilirubin content and recovering of its level with liver regeneration. We established, that the concentration of total bilirubin reduced from 14 ± 0.1 to 5.4 ± 0.4 μMol/l in the group 1 to the 2nd day after hepatectomy (Fig. 4). In 3 days bilirubin content was also lower, than the control level.

Transplantation to hepatectomised rats of freshly isolated and stored for 1 day isolated liver cells contributed to the normalising of total bilirubin level even to the 2nd day of the experiment. Bilirubin concentration in hepatecomised rats with hepatocyte transplantation after two-day hypothermic storage recovered up to the initial values in 3 days (Fig. 4). Consequently the functional activity of liver cells during the process of hypothermic storage at 4 °C slightly decreased.

The level of serum protein — albumin is one of the functional indices of the liver integral work. Conducted by us investigations demonstrated, that 70% hepatectomy with simultaneous transplantation of both freshly isolated hepatocytes and after hypothermic storage did not affect the level of albumin in the experimental rats' serum (Table 1). The data presented correlate with the results, obtained by other investigators [15, 16].

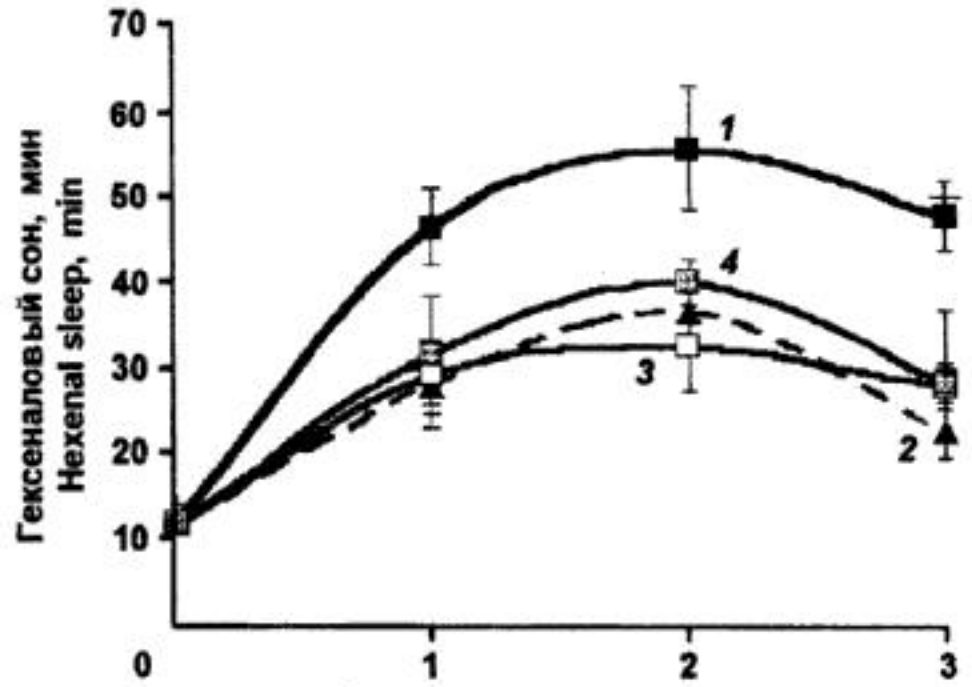



**Рис. 3.** Продолжительность гексеналового сна у крыс: *1* — гепатэктомия; *2* — трансплантация свежевыделенных гепатоцитов; *3* — трансплантация гепатоцитов после суточного гипотермического хранения; *4* — трансплантация гепатоцитов после 2-х суток гипотермического хранения, $n = 7–41$.

**Fig. 3.** Hexenal sleep duration in rats: *1* — hepatectomy; *2* — transplantation of freshly isolated hepatocytes; *3* — hepatocyte transplantation after daily hypothermic storage; *4* — hepatocyte transplantation after 2 days of hypothermic storage, $n = 7–10$.

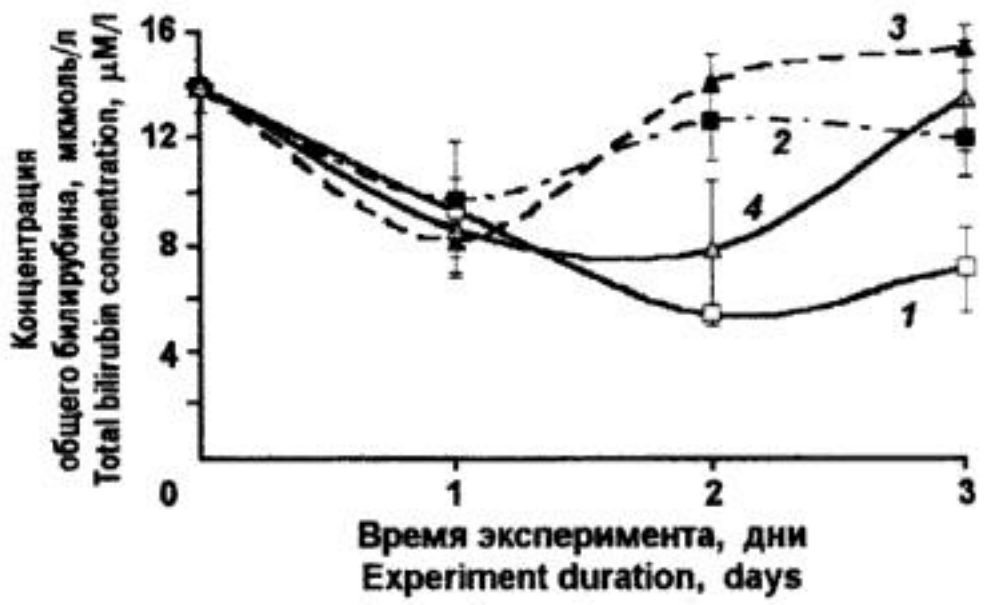



**Рис. 4.** Концентрация общего билирубина в сыворотке крови гепатэктомированных крыс: *1* — гепатэктомия; *2* — трансплантация свежевыделенных гепатоцитов; *3* — трансплантация гепатоцитов после суточного гипотермического хранения; *4* — трансплантация гепатоцитов после 2-х суток гипотермического хранения, $n = 7–41$.

**Fig. 4.** Total bilirubin concentration in blood serum of hepatectomised rats: *1* — hepatectomy; *2* — transplantation of freshly isolated hepatocytes; *3* — hepatocyte transplantation after daily hypothermic storage; *4* — hepatocyte transplantation after 2 days of hypothermic storage, $n = 10–15$.



Матеріал, захищений авторським правом

ции уровня общего билирубина уже на 2-е сутки эксперимента. Концентрация билирубина у гепатэктомированных крыс с трансплантацией гепатоцитов после 2-суточного гипотермического хранения восстанавливалась до исходных значений через 3-е суток (рис. 4). Следовательно, функциональная активность клеток печени в процессе 2-суточного гипотермического хранения при 4 °С несколько снижается.

Одним из функциональных показателей полноценной работы печени является уровень сывороточного белка — альбумина. Проведенные нами исследования показали, что 70%-я гепатэктомия с одновременной трансплантацией гепатоцитов как свежевыделенных, так и после гипотермического хранения не влияла на уровень альбумина в сыворотке экспериментальных крыс (табл. 1). Представленные данные согласуются с результатами, полученными другими исследователями [15, 16].

После частичной гепатэктомии в результате потери крови при операции возникает состояние гипоксии [6]. Кровопотеря стимулирует пролиферацию и дифференцировку стволовых кроветворных клеток. В частности, известно, что уже через 24 ч после операционного вмешательства наблюдается стимуляция эритропоэза, лимфогенеза и гранулопоэза. Однако исследования влияния трансплантации изолированных гепатоцитов на этот процесс не проводили, поэтому целесообразно было подсчитать количество эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови крыс во всех изучаемых группах. Из данных табл. 1 видно, что гепатэктомия приводила к постепенному снижению уровня эритроцитов через сутки после операции до 78% по сравнению с контрольной группой. Через 2-е суток количество эритроцитов снизилось до 51, а через три — до 47%.

After a partial hepatectomy as a result of blood loss during the operation the state of hypoxia occurs [6]. Blood loss stimulates the proliferation and differentiation of stem hemopoietic cells. In particular, it is known that even in 24 hours after operative invasion there is the stimulation of erythropoiesis, lymphogenesis and granulopoiesis. However the investigations of the isolated hepatocyte transplantation effect on this process have not been performed, therefore it was expedient to count the number of erythrocytes and leukocytes in rats' peripheral blood in all studied groups. The data of Table 1 show, that hepatectomy resulted in a gradual decrease in erythrocyte level in a day after operation down to 78% in comparison with the control group. In two days the number of erythrocytes reduced down to 51% and in 3 days down to 47%.

In the groups 2, 3 and 4 the erythrocyte concentration in rats' peripheral blood in a day after operation made 64%, and 48 and 46% in next 2 days. The data obtained testify to the fact that the transplantation of both freshly isolated hepatocytes and after hypothermic storage did not cause considerable effect on the erythropoiesis of hepatectomised rats.

It is known, that leukocyte number is an important index of a recipient's immunological response to hepatocyte transplantation [1]. Therefore in this work we studied the concentration and ratio of leukocyte forms in a peripheral blood before and after transplantation of allogenic hepatocytes.

The investigations demonstrated that in the group 1 in a day after hepatectomy the leukocyte concentration increased up to $17 \pm 3.3 \cdot 10^9$/l in comparison with the control - $10.5 \pm 0.3 \cdot 10^9$/l (Table 1). To the second day the leukocyte number sharply augmented up to $25.9 \pm 1.1 \cdot 10^9$/l, and to the 3rd reduced down to the 1st day's level. One can conclude, that the liver resection causes a resistant lekocytosis, probably stipulated by an inflammatory post-operative

**Таблица 1** **Table 1**

**Количество лейкоцитов, эритроцитов и альбумина у крыс ($M \pm m$, $n = 10$)**

**Number of leukocytes, erythrocytes and albumin in rats ($M \pm m$, $n = 10$)**

| Группы животных<br>Groups of animals | Время эксперимента, сут<br>Experiment duration, day | Лейкоциты, $10^9$/л<br>Leukocytes, $10^9$/l | Эритроциты, $10^{12}$/л<br>Erythrocytes, $10^{12}$/l | Альбумин, г/л<br>Albumin, g/l |
|---|---|---|---|---|
| Норма<br>Norm | | 10,5 ± 0,3 | 7,4 ± 0,2 | 33,0 ± 0,1 |
| 1 | 1 | 17,0 ± 3,3* | 6,12 ± 0,2 | 34,0 ± 1,2 |
| | 2 | 25,9 ± 1,1* | 3,87 ± 0,1 | 32,0 ± 2,8 |
| | 3 | 17,3 ± 1,8* | 3,7 ± 0,4 | 32,7 ± 0,4 |
| 2 | 1 | 14,6 ± 0,6* | 5,0 ± 1,0 | 32,0 ± 1,5 |
| | 2 | 14,0 ± 1,3*,** | 3,8 ± 0,1 | 32,8 ± 1,4 |
| | 3 | 15,0 ± 2,85 | 3,6 ± 0,3 | 33,0 ± 2,2 |
| 3 | 1 | 14,7 ± 1,7* | 5,8 ± 0,7 | 29,0 ± 1,6 |
| | 2 | 16,4 ± 1,4*,** | 3,9 ± 0,2 | 29,4 ± 1,8 |
| | 3 | 16,4 ± 3,9* | 4,0 ± 0,2 | 28,7 ± 1,8 |
| 4 | 1 | 14,3 ± 1,1* | 5,1 ± 0,2 | 29,9 ± 2,3 |
| | 2 | 15,0 ± 0,6*,** | 4,1 ± 0,5 | 29,0 ± 1,6 |
| | 3 | 15,9 ± 1,0* | 3,6 ± 0,2 | 26,0 ± 1,3 |

**Примечания.** *$p < 0,05$ — относительно контроля; **$p < 0,05$ — относительно гепатэктомированных крыс.

**Notes.** *$p < 0.05$ — in respect of the control; **$p < 0.05$ — in respect of hepatectomised rats.



Матеріал, захищений авторським правом

В группах 2, 3 и 4 концентрация эритроцитов в периферической крови крыс через сутки после операции составляла 64%, а в последующие 2-е суток — 48 и 46%. Полученные данные свидетельствуют о том, что трансплантация гепатоцитов как свежевыделенных, так и после гипотермического хранения не оказывала существенного влияния на эритропоэз гепатэктомированных крыс.

Известно, что количество лейкоцитов является важным показателем иммунологического ответа реципиента на трансплантацию гепатоцитов [1]. Поэтому в настоящей работе мы изучили концентрацию и соотношение форм лейкоцитов в периферической крови до и после трансплантации аллогенных гепатоцитов.

Исследования показали, что в группе 1 через сутки после гепатэктомии концентрация лейкоцитов увеличилась до $17 \pm 3{,}3 \cdot 10^9$/л по сравнению с контролем — $10{,}5 \pm 0{,}3 \cdot 10^9$/л (табл. 1). На 2-е сутки количество лейкоцитов резко возрастало до $25{,}9 \pm 1{,}1 \cdot 10^9$/л, а на 3-и снижалось до уровня 1-х суток. Можно сделать вывод, что резекция печени вызывает устойчивый лейкоцитоз, обусловленный, вероятно, воспалительным послеоперационным процессом. Подтверждается факт, что на протяжении всего периода регенерации печени и некоторое время после его завершения наблюдается лимфоцитоз [1].

В группе 2 концентрация лейкоцитов достоверно превышала исходные значения и на 1-е, и на 2-е сутки эксперимента. По сравнению с группой 1 число лейкоцитов после трансплантации свежевыделенных гепатоцитов достоверно уменьшалось на 2-е сутки (табл. 1). В группах 3 и 4 наблюдали аналогичную динамику изменения количества лейкоцитов. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень лейкоцитов в периферической крови всех групп животных превышает исходные значения лейкоцитов неоперированных крыс на протяжении всего эксперимента (табл. 1).

Как показатель иммунологических реакций организма большое значение имеет не только изменение общего количества лейкоцитов, но и соотношение их форм. В табл. 2 показано, что в группе 1 наблюдается изменение соотношения лейкоцитов в формуле крови. В 1-е сутки после гепатэктомии наблюдался нейтрофилез. В группах 2, 3 и 4 на 2-е сутки в препаратах были отмечены палочкоядерные нейтрофилы. Выход молодых нейтрофилов из костного мозга в периферическую кровь связывают с воспалением. В наших экспериментах появление незрелых форм лейкоцитов может быть обусловлено как воспалением, так и реакцией иммунного ответа на трансплантат. На 3-и сутки в перечисленных группах был отмечен лимфоцитоз, которому также отводится определенная роль в реализации клеточного деления регенерирующего органа [1].

После трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, динамика изме-

process. We confirmed, that during the all period of liver regeneration and some time after its completion the lymphocytosis is observed [1].

In the group 2 the leukocyte concentration statistically and significantly exceeded the initial values even to the 1st and 2nd days of the experiment. In comparison with the group 1 the leukocyte number after the freshly isolated hepatocyte transplantation statistically and significantly reduced to the 2nd day (Table 1). In the groups 3 and 4 the similar dynamics of leukocyte number change was observed. The data obtained testify to the fact, that the leukocyte level in a peripheral blood in all groups of animals exceeds the initial values of leukocytes in non-operated rats within all experiment (Table 1).

Not only the change in the total leukocyte number, but the ratio of their shapes is very important as the index of an organism's immunological reactions. Table 2 shows a change in leukocyte ratio in blood formula in the group 1. In the 1st day after hepatectomy the neutrophilia was observed. In the groups 2, 3 and 4 to the 2nd day one noted the stab neutrophiles in the preparations. One relates the release of young neutrophiles from bone marrow into a peripheral blood to an inflammation. In our experiments both inflammation and immune response reaction to a transplant can stipulate the appearance of immature leukocyte forms. To the 3rd day in the mentioned groups we noted the lymphocytosis, to which a certain role was given in realising cellular fission of a regenerating organ [1].

After transplantation of hepatocytes, subjected to hypothermic storage, the dynamics of changes in leukocyte ratio was identical with the results, obtained after transplanting freshly isolated ones (Table 2). These data testify to the fact, that an allogenic transplantation of freshly isolated hepatocytes at the background of a 70% hepatectomy changes the leukocyte ratio in blood formulae: lymphocyte number increases to the 3rd day (Table 2). The results of study of the leukocyte concentration and the ratio of their forms in experimental rats' blood is difficult to interpret, for this purpose it is necessary to study in future the immune mechanisms of a recipient.

Morphological estimation demonstrated, that in rats' spleen of the groups 2, 3 and 4 in 2 days after operation one recorded a transplant, revealed by Shiff reagent and there was an increase in macrophage number and connective tissue in comparison with the group 1. When studying the morphology of hepatectomised rats one recorded the cells, where the staining of glycogen by means of Shiff reagent was less intensive, than in the control. After hepatocyte transplantation the staining for glycogen in liver cells of hepatectomised rats corresponded to the norm.

Basing to the data obtained, we can conclude the following:

1) transplantation of both freshly isolated hepatocytes and those, stored under hypothermic conditions



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 2** **Table 2**

**Показатели морфологического состава крови крыс после трансплантации изолированных гепатоцитов, % ($n = 10$)**

**Indices of rat's blood morphological composition after isolated hepatocyte transplantation, % ($n = 10$)**

| Группы животных Groups of animals | Время эксперимента, сут Experiment duration, day | Показатели состава крови, % Indices of blood composition, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | эозинофилы Eosinophiles | палочко-ядерные нейтрофилы Stab neutrophiles | сегменто-ядерные нейтрофилы Segmented neutrophiles | лимфоциты Lymphocytes | моноциты Monocytes |
| Здоровые крысы Healthy rats | | 3,0 ± 0,1 | 2,0 ± 0,3 | 26 ± 1,4 | 66 ± 1,4 | 3,0 ± 0,2 |
| 1 | 1 | 2,5 ± 0,5 | 1,5 ± 0,5 | 33 ± 2,1* | 61 ± 3,8 | 2,0 ± 0,3 |
| | 2 | 3 ± 0,3 | | 27 ± 2,3 | 67 ± 2,3 | 3,0 ± 0,3 |
| | 3 | 2,0 ± 0,3 | 2,0 ± 0,4 | 28 ± 1,5 | 66 ± 2,1 | 2,0 ± 0,2 |
| 2 | 1 | 1,8 ± 0,3 | | 35 ± 4,9* | 62 ± 5,8 | 2,0 ± 0,3 |
| | 2 | 4,0 ± 1,0 | 5,0 ± 0,6*,** | 21 ± 2,2 | 67 ± 3,8 | 3,0 ± 0,4 |
| | 3 | 2,8 ± 0,3 | 1,2 ± 0,2 | 15 ± 2,7*,** | 78 ± 3,3*,** | 2,8 ± 0,7 |
| 3 | 1 | 2,2 ± 0,3 | 1,2 ± 0,5 | 26 ± 1,2** | 70 ± 4,8 | 1,0 ± 0,2 |
| | 2 | 5,5 ± 1,4* | 1,5 ± 0,6 | 20 ± 4,5 | 62 ± 0,8 | 1,0 ± 0,4 |
| | 3 | 2,0 ± 0,3 | | 25 ± 3,7 | 70 ± 3,7 | 3,0 ± 0,8 |
| 4 | 1 | 4,0 ± 0,4 | | 26 ± 0,4** | 71 ± 1,6 | |
| | 2 | 5 ± 1,5* | 2,0 ± 0,6 | 24 ± 2,8 | 67 ± 1,1 | 2,0 ± 0,7 |
| | 3 | 2 ± 0,4 | | 24 ± 4,9 | 70 ± 0,4 | 4,0 ± 0,4 |

**Примечания.** *$p < 0,05$ — относительно контроля; **$p < 0,05$ — относительно гепатэктомированных крыс.

**Notes.** *$p < 0.05$ — in respect of the control; **$p < 0.05$ — in respect of hepatectomised rats.

нений в соотношении лейкоцитов была тождественна результатам, полученным после трансплантации свежевыделенных гепатоцитов (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что аллогенная трансплантация свежевыделенных гепатоцитов на фоне 70%-й гепатэктомии изменяет соотношение лейкоцитов в формуле крови: количество лимфоцитов на 3-и сутки увеличивается (табл. 2). Результаты изучения концентрации лейкоцитов и соотношения их форм в крови у экспериментальных крыс сложно интерпретировать, для этого необходимо дальнейшее изучение иммунных механизмов реципиента.

Морфологическая оценка показала, что в селезенке крыс групп 2, 3 и 4 через 2-е суток после операции регистрируется трансплантат, выявленный реактивом Шиффа (рис. 5), и увеличивается количество макрофагов и соединительной ткани по сравнению с группой 1. При изучении морфологии печени гепатэктомированных крыс регистрируются клетки, в которых окраска гликогена с помощью реактива Шиффа была менее интенсивна, чем в контроле. После трансплантации гепатоцитов окраска на гликоген в клетках печени гепатэктомированных крыс соответствовала норме.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1) трансплантация как свежевыделенных, так и хранившихся в гипотермических условиях гепатоцитов стимулирует регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии;

2) трансплантация свежевыделенных и после гипотермического хранения гепатоцитов гепатэк-

stimulates the regeneration of rat's liver after a partial hepatectomy;

2) transplantation of freshly isolated and after hypothermic storage hepatocytes to hepatectomised rats contributes to the recovery of liver detoxical function;

3) transplantation of freshly isolated and after hypothermic storage hepatocytes does not affect an albumin concentration in rat's blood serum and erythrocyte content;

4) histochemical study allowed to reveal in rat's spleen a morphologically integral transplant of both freshly isolated and hypothermically stored hepatocytes.

Thus, a hypothermic storage of hepatocytes at 0–4 °C in SBS provides the preservation of functional status of isolated differentiated liver cells not only *in*

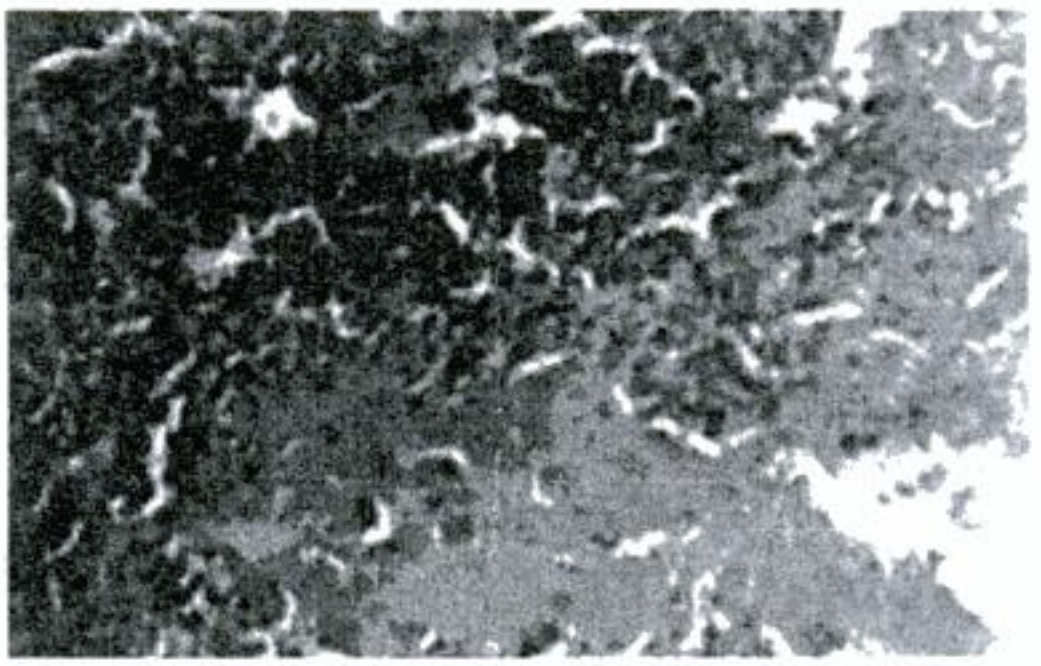


**Рис. 5.** Гистологический срез селезенки с трансплантацией гепатоцитов через 3-е суток.

**Fig. 5.** Histological section of spleen with hepatocyte transplantation in 3 days.



Матеріал, захищений авторським правом

томированным крысам способствует восстановлению детоксикационной функции печени;

3) трансплантация свежевыделенных и после гипотермического хранения гепатоцитов не влияет на концентрацию альбумина в сыворотке крови крыс и содержание эритроцитов;

4) гистохимические исследования позволили выявить в селезенке крыс морфологически полноценный трансплантат как свежевыделенных, так и гипотермически хранившихся гепатоцитов. Таким образом, гипотермическое хранение гепатоцитов при температуре 0–4 °С в ССР обеспечивает сохранение функционального статуса изолированных дифференцированных клеток печени не только *in vitro* [2–4], но и *in vivo*. Вместе с тем данные о динамике билирубина свидетельствуют о том, что эффективность трансплантации тем выраженнее, чем выше сохранность гепатоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Алексеева И. Н., Брызгина Т. М., Павлович С. И., Ильчевич Н. В.* Печень и иммунологическая реактивность. - Киев: Наук. думка, 1991.– 166 с.
2. *Кравченко Л. П., Белоус А. М., Шанина И. В.* Влияние гипотермии на некоторые биохимические показатели изолированных гепатоцитов // Укр. биохим. журн.– 1994.– 66, № 4.– С. 108–113.
3. *Кравченко Л. П., Андриенко А. Н.* Условия длительного хранения изолированных гепатоцитов при 4 °С // Пробл. криобиологии.– 1993.– № 1.– С. 33–38.
4. *Кравченко Л. П., Белоус А. М., Шанина И. В.* Длительное холодовое хранение печени в системе *in vivo* и *in vitro* // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 3.– С. 39–41.
5. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия.– М.: Мир, 1969.– 624 с.
6. *Сидорова В. Ф., Рябина З. А., Лейкина Е. М.* Регенерация печени у млекопитающих.– Л.: Медицина, 1966.– 205 с.
7. *Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А.* Проблемы нормы в токсикологии.– М.: Медицина, 1991.– С. 224–225.
8. *Пат. № 16946* України, МПК[5] С 12 N 5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Л. П. Кравченко, А. М. Андрієнко, О. А. Семенченко, А. М. Білоус (Україна).– № 4684421/SU; Публ. 29.08.97, Бюл. № 4.
9. *Akria Yoshikawa, Toshimi Kadio, Shin-ichi Seto et al.* Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration with promot improvement of hyperbilirubinemia in hepatectomized cholestatic rats // J. of surgical, research.– 1998.– 78.– P. 54–59.
10. *Bumgardner G., Fasola C., Sutherland D.* Prospects of hepatocyte transplantation // Hepatology.– 1992.– 7.– P. 368–376.
11. *Child C. G., Barr D., Halswarde G. K.* Liver regeneration folowing portal-caval transposition in dogs // Ann. Surg.– 1953.– P. 136–600.
12. *Fuller B. J.* Transplantation of isolated hepatocytes - a review of current ideas // J. Hepatology.– 1988.– 7, № 3.– P. 368–376.
13. *Gupta S., Roy Chowdrhury J.* Hepatocyte transplantation: back to the future // Hepatology.– 1992.– 15.– P. 156–162.
14. *Higgins G. H., Anderson R. H.* Experimental pathology of the liver restoration of the liver of white rat following partial swegical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P. 186–188.
15. *Toer M., Harris C., Tompcins R., et al.* Water permeability of isolated rat hepatocytes between 0 and –12 °C // Cryobiology.– 1990.– 27.– P. 632.
16. *Tian X., Tang M. D., Takashi Hashimoto et al.* Effect of Partial Pancreaectomy on Liver Regeneration in Rats // J. Surgical reseach.– 1997.– 72.– P. 8–14.


Поступила 26.03.2002

*vitro* [2–4], but also *in vivo*. At the same time the data on bilirubin dynamics testify to the fact, that the efficiency of transplantation is more manifested when the hepatocyte integrity is higher.

## REFERENCES


1. *Alekseyeva I. N., Bryzgina T. M., Pavlovich S. I., Il'chevich N. V.* Liver and immunological reactivity.– Kiev: Naukova dumka, 1991.– 166 p.
2. *Kravchenko L. P., Belous A. M., Shanina I. V.* Hypothermia effect on some biochemical indices of isolated hepatocytes // Ukrainskij biokhemicheskij zhurnal.– 1994.– 66, № 4.– P. 108–113.
3. *Kravchenko L. P., Andrienko A. N.* Conditions of long-term storage of isolated hepatocytes at 4 °C // Problemy kriobiologii.– 1993.– № 1.– P. 33–38.
4. *Kravchenko L. P., Belous A. M., Shanina I. V.* Liver long-term cold storage in the system *in vivo* and *in vitro* // Problemy kriobiologii.– 1998.– № 3.– P. 39–41.
5. *Lilli R.* Pathohistological technique and practical histochemistry.– M.: Mir, 1969.– 624 p.
6. *Sidorova V. F., Ryabina Z. A., Lejkina E. M.* Liver regeneration in mammals.– L.: Meditsina, 1966.– 205 p.
7. *Trakhtenberg I. M., Sova R. E., Sheftel' V. O., Onikienko F. A.* Problems of the norm in toxicology.– M.: Meditsina, 1991.– P. 224–225.
8. *Patent № 16946* of Ukraine, МПК[5] С 12 N 5/00. Solution for hypothermic storage of isolated hepatocytes / L. P. Kravchenko, A. M. Andrienko, O. A. Semenchenko, A. M. Belous (Ukraine).– № 4684421/SU; Published 29.08.97, Bull. № 4.
9. *Akria Yoshikawa, Toshimi Kadio, Shin-ichi Seto et al.* Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration with promot improvement of hyperbilirubinemia in hepatectomized cholestatic rats // J. of surgical, research.– 1998.– 78.– P. 54–59.
10. *Bumgardner G., Fasola C., Sutherland D.* Prospects of hepatocyte transplantation // Hepatology.– 1992.– 7.– P. 368–376.
11. *Child C. G., Barr D., Halswarde G. K.* Liver regeneration folowing portal-caval transposition in dogs // Ann. Surg.– 1953.– P. 136–600.
12. *Fuller B. J.* Transplantation of isolated hepatocytes - a review of current ideas // J. Hepatology.– 1988.– 7, № 3.– P. 368–376.
13. *Gupta S., Roy Chowdrhury J.* Hepatocyte transplantation: back to the future // Hepatology.– 1992.– 15.– P. 156–162.
14. *Higgins G. H., Anderson R. H.* Experimental pathology of the liver restoration of the liver of white rat following partial swegical removal // Arch. Path.– 1931.– 12.– P. 186–188.
15. *Toer M., Harris C., Tompcins R., et al.* Water permeability of isolated rat hepatocytes between 0 and –12 °C // Cryobiology.– 1990.– 27.– P. 632.
16. *Tian X., Tang M. D., Takashi Hashimoto et al.* Effect of Partial Pancreaectomy on Liver Regeneration in Rats // J. Surgical reseach.– 1997.– 72.– P. 8–14.


Accepted in 26.03.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 53.087.62: 536.42: 57.043

UDC 53.087.62: 536.42: 57.043

# Контроль температуры и скорости ее изменения в среде, содержащей биообъект

Л. В. ГОРБУНОВ

*Харьковский биотехнологический центр, пос. Кулиничи*

# Control of the Temperature and its Rate Change in the Bioobject Comprising Medium

L. V. GORBUNOV

*Kharkov Biotechnological Center, v. Kulinichi*

Предложен метод калибровки термодатчиков при помощи уравнений, описывающих зависимость их электропроводных свойств от температуры, по трем реперным точкам. Величина погрешности измерения температуры этим методом в два раза ниже, чем общепринятым. Абсолютная (относительная) погрешность измерения для термопар и терморезисторов в диапазоне от 50 до 0 °С составила 0,8 °С (1,6%) и от 0 до –200 °С — 2,8 °С (1,4%) соответственно. Разработанный кондуктометрический способ измерения высоких $B_1 \geq 30$ °С/с ($1{,}8 \cdot 10^3$ °С/мин) и сверхвысоких $B_2 \leq 160$ °С/с ($9{,}6 \cdot 10^3$ °С/мин) скоростей замораживания позволяет определять значения интенсивности теплообмена для контейнеров, содержащих раствор криопротектора с концентрацией $C_1 \geq 40$ и $C_2 \geq 30\%$ соответственно с погрешностью не более 5%.

Запропоновано метод калібрування термодатчиків за допомогою рівнянь, які описують залежність електропровідних властивостей від температури, за трьома реперними точками. Величина похибки виміру температури цим методом у два рази нижча, ніж загальноприйнятим. Абсолютна (відносна) похибка виміру для термопар і терморезисторів у діапазоні від 50 до 0 °С склала 0,8 °С (1,6%) і від 0 до –200 °С — 2,8 °С (1,4%) відповідно. Розроблений кондуктометричний спосіб виміру високих $B_1 \geq 30$ °С/с ($1{,}8 \cdot 10^3$ °С/хв) и надвисоких $B_2 \leq 160$ °С/с ($9{,}6 \cdot 10^3$ °С/хв) швидкостей заморожування дозволяє визначати величину інтенсивності теплообміну для контейнерів, що містять розчин кріопротектора з концентрацією $C_1 \geq 40$ і $C_2 \geq 30\%$ відповідно з похибкою не більше 5%.

The thermosensor calibration method through the equations, which to describe the dependence of their conductivity properties from temperature, on three basic points is proposed. The value of temperature measurement error by offered method twice is lower, than conventional method. The absolute (relative) error of measurement for thermocouples and thermoresistors in a range from 50 up to 0 °C has made 0.8 °C (1.6%) and from 0 up to –200 °C — 2.8 °C (1.4%), relatively. Developed conductivity method for measurement of high $B_1 \geq 30$ °C/s ($1.8 \cdot 10^3$ °C/min) and super high $B_2 \leq 160$ °C/c ($9.6 \cdot 10^3$ °C/min) freezing rates allows to determine the values of heat exchange intensity for containers with cryoprotectant solution $C_1 \geq 40$ and $C_2 \geq 30\%$, relatively, at the error no more than 5%.

Описание зависимости сохранности деконсервированных биообъектов от определяющих её факторов осложнено особыми условиями проведения измерений в диапазоне высоких и сверхвысоких скоростей теплообмена. Анализ регистрируемых высоких скоростей замораживания-оттаивания производится в сравнительном аспекте, что позволяет сопоставлять величины, полученные при одинаковых условиях проведения эксперимента [2, 8]. Сравнение скоростей охлаждения, установленных теоретически и практически для разных типов термопар, дает многократное расхождение этих величин, что указывает на отсутствие абсолютного метода измерения высоких скоростей теплообмена из-за влияния самого измерительного устройства на интенсивность теплообмена [1, 10, 11].

Цель работы — повышение точности измерения температуры в широком диапазоне скоростей теплообмена ($1 \cdot 10^4$ °С/мин) при использовании различных типов термодатчиков и способов их калибровки.

В качестве контейнеров для среды применяли пластиковые соломинки и конверты, изготовленные из пищевой алюминиевой фольги толщиной

Describing the integrity dependence of frozen-thawed bioobjects on the determining factors is complicated by special conditions of carrying-out the measurements within the range of high and ultra-high heat exchange rates. Analysis of being registered high freeze-thawing rates was done in a comparative aspect, that allowed comparing the values obtained under the same conditions of an experiment accomplishing [2, 8].

Comparison of the cooling rates, defined theoretically and practically for various thermocouple types demonstrated a multiple deviation of these values, that testified to the absence of an absolute method for measuring high heat exchange rates due to the effect of measuring device itself on the intensity of heat exchange [1, 10, 11].

An increase of the accuracy for temperature measuring within a wide range of heat exchange rates ($1 \cdot 10^4$ °C/min) when using various types of thermosensors and ways for their calibration was the aim of given work.

Plastic straws and envelopes, produced of 30 μm food aluminium foil were used as containers for a medium. Temperature of the sample was measured by means of chromel-coppel (ChC) and copper-constant



Матеріал, захищений авторським правом

30 мкм. Температуру образца измеряли: хромель-копелевой (ХК) и медь-константановой (МК) термопарами с диаметром спая 0,3 и 0,1 мм соответственно; терморезисторами типа медно-марганцевый ММТ-12-680, кобальто-марганцевый СТ1-17-380 Ом и медный, входящий в комплект замораживателя эмбрионов мобильного (ЗЭМ-4). Перечисленные средства регистрации температуры калибровали с точностью до 0,1 °С при помощи датчика, входящего в комплект устройства для замораживания "Minicool". Градуировку термодатчиков проводили в спиртовой бане при температурах от 50 до –196 °С. Напряжение и сопротивление фиксировали комбинированным цифровым прибором Щ-4300. Используя стандартную программу "Stadia", провели статистическую обработку полученных данных и установили регрессионные уравнения ($R \geq 0{,}99$).

Различные скорости замораживания (оттаивания) реализовывали погружением пластиковых капилляров с диаметрами 2; 1; 0,7 мм в жидкий азот (водяную баню, нагретую до 40 °С, с магнитной мешалкой). Для получения сверхвысоких скоростей теплообмена термопары или капли раствора помещали между двумя параллельно сходящимися медными пластинами, предварительно охлажденными в жидком азоте [9]. Режим снижения температуры регистрировали графопостроителем Н-307, а также его подключением к ЭВМ через аналого-во-цифровой преобразователь. Скорость теплообмена при замораживании определяли в диапазоне зоны эвтектики используемого раствора, а при оттаивании — в температурной зоне рекристаллизации. Относительную погрешность измерений оценивали как отношение абсолютной погрешности к величине температурного диапазона, в котором калибровали термопару [6]. Каждый эксперимент повторяли 5–7 раз. Полученные результаты статистически обрабатывали по общепринятым методикам.

При исследовании криоконсервированных половых клеток и эмбрионов необходимо контролировать температуру среды, содержащей биообъект. Максимальная точность ее измерения при помощи термопар составляет ± 0,05 °С, а платиновых термосопротивлений ± 0,003 °С [1]. Однако при проведении практических измерений в широком диапазоне температур (50 ÷ –196 °С) величины погрешностей оказываются значительно больше и варьируют от 0,5 до 5 °С, что связано с точностью калибровки конкретного термодатчика [7]. Использование термосопротивления для регистрации температуры ограничено его термоинерционностью по сравнению с термопарой. Увеличение погрешности при измерении высоких скоростей теплообмена с помощью термосопротивления происходит за счет возникновения на нем градиента температуры. При измерении термопарой причиной систематических погрешностей являются: способ изготовления термопары; материал, диаметр, длина и целостность электроизоляционного покрытия проводов; пара-

(CC) thermocouples with the diameter of junction of 0.3 and 0.1 mm, correspondingly; by thermoresistors of copper-manganese MMT-12-680, cobalt-manganese CT1-17-380 and copper types, which are the units in the set of embryo mobile freezer (EMF). The mentioned equipment for the temperature registering was calibrated with an accuracy up to 0.1 °C by means of the sensor, comprised by the unit in the freezing device set "Minicool". Thermosensor calibration was done on an alcohol bath under the temperatures from 50 to –196 °C. The voltage and resistance were fixed by means of the Щ-4300 combined digital device. Using the standard "Stadia" program, statistical processing of the obtained data was done, and regression equations were established ($R \geq 0.99$).

Various freezing (thawing) rates were realized by immersion of plastic capillaries with 2; 1; 0,7 mm diameters into liquid nitrogen (water bath, heated up to 40 °C, with magnetic mixer). To obtain ultra-high heat exchange rates the thermocouples or solution drops were put between two parallel coming together copper plates, cooled preliminarily in liquid nitrogen [9]. The regimen for a temperature decrease was recorded by means of H-307 graph plotter, as well as by its connecting to computer through an analogue-digital transducer. Heat exchange rate during freezing was measured within the range of eutectics zone of used solution, and during thawing this rate was evaluated within the temperature zone of re-crystallization. A relative error of measurements was estimated as the rate of an absolute error to the value of temperature range, within which a thermocouple was calibrated [6]. Each experiment was 5–7 times repeated. Obtained results were statistically processed according to generally accepted methods.

When investigating cryopreserved sexual cells and embryos, it is necessary to control the temperature in the bioobject containing medium. The maximum accuracy of the temperature measuring by means of thermocouples makes ± 0.05 °C, and the same value for platinum thermoresistances is ± 0,003 [1]. However during practical measurements within a wide temperature range (50 ÷ –196 °C), the values for errors occur to be significantly higher and vary from 0.5 to 5 °C, that is related to the thermosensor calibration accuracy [7]. Usage of thermoresistance for recording the temperature is limited by its thermoinertness comparing to a thermocouple. A rise in error when changing high rates of heat exchange by means of thermoresistance occurs due to the appearance on it of a temperature gradient. When measuring with thermocouple, the following values are the cause of systematic errors: the way for thermocouple production; material, diameter, length and integrity of electrical insulating wire cover; parameters of an amplifier and recording device; temperature range of calibration [5]. Experimental accuracy of the temperature determination when using traditional methods of thermosensor calibration within the range from 50 to –196 °C, cali-



Матеріал, захищений авторським правом

метры усилителя и регистрирующего прибора; температурный диапазон калибровки [5]. Экспериментальная точность определения температуры при использовании традиционных методов калибровки термодатчиков в диапазоне от 50 до –196 °С, отградуированных в положительном и отрицательном диапазонах, значительно отличается от расчетной. Максимальная точность измерения температуры расчетным способом определяется чувствительностью термодатчика в заданном температурном диапазоне и погрешностью регистрирующего прибора. Для медь-константановой термопары эта величина составляет 0,1–0,4 °С, а для хромель-копелевой — 0,1–0,2 °С.

Для контроля температуры в жидких, твёрдых и порошкообразных хладагентах-теплоносителях рекомендуем применять терморезисторы. Регистрировать температуру в устройстве для замораживания удобно с помощью терморезистора типа ММТ-12-680 Ом, а на поверхности термостолика — СТ1-17-380 Ом. Для определения температуры среды, содержащей биообъект, с точностью не менее ± 1,4 °С предложено использовать термостолик проволочный ТП-10 с вмонтированным внутрь терморезистором типа СТ1-17-380 Ом. В температурном диапазоне от 28 до 40 °С на поверхности предметного стекла и в чашке Петри со средой показания терморезистора составляют 284 ÷ 192 и 272 ÷ 178 кОм соответственно.

Апробацию предложенного опосредованного способа регистрации изменения температуры провели в условиях ее изменения. Терморезистор крепится внутри замораживателя в непосредственной близости от пробирки, содержащей среду. Точность определения температуры составляет 2,5 °С при условии, что скорость замораживания не превышает 1 °С/мин. Этот способ позволяет контролировать температуру среды с биообъектом без непосредственного погружения в нее термодатчика, что исключает возможность нарушения условий стерильности среды и инициации кристаллообразования при замораживании. Позволяет свести влияние многих не учитываемых физических факторов к одному регистрируемому, что делает процесс контроля и поддержания температуры более технологичным по сравнению с существующими аналогами.

Выбор различных способов измерения температуры с использованием медь-константановых и хромель-копелевых термопар, откалиброванных при температуре нерабочего спая –196 и 0 °С, обусловлен необходимостью регистрации высоких и низких скоростей теплообмена соответственно в различных температурных диапазонах. Точность определения температуры при традиционных методах калибровки термодатчиков в диапазоне от 50 до –196 °С, отградуированных в положительном (отрицательном) диапазоне, составила: для хромель-копелевых и медь-константановых термопар при температуре нерабочего спая 0 °С — 1,10 (2,65) °С и 2,56 (6,50) °С, а при температуре

brated within positive and negative ranges, significantly differed from a calculative one. The maximum accuracy of a temperature measuring by a calculation method is determined by a thermosensor susceptibility within the given temperature range and error of the recording device. For a copper-constant thermocouple this value makes 0.1–0.4, and for chromel-coppel one does 0.1–0.2 °C.

For the temperature control in liquid, solid and powder-like coolants we propose to use thermoresistors. Temperature recording in a freezing device is convenient with MMT-12-680 Om thermoresistor, and on the surface of thermotable CT1-17-380 Om is used. For determining the medium temperature, comprising bioobject, with an accuracy not less than ± 1.4 °C it was proposed to use TP-10 wire thermotable with built-in inside CT1-17-380 Om thermoresistor. Within the temperature range from 28 to 40 °C on the surface of microscopic slide and in Petri dish with the medium thermoresistor the data make 284 ÷ 192 and 272 ÷ 178 kOm, correspondingly.

Approbation of the proposed mediated way for recording the temeprature change was carried-out under its change conditions. Thermoresistor was fixed inside the freezer close to the vial, containing medium. An accuracy of the temperature determination makes 2.5 °C under the condition that the freezing rate does not exceed 1 °C/min. This way allows controlling the temperature of the medium with bioobject without a direct immersion of thermosensor into it, that excludes the possibility of sterile conditions impairing in a medium and initiation of the crystal formation during freezing. It brings together the effect of many not considered physical factors to one being registered, that makes the process of temperature controlling and maintenance more technological comparing to existed analogues.

Selection of various ways for the temperature measuring using copper-constant and chromel-coppel thermocouples, being calibrated under the temperature at inactive junction of –196 and 0 °C, was stipulated by the necessity of recorded high and low heat exchange rates, correspondingly, within various temperature ranges. An accuracy of the temperature determination using traditional methods for thermosensor calibration within the range from 50 down to –196 °C, being calibrated within a positive (negative) range, made: for chromel-coppel and copper-constant thermocouples under the temperature of inactive junction 0 °C — 1.10 (2,65) °C and 2.56 (6,50) °C, and under the temperature of –196 °C this value made 2.56 (3.69) °C and 1.82 (8,14) °C, correspondingly; in copper thermoresistor it was 1.63 (2,58) °C; in thermoresistors of MMT-12-680 Om and CT 1-17-380 Om this value was 2.78 (5,43) °C and 2.45 (5,52) °C, correspondingly (Table 1).

To increase technological characteristics of the process for the thermosensor graduation and decrease an error in the measurements the calibration way



Матеріал, захищений авторським правом

–196 °C – 2,56 (3,69) и 1,82 (8,14) °C соответственно; медного терморезистора – 1,63 (2,58) °C; терморезисторов типа ММТ-12-680 Ом и СТ1-17-380 Ом – 2,78 (5,43) и 2,45 (5,52) °C соответственно (табл. 1).

Для повышения технологичности процесса градуировки термодатчиков и понижения погрешности измерений апробирован способ калибровки по трем реперным точкам с использованием регрессионных уравнений. При помощи регрессионного анализа найдены уравнения, описывающие зависимость электропроводящих свойств от температуры для разных типов термодатчиков, откалиброванных в положительном и отрицательном диапазонах. Для медь-константановых (хромель-копелевых) термопар при температуре нерабочего спая 0 °C регрессионная зависимость имеет вид: $T = 23{,}81V$ ($T = 11V - 1$) и $T = -2{,}684V^2 - 23{,}29V - 1{,}96$ ($T = -0{,}7152V^2 + 13{,}96V - 0{,}29$) соответственно, а при температуре –196 °C – $T = -2{,}84V^2 + 50{,}45V - 190{,}7$ ($T = -4{,}856V^2 - 57{,}03V - 185{,}0$) соответственно;

для медного терморезистора $T = 2{,}394R - 239{,}7$ и $T = 1{,}977R - 207{,}5$ соответственно; терморезисторов типа ММТ-12-680 Ом (СТ1-17-380 Ом) $T = -18{,}68\ln R + 10{,}01$ ($T = -16{,}72\ln R - 2{,}080$) соответственно, где $V$ – напряжение, мВ, $R$ – сопротивление, Ом.

Максимальная точность измерения температуры в диапазоне от 50 до –196 °C реализуется при калибровке термодатчиков с использованием уравнений, описывающих зависимость их электропроводящих свойств от температуры по трем реперным точкам, при контроле температуры в данных точках с заданной точностью. Абсолютная (относи-

**Table 1**

**An accuracy of the temperature measuring (50 ÷ –196 °C) depending on the way of thermosensor calibration**

| Heat exchange rates, °C/min | Type of thermosensor and the way of its application | | Error of the temperature measuring Δ, °C | | Temperature control |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | traditional | proposed | |
| Under a stationary temperature $B \approx 0$ | Copper thermoresistor | | 2.6 | 2.2 | Of coolant, heat-transfer agent* |
| | CT1-17-380 thermoresistor | | 5.5 | 2.5 | Of the bioobject comprising medium* |
| Low rates $0 \le B \le 10$ | Thermoresistor MMT-12-680 | | 5.4 | 2.8 | When freezing bioobject |
| Average $10 \le B \le 300$ (high rates $300 \le B \le 2 \cdot 10^3$) | CC | $T_n = 0$ | 2.7 (6.5) | 1.2 (1.4) | // |
| | | $T_n = -196$ | 3.7 (8.1) | 2.4 (2.6) | In a straw, |
| | | $T_n$ is absent | 10 (10) | 4.3 (3.8) | vial, envelope |
| Ultra-high $2 \cdot 10^3 \le B \le 9 \cdot 10^3$ | Direct | | — | 2.3 | // In a drop, envelope |
| | Conductometric | | — | 2.6 | // In a capillary |

**Note**: $T_n$ — the temperature of inactive thermocouple junction/ °C; * — indirect way of the temperature control.

according to three datum points using regressive equations has been tested. By means of the regression analysis the equations, describing dependence of electro-conducting properties on the temperature for various types of thermosensors, including calibrated ones within the positive and negative ranges were found. For copper-constantant (chromel-coppel) thermocouples under the temperature of inactive junction 0 °C regression dependence is as follows: $T = 23{,}81V$ ($T = 11V - 1$) and $T = -2{,}684V^2 - 23{,}29V - 1{,}96$ ($T = -0{,}7152V^2 + 13{,}96V - 0{,}29$), correspondingly, and under the temperature of –196 °C – $T = -2{,}84V^2 + 50{,}45V - 190{,}7$ ($T = -4{,}856V^2 - 57{,}03V - 185{,}0$) respectively;

for a copper thermoresistor $T = 2{,}394R - 239{,}7$ and $T = 1{,}977R - 207{,}5$ correspondingly; for MMT-12-680 (CT1-17-380 Om) thermoresistors $T = -18{,}68\ln R + 10{,}01$ ($T = -16{,}72\ln R - 2{,}080$) correspondingly, where $V$ – tension, mV and $R$ – resistance, Om.

The maximum accuracy of the temperature measuring within the range from 50 to –196 °C is realised during the thermosensor calibration using the equations, describing the dependence of their electroconductive properties on the temperature according to three datum points, under the temperature control at given points with the given accuracy. An absolute (relative) error of the temperature determination for all the thermosensor types made within the range from 50 to

**Таблица 1**

**Точность измерения температуры (50 ÷ –196 °C) в зависимости от способа калибровки термодатчика**

| Скорости теплообмена, °C/мин | Тип термодатчика и способ его применения | | Погрешность измерения температуры Δ, °C | | Контроль температуры |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | традиционный | предлагаемый | |
| При стационарной температуре $B \approx 0$ | Медный терморезистор | | 2,6 | 2,2 | Хладагента, теплоносителя |
| | Терморезистор СТ1-17-380 | | 5,5 | 2,5 | Среды, содержащей биообъект* |
| Малые $0 \le B \le 10$ | Терморезистор ММТ-12-680 | | 5,4 | 2,8 | При замораживании биообъекта* |
| Средние $10 \le B \le 300$ (высокие $300 \le B \le 2 \cdot 10^3$) | ХК (МК) | $T_н = 0$ | 2,7 (6,5) | 1,2 (1,4) | // |
| | | $T_н = -196$ | 3,7 (8,1) | 2,4 (2,6) | в соломинке, |
| | | $T_н$ отсутствует | 10 (10) | 4,3 (3,8) | пробирке, конверте |
| Сверхвысокие $2 \cdot 10^3 \le B \le 9 \cdot 10^3$ | Непосредственный | | — | 2,3 | // в капле, конверте |
| | Кондуктометрический | | — | 2,6 | // в капилляре |

**Примечания.** $T_н$ — температура нерабочего спая термопары, °C; * — опосредованный способ контроля температуры.



Матеріал, захищений авторським правом

тельная) погрешность определения температуры для всех типов термодатчиков составила в диапазоне от 50 до 0 °С не более 0,8 °С (1,6%) и от 0 до –200 °С – 2,8 °С (1,4%) соответственно. Величина погрешности определения температуры при калибровке представленных термодатчиков согласно общепринятому методу значительно превышает величину погрешности, полученную предложенным способом. К тому же для реализации установленной точности во всём диапазоне температур в первом случае необходимо около 25 измерений, а в предлагаемом – 3. Влияние индивидуальных свойств различных термодатчиков и особенностей регистрирующих приборов в первом случае устраняется при повторной калибровке во всем температурном диапазоне в течение нескольких часов. В нашем случае достаточно нескольких минут для градуировки при помощи проведения контрольных замеров в одной-двух реперных точках и в случае необходимости ввода поправочного коэффициента к представленным регрессионным уравнениям.

При наличии специализированного усилителя, имеющего плавную подстройку "0", коэффициента усиления, процесс градуировки термодатчиков значительно упрощается. Условие калибровки сводится к одному требованию – подстройке коэффициента усиления к показанию прибора, соответствующему данным, полученным из регрессионного уравнения для используемого термодатчика. Поэтому для термодатчиков, принадлежащих к одному типу, калибровочная зависимость остается без изменений.

Показания на самописце или ЭВМ регистрируются усилителем постоянного тока (УПТ) с минимальным коэффициентом усиления, соответствующим максимальному диапазону измеряемой температуры. Для снятия показаний с терморезистора необходимо использовать добавочное переменное сопротивление, при помощи которого можно регистрировать падение напряжения, отражающее изменение температуры в области термодатчика. Подстройка переменного резистора или коэффициента усиления УПТ к заданным показаниям термодатчика, полученным из регрессионного уравнения, значительно упрощает процесс его градуировки.

Для исключения влияния самой термопары на интенсивность теплообмена между контейнером и хладагентом модифицирована схема измерения: измерительная головка термопары помещается не внутрь контейнера, а снаружи. При таком расположении термопары её масса включается в систему хладагента, а не контейнера [3]. При использовании предложенного непосредственного способа измерения температуры перечисленные выше недостатки термометрического метода не оказывают существенного влияния на измеряемую величину. Для количественного сравнения можно привести пример скорости теплообмена капли 50%-го

0 °C the value of not more than 0.8 °C (1.6%) and from 0 to –200 °C (1.4%), correspondingly.

The value of an error for temperature determination during calibration of the presented thermosensors according to traditional method significantly exceeded the value of error, obtained by the method proposed. In addition with the aim of realization of a certain accuracy within the whole temperature range in the first case 25 measurements are necessary, but in the proposed method we need only 3 ones. The effect of individual properties of various thermosensors and peculiarities of the devices for recording in the first case is removed during the second calibration within the whole temperature range during several hours. In our case we need several minutes for calibration by means of control measurements in one-two datum points and in the case of the necessity to use a correction coefficient in the presented regression equations.

In the presence of specific amplifier with "0" smooth tuning coefficient for the calibration process amplification in thermosensors is significantly simplified. Calibration condition consists in one requirement: getting the amplification coefficient close to the indices in device, that corresponds to the data, obtained in a regression equation for the thermosensor, being used. Therefore for the thermosensors of one type calibration the dependence remains without changes.

The indices in a recorder or computer are fixed with the amplifier of a constant current (ACC) with the minimum coefficient for amplification, corresponding to the maximum range of being measured temperature. To take an instrument's readings in thermoresistor it is necessary to use an additional variable resistance, by means of which one can record the tension reduction, reflecting the temperature change in the thermosensor area. Adjustment of variable resistor or coefficient for ACC amplification to specified indices of thermoresistor, obtained from the regression equation, significantly simplifies the process of its calibration.

To exclude the effect of a thermocouple itself on the intensity of heat exchange between the container and coolant the measuring scheme is modified: the measuring head of thermocouple is introduced not into the container, but out of it. At such a thermocouple location its mass is comprised into a coolant system, but not a container [3]. When using the proposed direct way for temperature measuring the mentioned above disadvantages of a thermometer method do not significantly affect the value being measured. For a quantitative comparing we can give an example of heat exchange rate of the drop of 50% glycerol solution (50 μl), put on to preliminarily cooled in liquid nitrogen copper plate($T = -196$ °C). Heat exchange rates made: for traditional measuring method $34.3 \pm 2.2$ and the proposed one: $75.0 \pm 5.9$~symbol P roman C/s. Significant deviation of the compared val-



Матеріал, захищений авторським правом

раствора глицерина (50 мкл), нанесенной на предварительно охлажденную в жидком азоте ($T = -196$ °C) медную пластину. Скорости теплообмена составили: для общепринятого способа измерения 34,3 ± 2,2 °C/c и предложенного — 75,0 ± 5,9 °C/c. Существенное расхождение сравниваемых величин свидетельствует о значительном влиянии хромель-копелевой термопары на измеряемую интенсивность теплообмена. Однако предложенный способ имеет и свои недостатки: плотный контакт между контейнером и хладагентом с включенной в него термопарой ограничивает условия его применения.

**Таблица 2**

**Table 2**

**Зависимость величины скорости охлаждения пластикового капилляра, заполненного 50%-м раствором глицерина, от способа измерения**

**Dependence of a cooling rate value of plastic capillary filled with 50% glycerol solution, on the way of its measuring**

| Диаметр капилляра, мм Capillary diameter, mm | Скорость теплообмена в зависимости от способа измерения Heat exchange rate depending on the measuring way $M \pm m$, °C/c | | Погрешность измерения термометрического метода Error of thermometric method measuring | |
|---|---|---|---|---|
| | термометрический Thermometric | кондуктометрический Conductometric | абсолютная, °C/c An absolute, °C/s | относительная, % Relative, % |
| 0,7 | $105 \pm 5^a$ | $159 \pm 6^b$ | 44 | 33 |
| 1,0 | $83,1 \pm 3,9^c$ | $104 \pm 4,5^a$ | 20,4 | 23 |
| 2,0 | $28 \pm 2,1^d$ | $32,7 \pm 2,4^d$ | 4,7 | 16,8 |

**Примечание**. a, b, c, d — величины, имеющие достоверность различия с вероятностью выше 0,95.

**Note**: a, b, c, d — the values, in those probability of the difference is higher than 0.95

Систематическую погрешность, возникающую при измерении сверхвысоких скоростей теплообмена, можно снизить кондуктометрическим способом, основанном на регистрации электролитической проводимости раствора в зоне эвтектики. Электропроводность регистрируется при помощи тонких металлических электродов ($d = 0,01$ мм). При таком способе измерения скорости теплообмена рабочей зоной становится весь объем раствора, находящегося в капилляре, поскольку именно он является интегральным критерием изменения электропроводности при охлаждении. Так как линейная зависимость электропроводности раствора при понижении температуры наблюдается только при исключении роста кристаллов, используется раствор глицерина с концентрацией 50% (V/V), которая обеспечивает эффект витрификации в широком диапазоне скоростей.

Для определения влияния степени инерционности механической части самописца измерены скорости охлаждения медь-константановой термопары ($d = 0,1$ мм), помещенной непосредственно в жидкий азот, а также между двумя медными пластинами, предварительно охлажденными до температуры −196 °C [9]. Скорости теплообмена регистрировали самописцем и при непосредственном подключении измеряемого сигнала к ЭВМ через аналогово-цифровой преобразователь. Это позволило установить систематическую погрешность механической части самописца, которая проявляется при достижении скоростей охлаждения порядка 500 °C/c и выше.

Для тестирования предлагаемого кондуктометрического метода относительно термометрического проведен анализ результатов охлаждения пластиковых капилляров в жидком азоте (табл. 2). Полученные данные показали, что регистрация высоких и сверхвысоких скоростей теплообмена $B \geq 30$ °C/c

ues testify to a considerable effect of chromel-coppel thermocouple on the measured intensity of heat exchange. However the method proposed also has its disadvantages: a tight contact between container and coolant with thermocouple in it limits the conditions for its application.

Systematic error, appearing when changing ultrahigh heat exchange rates could be reduced by conductometric way, based on the recording of electrolyte conductivity of the solution in an eutectics zone. Electroconductivity is recorded by means of thin metal electrodes (d=0,01mm). Using such a measuring way for heat exchange rate the total volume of the solution being in a capillary becomes a working zone, because it is an integral criterion of electroconductivity change during cooling. Glycerol solution of 50% concentration (V/V), that provides vitrification effect within a wide range of rates is used, because a linear dependence of the solution electroconductivity during the temperature decrease is noted only when excluding the crystals growth.

To determine the effect of the inertia level of a mechanic part in a recorder the cooling rates of copper-constant thermocouple ($d = 0.1$ mm), immerged directly into liquid nitrogen, as well as between two copper plates, preliminarily cooled down to −196 °C, were measured [9]. Heat exchange rates were recorded by means of recorder and during switching the measured signal to computer through analogue-digital transducer. This allowed to determine systematic error of the mechanical part of recorder, that is manifested when achieving cooling rates of about 500 °C/s and higher.

For testing the proposed conductometric method in respect of thermometric one the analysis of cooling results of plastic capillaries in liquid nitrogen was performed (Table 2). The data obtained demonstrated that recording of high and over-high heat exchange rates $B \geq 30$ °C by means of thermometric method



Матеріал, захищений авторським правом

посредством термометрического метода дает превышения относительной погрешности измерения допустимого 5%-го порога.

Таким образом, необходимым условием применения кондуктометрического метода измерения скорости теплообмена, с относительной погрешностью не превышающей 5%, является использование минимальной концентрации криопротектора 40, 30, 20, 20 и 10% при скоростях замораживания (оттаивания) не менее 30 (45), 104 (138), 150 (177), 194 (230) и 310 (380) °С/с соответственно. Предлагаемый метод дает возможность применять его для установления взаимосвязи сохранности биообъекта с изучаемыми параметрами при высоких и сверхвысоких скоростях теплообмена.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Вепшек Я.* Измерение низких температур электрическими методами.– М.: Энергия, 1980.– 224 с.
2. *Гальченко С. Е.* Особенности криоконсервирования биологических объектов с использованием больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1990.– 15 с.
3. *Горбунов Л. В.* Безпосереднє вимірювання теплообміну при надшвидкому охолодженні ооцитів та ембріонів ссавців // НТБ ІТ УААН.– Харків.– 1998.– № 75.– С. 104–108.
4. Горбунов Л. В. Спосіб виміру надвисоких швидкостей заморожування-відтавання ооцитів і ембріонів ссавців // НТБ ІТ УААН.– Харків.– 2001.– № 80.– С. 39–42.
5. *Горбунов Л. В., Морозова И. А., Герасименко Л. Н.* Определение оптимального соотношения скоростей оттаивания к замораживанию, позволяющего реализовать высокую сохранность девитрифицированных эмбрионов млекопитающих // Вісн. ХНУ № 488. Біофіз. вісник.– 2000.– 1(6).– С. 116–118.
6. *Зейдель А. Н.* Погрешности измерений физических величин.– Л.: Наука, 1985.– 112 с.
7. *Пушкарь Н. С., Белоус А. М., Иткин Ю. А. и др.* Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах.– Киев: Наук. думка, 1977.– 243 с.
8. *Тарасов В. Ф.* Влияние быстрого замораживания-отогрева на сохранность гепатоцитов при низкотемпературной криоконсервации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1988.– 22 с.
9. *Пат. 357445А* Україна, МКВ А 01 N 1/00. Пристрій для заморожування-відтавання біооб'єктів / Л. В. Горбунов, М. Д. Безуглий, І. А. Морозова. Заявл. 14.04.98; Опубл. 16.04.01; Бюл. № 3.– 2 с.
10. *Glover A. I., Garith L. S.* The freezing rate of freeze-etch specimens for electron microscopy // Cryobiology.– 1974.– 11, № 3.– P. 248–254.
10. *Schwabe K. G., Terracio Z.* Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing technique // Cryobiology.– 1980.– 17, № 6.– P. 571–584.


Поступила 15.06.2001

showed the exceeding the admissible 5% limit of a relative measuring error.

Thus, the usage of the minimum cryoprotectant concentration: 40, 30, 20, 20 and 10% under freezing (thawing) rates no less than 30(45), 104(138), 150(177), 194(230) and 310(380) °C/s, correspondingly, is an essential condition for conductometric method application for measuring the heat exchange rates with a relative error, not exceeding 5%. Proposed method gives the possibility to apply it for relationship of the bioobject integrity and studied parameters under high and ultra-high heat exchange rates.

## REFERENCES


1. *Vepshek Ya.* Evaluation of low temperatures by electric methods.– M.: Energia, 1980.– 224 p.
2. *Galchenko S. E.* Peculiarities of biological objects cryopreservation using high cooling rates: Author's abstract for candidate degree obtaining (PhD — biology).– Kharkov, 1990.– 15 p.
3. *Gorbunov L. V.* Direct measuring of heat exchange under ultra-high cooling of mammalian oocytes and embryos // Institute of Cattle Breeding of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences.– Kharkov.– 1998.– № 75.– P. 104–108.
4. *Gorbunov L. V.* Measuring way for over-high freeze-thawing rates of mammalian oocytes and embryos // Institute of Cattle Breeding of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences.– Kharkov.– 2001.– № 80.– P. 39–42.
5. *Gorbunov L. V., Morozova I. A., Gerasimenko L. N.* Determination of the optimum ratio of thawing rates to freezing, that allows to realize a high integrity of devitrified mammalian embryos // Vestnik of Kharkov National University N488. Biofizicheskiy vestnik.– 2000.– 1(6).– P. 116–118.
6. *Zejdel A. N.* Errors of the measuring the physical values.– L.: Nauka, 1985.– 112 p.
7. *Pushkar N. S., Belous A. M., Itkin Yu. A. et al.* Low temperature crystallization in biological systems.– Kiev: Naukova Dumka, 1977.– 243 p.
8. *Tarasov V.F.* The effect of a rapid freeze-thawing on the hepatocytes integrity under low temperature preservation // Authors abstract for candidate degree obtaining (PhD — biology).– Kharkov, 1988.– 22 p.
9. *Patent № 357445A* (Ukraine), MKB A 01 N 1/00. Device for freeze-thawing of biological objects / L. V. Gorbunov, M. D. Bezugly, I. A. Morozova. Patented 14.04.98; Published 16.04.01; Bul. № 3.– 2 p.
10. *Glover A. I., Garith L. S.* The freezing rate of freeze-etch specimens for electron microscopy // Cryobiology.– 1974.– 11, № 3.– P. 248–254.
11. *Schwabe K. G., Terracio Z.* Ultrastructural and thermcouple evaluation of rapid freezing technique // Cryobiology.– 1980.– 17, № 6.– P. 571–584.


Accepted in 15.06.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 636.5.082.453

UDC 57.043: 636.5.082.453

# Криоконсервирование спермы петухов
## III. Цитотоксичность и криопротекторная активность смеси N,N-диметилформамида с диолами

О. В. БИЗИКИНА

*НИИ птицеводства УААН, Борки, Харьковская обл.*

Т. П. ЛИННИК

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

# Fowl Sperm Cryopreservation
## III. Citotoxicity and Cryoprotective Activity of N,N-Dimethyl Formamide with Diols Mixture

O. V. BIZIKINA

*Science & Research Institute of Poultry Breeding, Borki, Kharkov region*

T. P. LINNIK

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

Исследовано влияние криопротекторов N,N-диметилформамида (ДМФА), этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД), 2,3-бутандиола (2,3-БД), 2-метоксиэтанола (2-МЭ) и их смесей ДМФА + диол в соотношении 1:1, 1:2, 2:1, а также ДМФА + диол + диол в соотношении 1:1:1 на жизнеспособность спермиев петухов до и после замораживания-оттаивания в диапазоне концентраций от 4 до 10%. Показано, что изученные комбинации ДМФА с диолами оказывают меньшее повреждающее действие на сперматозоиды петухов до замораживания по сравнению с отдельными криопротекторами и обеспечивают высокий уровень морфофункциональной сохранности клеток после криоконсервирования. Лучшие показатели сохранности сперматозоидов после замораживания-оттаивания получены в присутствии смеси криопротекторов следующего состава: ДМФА + ЭГ + 1,2-ПД (10 и 8%) по сравнению с ДМФА (8%) — 58,3; 50,4; 46,4% морфологически целых клеток соответственно. Полученные результаты подтверждают перспективность применения комбинации криопротекторов амид + диол при замораживании спермы петухов.

Вивчено вплив N,N-диметилформаміду (ДМФА), етиленгліколю (ЕГ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), 2,3-бутандіолу (2,3-БД), 2-метоксіетанолу (2-МЕ) та їх сумішей ДМФА + діол у співвідношенні 1:1, 1:2, 2:1, а також ДМФА + діол + діол у співвідношенні 1:1:1 на життєздатність сперміїв півнів до і після заморожування-відтавання у діапазоні концентрацій від 4 до 10%. Показано, що вивчені комбінації ДМФА з діолами менше впливають на сперматозоїди півнів до заморожування у порівнянні з окремими кріопротекторами і забезпечують високий рівень морфофункціональної цілості клітин після кріоконсервування. Кращі показники цілості сперміїв після заморожування-відтавання отримані в присутності суміші кріопротекторів такого складу: ДМФА + ЕГ + 1,2-ПД (10 і 8%) у порівнянні з ДМФА (8%) — 58,3; 50,4; 46,4% морфологічно цілих клітин відповідно. Одержані результати підтверджують перспективність застосування комбінації кріопротекторів амід + діол при заморожуванні сперміїв півнів.

The effect of cryoprotectants of N,N-dimethyl formamide (DMFA), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD), 2,3-butandiol (2,3-BD), 2-metoxyethanol (2-ME) and their mixture: DMFA + diol in the ratio of 1:1, 1:2, 2;1, as well as DMFA + diol + diol in 1:1:1 ratio on fowl spermatozoa viability before and after freeze-thawing within the concentration range from 4 to 10#, was investigated. It was demonstrated, that the studied combinations of DMFA with diols caused a less damaging effect on fowl spermatozoa before freezing in comparison with certain cryoprotectants and provided a high level of cell morphofunctional integrity after cryopreservation. The best indices of spermatozoa integrity after freeze-thawing were obtained at the presence of cryoprotectant mixture of the following composition: DMFA + EG + 1,2-PD (10 and 8%) in comparison with DMFA (8%): 58.3; 50.4; 46.4% of morphologically integral cells, correspondingly. The obtained results confirm the perspective for the application of amide+diol cryoprotectants during fowl sperm cryopreservation.

Важными факторами, обеспечивающими защиту половых клеток от повреждающего действия низких температур, являются состав и свойства криозащитной среды, к основным компонентам которой относятся криопротекторы. Но наряду с по-

The composition and properties of a cryoprotective medium, with cryoprotectants as main components, are some of the important factors, providing the protection of sexual cells from a damaging factor of low temperatures. However along with positive protective



Матеріал, захищений авторським правом

ложительными защитными функциями криопротекторы проявляют цитотоксическое действие на всех этапах криоконсервирования [2, 6, 7, 9]. Поэтому до настоящего времени одной из задач при совершенствовании методов криоконсервирования спермы птиц, и в частности петухов, является поиск новых эффективных криопротекторов или разработка путей снижения токсичности используемых защитных агентов.

Известно [2, 6, 9], что химические соединения амиды и диолы, наиболее широко применяемые в качестве криопротекторов для спермы петухов, обладают уникальными физико-химическими свойствами (высокая энергия взаимодействия с водой, способность к стеклованию, стабильность аморфной фазы при отогреве и т.д.), что обеспечивает перспективность их использования для криоконсервирования как с медленными скоростями замораживания, так и со сверхбыстрыми (витрификация). Однако существенные отличия физико-химических свойств диолов и амидов являются причиной их различной проницаемости через мембраны, характера повреждающего действия, а также обнаруженного дифференцированного цитотоксического эффекта на различные органеллы сперматозоидов петухов [8].

Цель настоящей работы — исследование цитотоксичности и криопротекторной активности комбинаций ДМФА с веществами ряда диолов при криоконсервировании спермы петухов. В опытах использовали петухов пород род-айланд и юрловские голосистые. Сперму получали методом массажа. Для исследований применяли смесь эякулятов нескольких петухов. Свежеполученную сперму разбавляли криозащитной средой в соотношении 1:1 при температуре 20–25 °С и охлаждали до 4 °С в течение 40–45 мин. Состав среды следующий (100 мл/г воды): глутамат натрия -- 2,85, глюкоза — 0,50, инозит — 0,25, ацетат магния — 0,07, ацетат калия — 0,50, поливинилпирролидон (м.м. 12 000) — 0,20, протамин сульфат — 0,028. Осмотичность среды 420 мОсмоль/кг, *pH* 6,8. Все вещества марки "х.ч.".

В охлажденную до 4 °С суспензию клеток добавляли раствор криопротекторов в той же среде в соотношении 2:1. В качестве криопротекторов были изучены отдельные вещества и смеси: ДМФА с ЭГ, 1,2-ПД, 2,3-БД и 2-МЭ в диапазоне концентраций от 4 до 10%. Соотношение веществ в смесях указано в таблицах. Все вещества марки "ч.д.а" или "х.ч." дополнительно очищали вакуумной перегонкой (1–2 мм рт.ст.).

После второго разбавления сперму помещали в маркированные полиэтиленовые пайеты объемом 0,25 мл и замораживали со скоростью охлаждения 3 °С/мин до начала кристаллизации, выдерживали 1–3 мин на плато кристаллизации, затем замораживали со скоростью 25–30 °С/мин до –20 °С, со скоростью 70 °С/мин до –80 °С, далее погружали в

functions cryoprotectants manifest a cytotoxical effect at all stages of cryopreservation [2, 6, 7, 9]. Therefore till now the search for new effective cryoprotectants or the development of ways for toxicity decrease in the used protective agents is one of the tasks, when improving the methods for poultry, fowl in particular, sperm cryopreservation.

It is known [2, 6, 9], that amides and diols chemical compound, widely applied as cryoprotectants for fowl sperm, have the unique chemical and physical properties (high energy of interaction with water, the capability for vitrification, stability of amorphous phase during thawing, etc), that provides the perspective of their usage for cryopreservation both with slow freezing rates and with extra-rapid ones (vitrification). However the considerable differences of diol and amide physical and chemical properties are the cause of their different permeability through membranes, the character of a damaging effect, as well as the revealed differentiated cytotoxical effect on various organelles of fowl spermatozoa [8].

The aim of this work was to investigate the cytotoxicity and cryoprotective activity of DMFA combination with the substances of diol series at fowl sperm cryopreservation. Fowls of rod-island and Yurlov loud-voiced breeds were used for the experiments. Sperm was obtained using the massage method. For investigations we applied an ejaculate mixture of several fowls. Freshly obtained sperm was diluted with a cryoprotective medium in the 1:1 ratio at the temperature of 20–25 °C and cooled down to 4 °C within 40–45 min. Medium composition (100 mg/g of water) was the following: sodium glutamate — 2.85, glucose — 0.50, inosite — 0.25, magnesium acetate — 0.07, potassium acetate — 0.50, polyvinyl pyrrolidon (m.m. 12 000) — 0.20, protamine sulfate — 0.028. Medium osmoticity was 420 mOsm/kg, *pH* 6.8. All the substances were of "chemically pure" label.

In the cooled down to 4 °C cell suspension one added the solution of cryoprotectants in the same medium with the 2:1 ratio. As cryoprotectants we studied certain substances and mixtures such as DMFA with EG, 1,2-PD, 2,3-BD and 2-ME within the concentration range from 4 to 10%. The substance ratio in mixtures is mentioned in the tables. All the substances of "chemically pure for analysis" or "chemically pure" were additionally purified by means of vacuum distillation (1–2 mm of mercury column).

After second dilution the sperm was placed into the labeled 0.25 ml polyethylene pailletes and frozen with 3 °C/min cooling rate down to the crystallisation beginning, then frozen with 25–30 °C/min rate down to –20 °C, with 70 °C/min down to –80 °C, then immersed into a liquid nitrogen. Cooling and freezing were carried-out using a programmable freezer UOP-3 (Special Designing and Technical Bureau of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine), freeze-thawing was performed in thermostat at 40 °C.



Матеріал, захищений авторським правом

жидкий азот. Охлаждение и замораживание проводили на программном замораживателе УОП-3 (СКТБ ИПКиК НАНУ), размораживали в термостате при 40 °С. Жизнеспособность сперматозоидов до и после замораживания оценивали общепринятыми методами по подвижности, переживаемости [1] и количеству морфологически поврежденных и целых клеток с использованием прижизненного окрашивания спермиев этидиум бромидом и тиазиновым красным [4] . Показатель переживаемости рассчитывали по формуле

$$A = \sum \frac{a_n + a_{n-1}}{2} \cdot \tau ,$$

где $a_n$ и $a_{n-1}$ — подвижность спермиев, определяемая через равные промежутки времени; $\tau$ — время между измерениями подвижности. Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Фишера–Стьюдента.

В первой серии экспериментов были изучены смеси ДМФА с диолами следующего состава: ДМФА + диол в соотношении 1:1; 1:2; 2:1, а также ДМФА + диол + диол в соотношении 1:1:1 при замораживании спермы петухов породы юрловские голосистые. Общая концентрация смеси веществ в суспензии клеток составляла 8% [5]. Результаты исследования представлены в табл. 1. Как видно из полученных данных, с введением в состав смеси 2-МЭ в любых концентрациях резко снижалась подвижность сперматозоидов как до, так и после замораживания-оттаивания. Уже до замораживания 2-МЭ в комбинации с ДМФА повреждал около 70% клеток в течение 30 мин инкубации. После замораживания-оттаивания эти смеси не обеспечивали выживаемости даже 20% спермиев. Подобный результат наблюдался и с тройными смесями веществ, если одним из компонентов являлся 2-МЭ (табл. 1). Использование 2,3-БД с ДМФА в любых соотношениях также приводило к достоверному снижению морфологической сохранности клеток, несмотря на то, что подвижными до замораживания оставались до 80% сперматозоидов. Лучший результат получен для криопротекторов ДМФА + 2,3-БД при соотношении 2:1. Все остальные изученные комбинации веществ обеспечивают более высокую сохранность сперматозоидов после замораживания-оттаивания, но достоверной разницы между ними не выявлено.

Дальнейшее изучение криопротекторной активности смесей диолов с ДМФА в сравнении с отдельными веществами проведено на более устойчивой к действию низких температур сперме петухов породы род-айланд [3] в диапазоне общей концентрации от 4 до 10%. Из приведенных в табл. 2 данных наблюдается четкая корреляция повреждающего дей-

Spermatozoa viability before and after freezing was estimated by commonly used methods according to the motility, survival [1] and a number of morphologically damaged and integral cells, using the spermatozoa staining during life by ethidium bromide and thiasine red [4]. Survival index was calculated according to the formulae

$$A = \sum \frac{a_n + a_{n-1}}{2} \cdot \tau ,$$

where $a_n$ and $a_{n-1}$ was spermatozoa motility, determined within equal time periods, $\tau$ — time between motility measurements. Statistical processing of the results obtained was accomplished using the Fisher–Student's method.

At the first series of the experiments we studied the mixture of DMFA with diols of the following composition: DMFA + diol in 1:1; 1:2; 2:1 ratio, as well as DMFA + diol + diol in 1:1:1 ratio when freezing fowl sperm of Yurlov loud-voiced breed. Total concentration of substances mixture in cell suspension made 8% [5]. The investigation results are presented in the Table 1. As it is seen from the data obtained, when introducing 2-ME in the mixture composition in any concentrations, there was a decrease in spermatozoa motility both before and after freeze-thawing. Even before freezing 2-ME damaged about 70% of cells within 30 min of incubation. After freeze-thawing these mixtures did not provide the viability even of 20% of spermatozoa. The similar result was observed with triple mixtures of substances as well, if one of the components was 2-ME (Table 1). The usage of 2,3-BD with DMFA in any ratios also resulted in a considerably true decrease in cell morpho-

**Table 1**

**Effect of DMFA with diol mixture on the integrity of fowl spermatozoa during cryopreservation process**

| Mixture composition | Substance ratio in the mixture | Motility, % | | Number of morphologically integral cells, % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Before freezing | After freezing | Before freezing | After freezing |
| DMFA + EG | 1:1 | 70 ± 6 | 40 ± 4 | 59.8 ± 8.1 | 30.1 ± 3.8 |
| EG | 2:1 | 80 ± 7 | 40 ± 3 | 55.1 ± 7.6 | 26.2 ± 2.8 |
| EG | 1:2 | 80 ± 6 | 30 ± 5 | 52.7 ± 4.8 | 26.4 ± 2.8 |
| 1,2-PD | 1:1 | 70 ± 5 | 30 ± 5 | 59.3 ± 6.6 | 28.0 ± 6.9 |
| 1,2-PD | 2:1 | 60 ± 4 | 30 ± 5 | 49.1 ± 5.7 | 29.7 ± 4.2 |
| 1,2-PD | 1:2 | 70 ± 5 | 40 ± 4 | 62.1 ± 5.5 | 25.0 ± 3.3 |
| 2,3-BD | 1:1 | 80 ± 6 | 20 ± 5 | 46.4 ± 4.4 | 20.2 ± 2.4 |
| 2,3-BD | 2:1 | 70 ± 5 | 50 ± 6 | 48.2 ± 3.8 | 27.1 ± 1.8 |
| 2,3-BD | 1:2 | 60 ± 5 | 20 ± 5 | 47.4 ± 4.6 | 21.8 ± 1.4 |
| 2-ME | 1:1 | 10 | 5 | 32.3 ± 3.8 | 16.9 ± 2.6 |
| 2-ME | 2:1 | 10 | 5 | 32.4 ± 4.3 | 17.1 ± 3.8 |
| 2-ME | 1:2 | 10 | 0 | 30.8 ± 3.5 | 17.9 ± 1.1 |
| 2-ME + EG | 1:1:1 | 10 | 5 | 50.3 ± 6.4 | 21.7 ± 2.1 |
| 2-ME + 1,2-PD | 1:1:1 | 10 | 5 | 44.4 ± 4.5 | 22.7 ± 3.8 |
| 2-ME + 2,3-BD | 1:1:1 | 10 | 5 | 38.9 ± 6.6 | 21.9 ± 4.8 |
| 2-EG + 1,2-PD | 1:1:1 | 90 ± 7 | 40 ± 5 | 51.1 ± 4.9 | 30.7 ± 3.8 |
| EG + 2,3-BD | 1:1:1 | 80 ± 6 | 30 ± 5 | 60.9 ± 5.5 | 28.8 ± 3.1 |

**Note.** Total concentration of the mixture of substances in cell suspension is 8%, incubation time is 30 min.



Матеріал, захищений авторським правом

ствия отдельных веществ ДМФА, ЭГ и 1,2-ПД от концентрации до замораживания. При инкубации сперматозоидов с 10%-ми растворами веществ в течение 30 мин остаются морфологически целыми

**Таблица 1**

**Влияние смеси N,N-ДМФА с диолами на сохранность спермиев петухов в процессе криоконсервирования**

| Состав смеси веществ | Соотношение веществ в смеси | Подвижность, % | | Количество морфологически целых клеток, % | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | до замораживания | после замораживания | до замораживания | после замораживания |
| ДМФА + ЭГ | 1:1 | 70 ± 6 | 40 ± 4 | 59,8 ± 8,1 | 30,1 ± 3,8 |
| ЭГ | 2:1 | 80 ± 7 | 40 ± 3 | 55,1 ± 7,6 | 26,2 ± 2,8 |
| ЭГ | 1:2 | 80 ± 6 | 30 ± 5 | 52,7 ± 4,8 | 26,4 ± 2,8 |
| 1,2-ПД | 1:1 | 70 ± 5 | 30 ± 5 | 59,3 ± 6,6 | 28,0 ± 6,9 |
| 1,2-ПД | 2:1 | 60 ± 4 | 30 ± 5 | 49,1 ± 5,7 | 29,7 ± 4,2 |
| 1,2-ПД | 1:2 | 70 ± 5 | 40 ± 4 | 62,1 ± 5,5 | 25,0 ± 3,3 |
| 2,3-БД | 1:1 | 80 ± 6 | 20 ± 5 | 46,4 ± 4,4 | 20,2 ± 2,4 |
| 2,3-БД | 2:1 | 70 ± 5 | 50 ± 6 | 48,2 ± 3,8 | 27,1 ± 1,8 |
| 2,3-БД | 1:2 | 60 ± 5 | 20 ± 5 | 47,4 ± 4,6 | 21,8 ± 1,4 |
| 2-МЭ | 1:1 | 10 | 5 | 32,3 ± 3,8 | 16,9 ± 2,6 |
| 2-МЭ | 2:1 | 10 | 5 | 32,4 ± 4,3 | 17,1 ± 3,8 |
| 2-МЭ | 1:2 | 10 | 0 | 30,8 ± 3,5 | 17,9 ± 1,1 |
| 2-МЭ + ЭГ | 1:1:1 | 10 | 5 | 50,3 ± 6,4 | 21,7 ± 2,1 |
| 2-МЭ + 1,2-ПД | 1:1:1 | 10 | 5 | 44,4 ± 4,5 | 22,7 ± 3,8 |
| 2-МЭ + 2,3-БД | 1:1:1 | 10 | 5 | 38,9 ± 6,6 | 21,9 ± 4,8 |
| ЭГ + 1,2-ПД | 1:1:1 | 90 ± 7 | 40 ± 5 | 51,1 ± 4,9 | 30,7 ± 3,8 |
| ЭГ + 2,3-БД | 1:1:1 | 80 ± 6 | 30 ± 5 | 60,9 ± 5,5 | 28,8 ± 3,1 |

**Примечание**. Общая концентрация смеси веществ в суспензии клеток 8%, время инкубации 30 мин.

**Таблица 2**

**Зависимость сохранности спермиев петухов от общей концентрации исследуемых веществ и их смесей до и после замораживания-оттаивания**

| Вещества и их комбинации | Концентрация, % | Соотношение веществ в смеси | Подвижность, % | | Количество морфологически целых клеток, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | до замораживания | после замораживания | до замораживания | после замораживания |
| ДМФА | 4 | | 70 ± 6 | 40 ± 5 | 71,3 ± 1,3 | 31,3 ± 0,8 |
| ЭГ | 4 | | 80 ± 7 | 40 ± 6 | 71,0 ± 1,3 | 29,0 ± 0,6 |
| 1,2-ПД | 4 | | 80 ± 7 | 30 ± 5 | 66,0 ± 2,1 | 30,6 ± 0,8 |
| ДМФА | 8 | | 70 ± 5 | 50 ± 6 | 57,8 ± 2,8 | 45,1 ± 2,3 |
| ЭГ | 8 | | 70 ± 6 | 50 ± 5 | 56,7 ± 2,9 | 46,4 ± 2,0 |
| 1,2-ПД | 8 | | 80 ± 7 | 40 ± 5 | 52,4 ± 2,3 | 38,2 ± 2,6 |
| ДМФА | 10 | | 60 ± 5 | 50 ± 5 | 54,8 ± 1,1 | 27,0 ± 0,5 |
| ЭГ | 10 | | 60 ± 7 | 30 ± 5 | 52,8 ± 1,1 | 27,8 ± 0,9 |
| 1,2-ПД | 10 | | 60 ± 8 | 60 ± 7 | 54,2 ± 1,0 | 31,9 ± 1,9 |
| ДМФА + 1,2-ПД | 4 | 1:1 | 90 ± 8 | 40 ± 5 | 73,2 ± 1,9 | 26,8 ± 0,5 |
| 1,2-ПД | 4 | 2:1 | 80 ± 6 | 40 ± 5 | 74,8 ± 1,7 | 33,7 ± 1,2 |
| ЭГ | 4 | 1:2 | 80 ± 6 | 40 ± 5 | 71,0 ± 1,1 | 33,4 ± 0,5 |
| ЭГ + 1,2-ПД | 4 | 1:1:1 | 80 ± 5 | 40 ± 5 | 78,0 ± 0,9 | 31,1 ± 1,9 |
| ЭГ + 2,3-БД | 4 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 30 ± 5 | 68,8 ± 1,8 | 25,0 ± 1,6 |
| ДМФА + 1,2-ПД | 8 | 1:1 | 80 ± 7 | 60 ± 7 | 78,8 ± 1,9 | 47,3 ± 2,2 |
| 1,2-ПД | 8 | 2:1 | 80 ± 6 | 60 ± 6 | 71,4 ± 1,5 | 42,2 ± 1,5 |
| ЭГ | 8 | 1:2 | 80 ± 7 | 40 ± 5 | 68,7 ± 1,1 | 47,6 ± 1,9 |
| ЭГ + 1,2-ПД | 8 | 1:1:1 | 80 ± 5 | 60 ± 5 | 71,7 ± 1,7 | 50,4 ± 3,5 |
| ЭГ + 2,3-БД | 8 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 40 ± 5 | 64,4 ± 2,2 | 45,6 ± 1,9 |
| ДМФА + 1,2-ПД | 10 | 1:1 | 80 ± 6 | 50 ± 5 | 67,0 ± 1,7 | 45,3 ± 0,9 |
| 1,2-ПД | 10 | 2:1 | 70 ± 5 | 40 ± 5 | 62,3 ± 1,3 | 46,8 ± 1,1 |
| ЭГ | 10 | 1:2 | 70 ± 7 | 50 ± 5 | 63,1 ± 1,4 | 48,2 ± 1,5 |
| ЭГ + 1,2-ПД | 10 | 1:1:1 | 70 ± 6 | 60 ± 7 | 69,7 ± 2,2 | 58,3 ± 1,2 |
| ЭГ + 2,3-БД | 10 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 50 ± 5 | 51,7 ± 2,1 | 44,6 ± 1,1 |

logical integrity, in spite of the fact, that up to 80% of spermatozoa remained motile before freezing. The best result was obtained for DMFA + 2,3-BD cryoprotectants at 2:1 ratio. The rest studied combinations of substances provide higher spermatozoa integrity after freeze-thawing, but we revealed no statistically true difference between them.

Further study of cryoprotective activity for diol with DMFA mixtures in comparison with certain substances was carried-out in more resistant to low temperature effect fowl sperm of rod-island breed [3] within the range of total concentration from 4 to 10%. The Table 2 demonstrates, that there is a distinct correlation of a damaging effect of certain substances of DMFA, EG and 1,2-PD from concentration before freezing. When incubating spermatozoa with 10% solutions of substances within 30 min. not more than 55% of cells remain morphologically integral. After freeze-thawing up to 45% of morphologically whole cells are preserved at 8% final concentration of certain substances in cell suspension. The same dependence is also observed for investigated combinations of DMFA with diols, with an increase in total concentration of substances in cell suspension there is an augmentation of their cytotoxicity before freezing. However it should be noted, that both double, triple mixtures of DMFA with EG and 1,2-PD are statistically and significantly less damage spermatozoa at equilibration stage before freezing in comparison with some substances, up to 70–75% of morphologically integral cells remain under all studied concentrations. Higher motility of fowl spermatozoa is observed at the presence of the mentioned mixtures even at 10% concentration in comparison with certain substances.

After freeze-thawing an increase in fowl sperm morphological integrity with the augmentation of total concentration of cryoprotectant mixture in cell suspension is noted. Thereat a triple combination of cryoprotec-



Матеріал, захищений авторським правом

не более 55% клеток. После замораживания-оттаивания сохраняется до 45% морфологически целых клеток при конечной концентрации отдельных веществ в суспензии клеток 8%. Подобная зависимость наблюдается и для исследованных комбинаций ДМФА с диолами, с увеличением общей концентрации веществ в суспензии клеток повышается их цитотоксичность до замораживания. Однако следует отметить, что и двойные и тройные смеси ДМФА с ЭГ и 1,2-ПД достоверно меньше повреждают сперматозоиды на этапе эквилибрации до замораживания по сравнению с отдельными веществами, остаются до 70–75% морфологически целых клеток при всех изученных концентрациях. Наблюдается более высокая подвижность сперматозоидов петухов в присутствии указанных смесей даже при концентрации 10% по сравнению с отдельными веществами.

После замораживания-оттаивания отмечается повышение морфологической целостности спермы петухов с увеличением общей концентрации смеси криопротекторов в суспензии клеток. При этом более высокую морфологическую сохранность сперматозоидов от действия низких температур обеспечивает тройная комбинация криопротекторов ДМФА + ЭГ + 1,2-ПД в соотношении 1:1:1 при общей концентрации 8 и 10% (50,4 и 58,3% целых клеток соответственно). Эти данные достоверно выше результатов, полученных как с другими исследованными смесями, так и с отдельными криопротекторами (табл. 2). Как видно из проведенных исследований, изученные смеси ДМФА с диолами оказывают меньшее повреждающее действие на спермии петухов до замораживания и обеспечивают высокий уровень морфологической сохранности сперматозоидов, превышающий результаты, полученные с использованием отдельных криопротекторов. К такому же выводу приводит исследование переживаемости спермы петухов после замораживания-оттаивания под защитой смесей ДМФА с диолами в изученном диапазоне концентраций (табл. 3).

Смеси криопротекторов на основе ДМФА и диолов надежно защищают сперматозоиды от действия низких температур, после размораживания в течение 6 ч остается до 20% подвижных клеток. Лучшие результаты получены со смесью ДМФА и 1,2-ПД, а также с тройной комбинацией ДМФА + ЭГ + 1,2-ПД, что подтверждает данные исследования морфологической сохранности сперматозоидов в процессе криоконсервирования под их защитой. Таким образом, показано, что смеси ДМФА с диолами по криопротекторной активнос-

**Table 2**

**Dependence of fowl spermatozoa integrity on total concentration of studied substances and their mixtures before and after freeze-thawing**

| Mixture composition | Concentration, % | Substance ratio in the mixture | Motility, % | | Number of morphologically integral cells, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Before freezing | After freezing | Before freezing | After freezing |
| DMFA | 4 | | 70 ± 6 | 40 ± 5 | 71.3 ± 1.3 | 31.3 ± 0.8 |
| EG | 4 | | 80 ± 7 | 40 ± 6 | 71.0 ± 1.3 | 29.0 ± 0.6 |
| 1,2-PD | 4 | | 80 ± 7 | 30 ± 5 | 66.0 ± 2.1 | 30.6 ± 0.8 |
| DMFA | 8 | | 70 ± 5 | 50 ± 6 | 57.8 ± 2.8 | 45.1 ± 2.3 |
| EG | 8 | | 70 ± 6 | 50 ± 5 | 56.7 ± 2.9 | 46.4 ± 2.0 |
| 1,2-PD | 8 | | 80 ± 7 | 40 ± 5 | 52.4 ± 2.3 | 38.2 ± 2.6 |
| DMFA | 10 | | 60 ± 5 | 50 ± 5 | 54.8 ± 1.1 | 27.0 ± 0.5 |
| EG | 10 | | 60 ± 7 | 30 ± 5 | 52.8 ± 1.1 | 27.8 ± 0.9 |
| 1,2-PD | 10 | | 60 ± 8 | 60 ± 7 | 54.2 ± 1.0 | 31.9 ± 1.9 |
| DMFA + 1,2-PD | 4 | 1:1 | 90 ± 8 | 40 ± 5 | 73.2 ± 1.9 | 26.8 ± 0.5 |
| 1,2-PD | 4 | 2:1 | 80 ± 6 | 40 ± 5 | 74.8 ± 1.7 | 33.7 ± 1.2 |
| EG | 4 | 1:2 | 80 ± 6 | 40 ± 5 | 71.0 ± 1.1 | 33.4 ± 0.5 |
| EG + 1,2-PD | 4 | 1:1:1 | 80 ± 5 | 40 ± 5 | 78.0 ± 0.9 | 31.1 ± 1.9 |
| EG + 2,3-BD | 4 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 30 ± 5 | 68.8 ± 1.8 | 25.0 ± 1.6 |
| DMFA + 1,2-PD | 8 | 1:1 | 80 ± 7 | 60 ± 7 | 78.8 ± 1.9 | 47.3 ± 2.2 |
| 1,2-PD | 8 | 2:1 | 80 ± 6 | 60 ± 6 | 71.4 ± 1.5 | 42.2 ± 1.5 |
| EG | 8 | 1:2 | 80 ± 7 | 40 ± 5 | 68.7 ± 1.1 | 47.6 ± 1.9 |
| EG + 1,2-PD | 8 | 1:1:1 | 80 ± 5 | 60 ± 5 | 71.7 ± 1.7 | 50.4 ± 3.5 |
| EG + 2,3-BD | 8 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 40 ± 5 | 64.4 ± 2.2 | 45.6 ± 1.9 |
| DMFA + 1,2-PD | 10 | 1:1 | 80 ± 6 | 50 ± 5 | 67.0 ± 1.7 | 45.3 ± 0.9 |
| 1,2-PD | 10 | 2:1 | 70 ± 5 | 40 ± 5 | 62.3 ± 1.3 | 46.8 ± 1.1 |
| EG | 10 | 1:2 | 70 ± 7 | 50 ± 5 | 63.1 ± 1.4 | 48.2 ± 1.5 |
| EG + 1,2-PD | 10 | 1:1:1 | 70 ± 6 | 60 ± 7 | 69.7 ± 2.2 | 58.3 ± 1.2 |
| EG + 2,3-BD | 10 | 1:1:1 | 60 ± 5 | 50 ± 5 | 51.7 ± 2.1 | 44.6 ± 1.1 |

tants of DMFA + EG + 1,2-PD in 1:1 ratio under total concentration of 8 and 10% (50.4 and 58.3%, correspondingly) provides the higher physiological integrity of spermatozoa at low temperature effect. These data are statistically and significantly higher than the results, obtained both with another studied mixtures and with certain cryoprotectants (Table 2). The investigations conducted show, that the studied mixtures of DMFA with diols cause a less damaging effect on fowl spermatozoa before freezing and provide a high level of spermatozoa morphological integrity, exceeding the results, obtained by using certain cryoprotectants. The investigation of fowl sperm survival after freeze-thawing under protection of DMFA mixture with diols within the range of studied concentrations leads to the similar conclusion (Table 3).

Cryoprotectant mixtures at the base of DMFA and diols reliably protect spermatozoa from low temperature effect, up to 20% of motile cells remain after freeze-thawing within 6 hours. The best results were obtained with DMFA and 1,2-PD mixture, as well as with triple combination of DMFA + EG + 1,2-PD, that confirmed the data of investigation of spermatozoa morphological integrity during cryopreservation process under their protection.

Thus, it was shown, that DMFA mixtures with diols surpassed on cryoprotective activity the certain cryoprotectants. The results obtained testify to the perspective for applying complex compositions of



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 3**

**Переживаемость спермиев петуха после замораживания-оттаивания под защитой исследуемых веществ и их смесей**

| Вещества и состав их смесей | Соотношение веществ в смеси | Показатель переживаемости спермиев (усл. ед.) при различных концентрациях веществ и их смесей, % | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 4 | 8 | 10 |
| ДМФА | | 95 | 155 | 75 |
| ЭГ | | 55 | 130 | 105 |
| 1,2-ПД | | 100 | 145 | 95 |
| ДМФА + | | | | |
| 1,2-ПД | 1:1 | 75 | 150 | 100 |
| 1,2-ПД | 2:1 | 75 | 160 | 105 |
| ЭГ | 1:2 | 110 | 145 | 95 |
| ЭГ + 1,2-ПД | 1:1:1 | 160 | 165 | 170 |
| ЭГ + 2,3-БД | 1:1:1 | 25 | 75 | 95 |

ти превосходят отдельно взятые криопротекторы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения сложных композиций криопротекторов, что позволяет не только снизить их токсичность, но и повысить уровень как морфологической, так и функциональной сохранности сперматозоидов после замораживания-оттаивания.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е.* Искусственное осеменение.– М.: Агропромиздат, 1987.– 29 с.
2. *Линник Т. П.* Амиды алифатических кислот — эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 2.– С. 22–32.
3. *Линник Т. П., Грищенко В. И., Артеменко А. Б., Терещенко А. В.* Влияние длительного низкотемпературного хранения спермы петухов на оплодотворяющую способность // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 64–71.
4. *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.
5. *Терещенко А. В., Сахацкий Н. И., Артеменко А. Б.* Технология замораживания спермы петухов // Птицеводство.– 1991.– № 5.– С. 10–11.
6. *Bandot A., Boutron P.* Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 187–199.
7. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– 27, № 3.– P. 247–268.
8. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morfology of frozen and thawed fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc.– 1984.– 25, № 4.– P. 547–553.
9. *Mehl P., Boutron P.* Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. II. Ternary systems with water, 1,2- propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol // Cryobiology.– 1987.– 24.– P. 355–367.



Поступила 27.02.2001


**Table 3**

**Fowl spermatozoa survival after freeze-thawing under protection of studied substances and their mixtures**

| Substances and composition of their mixtures | Substance ratio in the mixture | Index of spermatozoa survival (relative units) under different concentrations of substances and their mixtures, % | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 4 | 8 | 10 |
| DMFA | | 95 | 155 | 75 |
| EG | | 55 | 130 | 105 |
| 1,2-PD | | 100 | 145 | 95 |
| DMFA + | | | | |
| 1,2-PD | 1:1 | 75 | 150 | 100 |
| 1,2-PD | 2:1 | 75 | 160 | 105 |
| EG | 1:2 | 110 | 145 | 95 |
| EG + 1,2-PD | 1:1:1 | 160 | 165 | 170 |
| EG + 2,3-BD | 1:1:1 | 25 | 75 | 95 |

cryoprotectants, that allows not only to reduce their toxicity, but to increase the level of both morphological and functional spermatozoa integrity after freeze-thawing.

## REFERENCES


1. *Kurbatov A. D., Narubina L. E.* Artificial insemination.– M.: Agropromizdat, 1987.– 29 p.
2. *Linnik T. P.* Amides of aliphatic acids are efficient cryoprotectants. II. Cryoprotective properties of compounds of amides series // Problemy kriobiologii.– 1999.– № 2.– P. 22–32.
3. *Linnik T. P., Grischenko V. I., Artemenko A. B., Tereschenko A. V.* Effect of long-term low temperature storage of fowl sperm on fertilising ability // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 3.– P. 64–71.
4. *Sakhatsky N. I., Tereschenko A. V., Artemenko A. B.* Express-method for estimation of frozen-thawed poultry sperm fertilising ability // Selskokhozyajstvennaya biologiya.– 1987.– № 12.– P. 77–80.
5. *Tereschenko A. V., Sakhatsky N. I., Artemenko A. B.* Technology for fowl sperm freezing // Ptitsevodstvo.– 1991.– № 5.– P. 10–11.
6. *Bandot A., Boutron P.* Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide // Cryobiology.– 1998.– 37.– P. 187–199.
7. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– 27, № 3.– P. 247–268.
8. *Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y.* Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa // Brit. Poultry Sc.– 1984.– 25, № 4.– P. 547–553.
9. *Mehl P., Boutron P.* Glass-forming tendency and stability of the amorphous state in the aqueous solutions of linear polyalcohols with four carbons. II. Ternary systems with water, 1,2-propanediol or 1,3-butanediol or 2,3-butanediol // Cryobiology.– 1987.– 24.– P. 355–367.



Accepted in 27.02.2001





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.112.083: 591.146: 57.043

UDC 577.112.083: 591.146: 57.043

# Антиоксидантні властивості лактоферину з нативного, замороженого та ліофілізованого молозива корів

Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ, С.Є. ГАЛЬЧЕНКО, К. С. ГАЛЬЧЕНКО
*Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків*

# Antioxidative Properties of Lactoferrin Derived from Native, Frozen and Lyophilized Bovine Colostrum

B. P. SANDOMIRSKY, S. E. GALCHENKO, E. S. GALCHENKO
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Вивчався вплив лактоферину (ЛФ) з нативного, замороженого та ліофілізованого молозива корів на інтенсивність вільнорадикальних процесів у модельних системах. Показано, що ЛФ, незалежно від джерела отримання, є ефективним хелатором заліза та зменшує інтенсивність перекисних процесів. Встановлено, що антиоксидантні властивості ЛФ із ліофілізованого молозива залишаються незмінними протягом 12 міс при зберіганні сухого молозива в відповідних умовах.

Изучалось влияние лактоферрина (ЛФ) из нативного, замороженного и лиофилизированного молозива коров на интенсивность свободнорадикальных процессов в модельных системах. Показано, что ЛФ, независимо от источника его получения, является эффективным хелатором железа и уменьшает интенсивность перекисных процессов. Установлено, что антиоксидантные свойства ЛФ из лиофилизированного молозива остаются неизменными на протяжении 12 мес хранения сухого молозива в соответствующих условиях.

The effect of lactoferrin (LF) derived from native, frozen and lyophilized bovine colostrum on the intensity of free-radical processes in modeling systems has been investigated. It was shown that LF, not depending on the source of its obtaining, was an efficient iron chelator and decreases intensity of peroxidative processes. It was established, that antioxidative properties of LF from lyophilized colostrum have remained unchangeable within 12 months of storage of dry colostrum under proper conditions.

За літературними даними ЛФ є секреторним компонентом клітин залозистого епітелію та виявляється в деяких секретах людини (кишковому, сльозах, жовчі), у тканинах (передміхуровій залозі, селезінці та ін.), а також міститься у молоці, а особливо багато його як у жіночому молозиві, так і у молозиві корів [4, 10]. Це свідчить про його важливу роль в організмі. Він приймає участь в обміні речовин, регуляції клітинної проліферації, імунній відповіді, а також має ряд інших властивостей [5, 6, 8, 9], зокрема здатність зв'язувати іони заліза [1].

Іони заліза, особливо $Fe^{2+}$, є ефективними каталізаторами генерації активних форм кисню (синглетний кисень, гідроксильний радикал та ін.), присутність яких у клітині приводить до розвитку вільнорадикальних процесів, у тому числі перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) біомембран [2, 3]. Двовалентне залізо ініціює також реакцію розгалуження ланцюга ПОЛ. Ці факти зумовлюють необхідність виведення надмірного заліза з організму, основна частина якого накопичується в складі феритину та гемосидерину, де залізо знаходиться в каталітично неактивній формі, а його друга частина — у вигляді легко дисоціюючих комплексів, а отже може проявляти свої каталітичні властивості. Це залізо доступне для хелаторів [2].

У клінічній практиці як хелатори заліза використовуються і синтезовані препарати, і препарати природного походження [2]. У зв'язку з високим вмістом ЛФ молозиво корів може бути ефектив-

According to literature data, LF is a secretory component of glandular epithelial cells and has been determined in some human being secretes (intestine, tears, bile) and tissues (prostate, spleen etc.), as well as in milk, especially both in women and bovine colostrum [4, 10]. This testifies to its important role in an organism. LF participates in metabolism of substances, regulation of cellular proliferation, immune response, as well as possesses many other properties [5, 6, 8, 9], in particular, capability to bind an iron ions [1].

Iron ions, especially $Fe^{2+}$ are efficient catalysts for the generation of active oxygen forms (syngenic oxygen, hydroxyl radical etc.), the presence of those in a cell results in the development of free-radical processes, as well as biomembrane lipid peroxidation (LPO) [2, 3]. Bivalent iron also initiates the reaction of chain branching in LPO. These facts stipulate the necessity to remove an excessive iron from an organism, main part of those has been accumulated in ferritin and hemosiderin, where there is iron in inactive form, and its another part is presented by easily dissociated complexes, therefore can manifest its catalytic properties. This iron is accessible for chelators [2]. Both synthesized preparations and natural ones can be iron chelators in clinics [2]. Due to a high LF content, bovine colostrum can be an efficient regulator of iron amount in a human organism, and therefore, have a positive effect for diseases, characterized by the LPO activation.



Матеріал, захищений авторським правом

ним регулятором кількості заліза в організмі людини, а отже мати позитивний вплив при захворюваннях, що характеризуються активацією ПОЛ.

Мета роботи — вивчення впливу антиоксидантних властивостей ЛФ з молозива корів і вплив на неї ліофілізації та заморожування.

У роботі використовували молозиво корів 2–3-ї діб лактації, яке отримували за методом [4]. Молозиво центрифугували на протязі 15 хв при 3 000 об/хв. Отриману плазму підкисляли розчином HCl до *pH* 4,6, центрифугуванням розділяли на препарат казеїну (осад) і сироватку. З сироватки після підлужування NaOH до *pH* 8,0 сульфатом амонію (від 30 до 80% насичення) осаджували фракцію білків, що містить ЛФ. Осад розчиняли у воді, розчин підкисляли до *pH* 4,0 для осадження α-лактальбуміну в ізоелектричній точці. Розчин центрифугували та його *pH* доводили до 7,0. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [7]. Антиоксидантні властивості ЛФ досліджували хемілюмінесцентним методом [1]. Використовували кілька модельних систем.

Перша модельна система містила 1 мл 50 ммоль натрій-фосфатного буфера і 10 мг виділеного білка, до неї додавали 100 мкл розчину солі Мора. В окремих випадках білок або залізо не додавали. Хемілюмінесценцію індукували додаванням 100 мкл пероксиду водню. Перехоплювачем гідроксильних радикалів був манітол у концентрації 4,5 мг/мл.

Друга модельна система містила 1 мл суспензії яєчного жовтка, який розводили дистильованою водою в співвідношенні 1:10, а перед використанням — натрій-фосфатним буфером 1:15. До суспензії додавали 100 мкл розчину ЛФ (кінцева концентрація 10 мг/мл). Суміш термостатували на протязі 5 хв при 37 °С. Хемілюмінесценцію індукували додаванням 100 мкл розчину солі Мора. Ступінь антиоксидантної активності білка визначали за світлосумою швидкого та повільного (підраховувалась кількість імпульсів за 600 с) спалаху.

Третя модельна система містила 1 мл фізіологічного розчину, 100 мкл гомогенату печінки щурів, 100 мкл розчину ЛФ (кінцева концентрація білка 10 мг/мл). Хемілюмінесценція індукувалась додаванням 100 мкл розчину солі Мора або перекису водню в кінцевих концентраціях $5 \cdot 10^{-2}$ моль і 0,5% відповідно. Гомогенат печінки отримували шляхом її гомогенізації в фізіологічному розчині в співвідношенні 1:2.

Молозиво заморожували та зберігали в рідкому азоті, відігрівали на водяній бані при 37 °С. Ліофілізацію здійснювали на установці УЗВ-9. Регідратацію молозива проводили дистильованою водою. Ліофілізоване молозиво розфасовували в желатинові капсули (300 мг), упаковували в пластикові контейнери (50 шт) і зберігали в побутовому холодильнику при температурі 4 °С. Статистичну обробку проводили за методом Стьюдента–Фішера.

Investigation of antioxidative properties of LF from bovine colostrum and the effect of lyophilization and freezing on it, was the aim of the work.

Bovine colostrum of the 2nd–3rd day of lactation, obtained by the method [4] was used in the work. Colostrum was centrifuged during 15 min at 3 000 rot/min. Obtained plasm was acidified by means of HCl solution to *pH* 4.6, by centrifuging separated on casein preparation (sediment) and serum. After NaOH alkalization to *pH* 8.0 by ammonium sulphate (from 30 to 80% saturation) from serum a protein fraction, comprising LF, was sedimented. Sediment was diluted in water, solution was acidified to *pH* 4.0 for α-lactalbumin sedimentation in isoelectric point. Solution was centrifuged and its *pH* was achieved by 7.0. Protein concentration was determined according to Lowry method [7]. Antioxidative properties of LF were investigated by a chemiluminescence method [1]. Some modeling systems were used.

The first modeling system comprised 1 ml 50 mM of sodium-phosphate buffer and 10 mg of isolated protein, added by 100 μl of bivalent iron salt. In some cases protein or iron were not added. Chemiluminescence was induced by adding 100 μl of hydrogen peroxide. Mannitol in 4.5 mg/ml was a capturer of hydroxile radicals.

The second modeling system comprised 1 ml of egg yolk suspension, diluted with distilled water in 1:10 ratio, and before the usage it was diluted with sodium-phosphate buffer in the ratio of 1:15. We added 100 μl of lactoferrin solution (10 mg/ml final concentration) to the suspension. Mixture was thermostated during 5 min at 37 °C. Chemiluminescence was induced by adding 100 μl of bivalent iron salt. The level of antioxidative activity in a protein was estimated on a light sum of a rapid flash and slow one (a number of impulses for 600 s was calculated).

The third modeling system comprised 1 ml of physiological solution, 100 μl of rat liver homogenate, 100 μl of LF solution (final concentration of a protein made 10 mg/ml). Chemiluminescence was induced by adding 100 μl of bivalent iron salt or hydrogen peroxide in final concentrations of $5 \cdot 10^{-2}$ M and 0.5%, correspondingly. Liver homogenate was obtained by its homogenization in physiological solution in 1:2 ratio.

Colostrum was frozen and stored in liquid nitrogen, thawed in water bath at 37 °C. Lyophilization was accomplished by means of UZV-9 device. Rehydrated colostrum was packed into gelatin capsules and plastic containers, and stored in a refrigerator under the temperature of 4 °C. Statistical processing was done according to the Student–Fisher method.

Table 1 demonstrates the data on chemiluminescence intensity in a modeling system depending on the concentration of bivalent iron and hydrogen peroxide in the absence and presence of LF, obtained both from native (NC) and lyophilized (LC) colostrum. With the increase of $Fe^{2+}$ ions concentration a chemiluminescence intensity increased by 3.7 and 3 times under



Матеріал, захищений авторським правом

У табл. 1 представлено дані з інтенсивності хемілюмінесценції модельної системи в залежності від концентрації двовалентного заліза та пероксиду водню при відсутності та наявності ЛФ, який отримували з нативного (НМ) і ліофілізованого (ЛМ) молозива. З підвищенням концентрації іонів $Fe^{2+}$ інтенсивність хемілюмінесценції збільшувалась у 3,7 та 3,0 рази при концентрації пероксиду водню 0,1 та 0,01 відповідно. Це пов'язано з тим, що в середовищі, яке містить $Fe^{2+}$ та $H_2O_2$, протікає реакція Фентона, суть якої полягає в тому, що залізо ініціює розпад пероксиду водню на іон гідроксилу ($OH^-$) та гідроксильний радикал ($OH^\cdot$). Зі збільшенням концентрації заліза інтенсивність цієї реакції підвищується, що і відбивається в збільшенні світлосуми хемілюмінесценції.

**Таблиця 1**

**Світлосума хемілюмінесценції (умов. од.) в залежності від складу модельної системи та концентрації пероксиду водню**

| Склад модельної системи | Концентрація $H_2O_2$, % | |
|---|---|---|
| | 0,1 | 0,01 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ | 768 ± 117 | 944 ± 29 |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ | 2 846 ± 111 | 2 838 ± 85 |
| ЛФ НМ | 38 ± 3 | 28 ± 2 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + ЛФ НМ | 141 ± 18 | 26 ± 2 |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ + ЛФ НМ | 1 079 ± 56 | 355 ± 19 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + ЛФ ЛМ | 158 ± 19* | 29 ± 4* |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ + ЛФ ЛМ | 1 125 ± 68* | 371 ± 22* |

**Примітка.** * — відмінності не достовірні в порівнянні з нативним молозивом, $p > 0,05$.

Наявність у системі білка без заліза практично не приводить до хемілюмінесценції при додаванні перекису водню. Якщо в системі присутні залізо та білок, інтенсивність світіння значно зменшується в порівнянні з системою без білка. Це свідчить про те, що ЛФ, який додається до системи, є ефективним хелатором заліза. У біологічних об'єктах залізо приймає участь у так званому редокс-циклі, коли воно може багаторазово окислюватися, а потім відновлюватися завдяки наявності таких з'єднань, як аскорбат, НАД·Н, глутатіон та ін. [2] . Хелатори виводять його з редокс-циклу і тим самим перешкоджають протіканню перекисних процесів у ліпідах.

Введення в систему манітолу, який є ефективним перехоплювачем гідроксильних радикалів, приводить до зниження інтенсивності світіння в 3,9 рази (табл. 2). При спільному введенні в систему манітолу та білка інтенсивність світіння в порівнянні з такою ж системою без манітолу знижується незначно. Цей факт свідчить про те, що ЛФ, який входить до використаної білкової фракції, приводить до значного зниження рівня гідроксильних радикалів у модельних системах.

У табл. 3 наведено дані щодо впливу білка, виділеного з нативного, замороженого та ліофілізованого молозива, на характер хемілюмінесценції в модельній системі, яка містить ліпопротеїди жовт-

the concentration of hydrogen peroxide of 0.1 and 0.01, correspondingly. This is related to the fact that in the medium, comprising $Fe^{2+}$ and $H_2O_2$, the Fenton's reaction occurs, which essence consists in the fact that iron initiates disintegration of hydrogen peroxide to hydroxile ion ($OH^-$) and hydroxile radical ($OH^\cdot$). With an increase of iron concentration the intensity of this reaction rises, manifesting in the augmentation of a light sum chemiluminescence.

**Table 1**

**A light sum chemiluminescence (rel. units) depending on a modeling system composition and hydrogen peroxide concentration**

| Modeling system composition | Concentration of $H_2O_2$, % | |
|---|---|---|
| | 0.1 | 0.01 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ | 768 ± 117 | 944 ± 29 |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ | 2 846 ± 111 | 2 838 ± 85 |
| LF NC | 38 ± 3 | 28 ± 2 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + LF NC | 141 ± 18 | 26 ± 2 |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ + LF NC | 1 079 ± 56 | 355 ± 19 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + LF LC | 158 ± 19* | 29 ± 4* |
| $5\cdot10^{-2}$ $Fe^{2+}$ + LF LC | 1 125 ± 68* | 371 ± 22* |

**Note.** * — the differences are not statistically true in comparison with the native colostrum, $p > 0.05$.

The presence of protein in the system without iron does not result in a chemiluminescence when adding hydrogen peroxide. Light intensity significantly decreases comparing to the system without protein. This testifies, that LF, added to a system, is an efficient iron chelator. In biological objects iron participates in so-called redox-cycle, when it can be acidified for many times, and then recover due to the presence of such compounds as ascorbate, NAD·H, glutathione etc. [2]. Chelators turn it out of a redox-cycle and in such a way prevent the course of peroxidation processes in lipids.

Introduction into a system of mannitol, which is an efficient capturer of hydroxile radicals, results in a decrease of light intensity by 3.9 times (Table 2). During combined introduction into a system of mannitol and protein a light intensity slightly decreases comparing to the same system without mannitol. This fact testifies that LF, comprised by used protein fraction results in a significant reduction of the level of hydroxile radicals in modeling systems.

**Table 2**

**Mannitol influence on the light sum chemiluminescence (rel. units) depending on the modeling system composition**

| Modeling system composition | Addition | Light sum |
|---|---|---|
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0.1% $H_2O_2$ | — | 387 ± 22 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0.1% $H_2O_2$ | Mannitol | 100 ± 11[1] |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0.1% $H_2O_2$ + LF NC | — | 59 ± 5 |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0.1% $H_2O_2$ + LF NC | Mannitol | 50 ± 4[2] |
| $5\cdot10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0.1% $H_2O_2$ + LF LC | Mannitol | 54 ± 6[2] |

**Notes.** [1] — the differences are statistically true in comparison with mannitol absence, $p < 0.05$; [2] — the differences are not statistically true in comparison with the native colostrum without mannitol, $p > 0.05$.



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблиця 2**

**Вплив манітолу на світлосуму хемілюмінесценції (умов. од.) в залежності від складу модельної системи.**

| Склад модельної системи | Добавка | Світлосума |
|---|---|---|
| $5 \cdot 10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0,1% $H_2O_2$ | — | 387 ± 22 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0,1% $H_2O_2$ | Манітол | 100 ± 11[1] |
| $5 \cdot 10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0,1% $H_2O_2$ + ЛФ НМ | — | 59 ± 5 |
| $5 \cdot 10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0,1% $H_2O_2$ + ЛФ НМ | Манітол | 50 ± 4[2] |
| $5 \cdot 10^{-3}$ $Fe^{2+}$ + 0,1% $H_2O_2$ + ЛФ ЛМ | Манітол | 54 ± 6[2] |

**Примітки.** [1] — відмінності достовірні в порівнянні з відсутністю манітолу, $p < 0,05$; [2] — відмінності не достовірні в порівнянні з нативним молозивом без манітолу, $p > 0,05$.

ка. Як видно з цієї таблиці, додавання білка, отриманого з нативного або замороженого молозива, приводить до значного зменшення світлосуми як швидкого спалаху, яка відбиває кількість вільних радикалів у момент додавання заліза, так і повільного, що характеризує здатність ліпідів залучатись до ПОЛ. Білок із ліофілізованого молозива має практично таку ж антиоксидантну властивість.

**Таблиця 3**

**Вплив заморожування та ліофілізації молозива на здатність ЛФ подавляти розвиток вільнорадикального окислення ліпопротеїдів жовтка**

| Джерело ЛФ | Світлосума спалаху, умов. од. | |
|---|---|---|
| | швидкого | повільного |
| Контроль (без ЛФ) | 20 616 ± 622 | 213 566 ± 6 762 |
| Нативне молозиво | 1 257 ± 55[1] | 10 300 ± 590[1] |
| Заморожене молозиво | 1 337 ± 63[1,2] | 10 032 ± 620[1,2] |
| Ліофілізоване молозиво | 1 510 ± 170[1,2] | 12 045 ± 749[1,2] |

**Примітки.** [1] — відмінності достовірні в порівнянні з інтенсивністю хемілюмінесценції без ЛФ, $p < 0,05$; [2] — відмінності не достовірні в порівнянні з нативним молозивом, $p > 0,05$.

У табл. 4 наведено дані з інтенсивності хемілюмінесценції гомогенату печінки щурів, індукованої двовалентним залізом або перекисом водню у залежності від джерела ЛФ. Результати свідчать про те, що ЛФ незалежно від джерела отримання виявляє антиоксидантну дію, зменшуючи інтенсивність хемілюмінесценції, індукованої як двовалентним залізом, так і перекисом водню. При цьому його антиоксидантні властивості проявляються в більшій мірі при індукції хемілюмінесценції залізом, ніж перекисом водню. Ці власти-

**Таблиця 4**

**Інтенсивність хемілюмінесценції гомогенату печінки щурів, індукованої $Fe^{2+}$ і $H_2O_2$, в залежності від джерела ЛФ**

| Джерело ЛФ | Світлосума хемілюмінесценції (умов. од), індукованої | |
|---|---|---|
| | $Fe^{2+}$ | $H_2O_2$ |
| Контроль (без ЛФ) | 1 985 ± 201 | 14 770 ± 1 521 |
| Нативне молозиво | 611 ± 73[1] | 9 125 ± 1 007[1] |
| Заморожене молозиво | 572 ± 66[1,2] | 8 883 ± 893[1,2] |
| Ліофілізоване молозиво | 639 ± 71[1,2] | 9 056 ± 1 095[1,2] |

**Примітки.** [1] — відмінності достовірні в порівнянні з відсутністю ЛФ, $p < 0,05$; [2] — відмінності не достовірні в порівнянні з нативним молозивом, $p > 0,05$.

Table 3 demonstrates the data on the effect of protein, isolated from native, frozen and lyophilized colostrum, on a chemiluminescence character in a model system, that comprises yolk lipoptoteids. As this table shows, addition of the protein, obtained from native or frozen colostrum, results in a significant light sum decrease of both a rapid flash, which reflects the quantity of free radicals to the moment of iron addition, and slow one, characterizing the capability of lipids to join LPO. Protein from lyophilized colostrum possesses practically the same property.

**Table 3**

**Influence of freezing and lyophilization on the ability of LF to suppress the development of yolk lipoptoteins' free-radical oxydation**

| Source of LF | Light sum of the flash, rel. units | |
|---|---|---|
| | rapid | slow |
| Control (without LF) | 20 616 ± 622 | 213 566 ± 6 762 |
| Native colostrum | 1 257 ± 55[1] | 10 300 ± 590[1] |
| Frozen colostrum | 1 337 ± 63[1,2] | 10 032 ± 620[1,2] |
| Lyophilized colostrum | 1 510 ± 170[1,2] | 12 045 ± 749[1,2] |

**Notes.** [1] — the differences are statistically true in comparison with chemiluminescence intencity without LF, $p < 0.05$; [2] — the differences are not statistically true in comparison with the native colostrum, $p > 0.05$.

Table 4 demonstrates the data on the chemiluminescence intensity of rat liver homogenate, induced by bivalent iron or hydrogen peroxide depending on the LF source. The results testify to the fact that LF independently on the source of obtaining manifests antioxidative effect, reducing a chemiluminescence intensity, induced by both bivalent iron and hydrogen peroxide. Thereat its antioxidative properties are manifested, in a greater extent during the chemiluminescence induction with iron, than hydrogen peroxide. These properties of LF have remained unchangeable also when storing lyophilized colostrum to 12 months, packed into gelatin capsules under the temperature of 4 °C (Table 5).

**Table 4**

**The chemiluminescence intensity of rat liver homogenate, induced by $Fe^{2+}$ and $H_2O_2$ depending on the LF source**

| Source of LF | Light sum of chemiluminescence (rel. units) induced by | |
|---|---|---|
| | $Fe^{2+}$ | $H_2O_2$ |
| Control (without LF) | 1 985 ± 201 | 14 770 ± 1 521 |
| Native colostrum | 611 ± 73[1] | 9 125 ± 1 007[1] |
| Frozen colostrum | 572 ± 66[1,2] | 8 883 ± 893[1,2] |
| Lyophilized colostrum | 639 ± 71[1,2] | 9 056 ± 1 095[1,2] |

**Notes.** [1] — the differences are statistically true in comparison with LF absence, $p < 0.05$; [2] — the differences are not statistically true in comparison with the native colostrum, $p > 0.05$.

Thus, considering the results presented in the work, it should be concluded, that both native and lyophilized LF from bovine colostrum is an efficient iron chelator, decreases the concentration of hydroxile



Матеріал, захищений авторським правом

вості ЛФ залишаються незмінними також при зберіганні ліофілізованого молозива до 12 міс розфасованим в желатинові капсули при температурі 4 °С (табл. 5).

Таким чином, з представлених у роботі результатів можна зробити висновок, що ЛФ як нативний, так і ліофілізований із молозива корів є ефективним хелатором заліза, зменшує концентрацію гідроксильних радикалів і в значній мірі інтенсивність перекисних процесів у модельних системах.

**Таблиця 5**

**Table 5**

**Інтенсивність хемілюмінесценції гомогенату печінки щурів у присутності ЛФ, отриманого з ліофілізованого молозива в різні терміни його зберігання**

**The chemiluminescence intensity of rat liver homogenate in presence of LF obtained from lyophilized colostrum in different terms of its storage**

| Індуктор хемілюмінесценції<br>Inductor of chemiluminescence | Контроль<br>Control | Термін зберігання, міс<br>Term of storage, months | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 | 6 | 9 | 12 |
| $Fe^{2+}$ | 668 ± 71 | 641 ± 52 | 695 ± 60 | 679 ± 71 | 685 ± 67 |
| $H_2O_2$ | 8 987 ± 907 | 9 927 ± 831 | 9 327 ± 975 | 10 933 ± 1 035 | 9 787 ± 1 065 |

**Примітка**. Відмінності від контролю не достовірні при всіх термінах зберігання.

**Note**. The differences from the control are not statistically true at all of storage terms.

## ЛІТЕРАТУРА


1. *Бєлизи С., Назарова И. А., Климова И. А. и др.* Антиоксидантные свойства лактоферрина из женского молока // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 1999.– № 5.– С. 523–525.
2. *Козлов А. В., Мещанов Ф. Ю., Николаева И. Г. и др.* Сравнительное изучение антиоксидантных свойств полигидроксамовых кислот, десферала и других хелаторов железа // Биофизика.– 1993.– 38, Вып. 4.– С. 708–713.
3. *Проблема* анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика.– М., 1986.– Т. 18.– 136 с.
4. *Якубовская Р. И., Немцова Е. Р., Коханова И. Д. и др.* Лактоферрин человека: получение высокоочищенных препаратов из молока женщин, некоторые физико-химические свойства и распределение в нормальных и опухолевых тканях // Вопр. мед. химии.– 1986.– 32, № 6.– С. 75–79.
5. *Adamik B., Zimecki M., Wlaszczyk A. et al.* Lactoferrin effects on the vitro immune response in critically ill patients // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1998.– № 46.– P. 169–176.
6. *Lonnerdal B., Iyer S.* Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr.– 1995.– № 15.– P. 93–100.
7. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– 193.– P. 265–275.
8. *Swart P. J., Kuipers E. M., Smit C. et al.* Lactoferrin. Antiviral activity of lactoferrin // Adv. Exp. Med. Biol.– 1998.– № 443.– P. 205–213.
9. *Wlaszczyk A., Zimecki M., Adamik B. et al.* Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: effect of lactoferrin on proliferation and production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in vitro // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1997.– № 45.– P. 201–202.
10. *Yamauchi K., Wakabayashi H., Hishimoto S. et al.* Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers // Adv. Exp. Med. Biol.– 1998.– № 443.– P. 261–265.


Надійшла 28.04.2001

radicals and significantly reduces an intensity of peroxidative processes in modeling systems.

## REFERENCES


1. *Belizi S., Nazarova I. A., Klimova I. A. et al.* Antioxidative properties of lactoferrin derived from women's colostrum // Bul. Exp. Biology and Medicine.– 1999.– № 5.– P. 523–525.
2. *Kozlov A. V., Meschanov F. Yu., Nikolaeva I. G.* Comparative study of antioxidative properties of polyhydroxamic acids, despheral and other iron chelators // Biophysics.– 1993.– 38, Issue 4.– P. 708–713.
3. *The problem* of the analysis of endogenous products of lipid peroxidation. Reviews of Science and Technics. Ser. Biophysics.– M., 1986.– V. 18.– 136 p.
4. *Yakubovskaya R. I., Nemtsova E. R., Kokhanova I. D. et al.* Human lactoferrin: obtaining of highly purified preparations from the women's colostrum, some physical and chemical properties and distribution in normal and tumor tissues // Voprosy med. khimii.– 1986.– 32, № 6.– P. 75–79.
5. *Adamik B., Zimecki M., Wlaszczyk A. et al.* Lactoferrin effects on the vitro immune response in critically ill patients // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1998.– № 46.– P. 169–176.
6. *Lonnerdal B., Iyer S.* Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr.– 1995.– № 15.– P. 93–100.
7. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– 193.– P. 265–275.
8. *Swart P. J., Kuipers E. M., Smit C. et al.* Lactoferrin. Antiviral activity of lactoferrin // Adv. Exp. Med. Biol.– 1998.– № 443.– P. 205–213.
9. *Wlaszczyk A., Zimecki M., Adamik B. et al.* Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: effect of lactoferrin on proliferation and production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in vitro // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1997.– № 45.– P. 201–202.
10. *Yamauchi K., Wakabayashi H., Hishimoto S. et al.* Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers // Adv. Exp. Med. Biol.– 1998.– № 443.– P. 261–265.


Accepted in 28.04.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 615.361.631.014.41: 57.085

UDC 615.361.631.014.41: 57.085

# Влияние криоконсервирования на динамику базальной секреции тестостерона органной культуры семенников крыс

АБО ЖАЯБ САЛЕХ, С. В. ЛУГОВОЙ, Н. Ф. ГУБИНА, Е. И. ЛЕГАЧ

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

# Cryopreservation Effect on the Dynamics of Basal Secretion of Rat's Testes Organ Culture Testosterone

ABUJAYYAB SALEH, S. V. LUGOVOJ, N. F. GUBINA, E. I. LEGACH

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

Проведен сравнительный анализ нативных и криоконсервированных органных культур семенников белых крыс по уровню секреции тестостерона. Установлено, что при культивировании клеток тканей семенников уровень секреции гормонов увеличивается на 3–5-е сутки культивирования. При рекультивировании размороженного эндокринного материала отмечается сохранность гормонсинтезирующей функции органной культуры семенников.

Проведено порівняльний аналіз нативних і кріоконсервованих органних культур сім'яників білих щурів за рівнем секреції тестостерону. Установлено, що при культивуванні клітин тканин сім'яників рівень секреції гормонів зростає на 3–5-у добу культивування. За умов рекультивування розморожуваного матеріалу відмічається цілість гормонсинтезуючої функції органної культури сім'яників.

Comparative analysis of native and cryopreserved organ cultures of white rats' testes was carried-out in respect of testosterone level secretion. It has been established that during culturing of testes tissue cells the level of hormone secretion increases to the 3rd–5th days of culturing. When re-culturing frozen-thawed endocrinic material the integrity of hormone-synthesising function of organ culture of testes is noted.

В последние годы для лечения эндокринопатий все больше применяются методы клеточной и тканевой терапии. В частности, достигнуты значительные успехи в лечении андрогенной недостаточности методом аллотрансплантации тестикулярной ткани [1, 2]. Перспективным материалом для трансплантации также являются неонатальные органотипические ксенокультуры [3].

В качестве модели для изучения влияния трансплантации криоконсервированной органной культуры семенников новорожденных поросят на гормональный статус реципиента предполагается использовать орхиэктомированных крыс. На данном этапе исследования планируется сравнить эффективность трансплантации алло- и ксеногенной органной культуры семенников для коррекции гормонального статуса орхиэктомированных крыс.

Изучение способности к синтезу и секреции тестостерона нативной и подвергавшейся криоконсервированию и низкотемпературному хранению органной культуры семенников крыс позволит оценить ее функциональное состояние и пригодность для использования в экспериментах по сравнительному изучению эффективности алло- и ксенотрансплантации для коррекции гормонального статуса у модельных животных. Цель данного исследования — изучение влияния криоконсервирования на базальную секрецию тестостерона органной культуры семенников крыс.

Recently for the treatment of endocrinopathies the methods of cellular and tissue therapy have been much more widely applied. In particular, significant successes are achieved when treating androgenic insufficiency by the method of testicular tissue allotransplantation [1, 2]. Neonatal organotopic xenocultures are also considered as perspective material [3].

Orchiectomised rats are supposed to be used as the model for studying the effect of transplantation of cryopreserved organ culture of newborn piglets' testes on hormonal status of a recipient. At this stage of investigation we plan to compare the efficacy of transplantation of allo- and xenogeneic organ cultures testes for the correction of hormonal status of orchiectomised rats.

The studying of the ability to synthesis and secretion of testosterone of native cryopreserved, as well as stored at low temperatures rat's testes culture will permit to estimated its functional state and suitability for the usage in experiments on comparative investigation of the efficiency of allo- and xenotransplantation for the correction of hormonal status in model animals. The aim of this study was to investigate the effect of cryopreservation on basal secretion of testosterone of rat's testes organ culture.

Testes were derived from breedless 5-months' rats. After extirpation the term of ischemia made not more than 45 min. Testes were placed into physiological solution with antibiotics at 4 °C, then they were



Матеріал, захищений авторським правом

Семенники получали от беспородных 5-месячных крыс. После экстирпации срок ишемии составлял не более 45 мин. Семенники помещали в физиологический раствор с антибиотиками при 4 °С, затем измельчали до фрагментов 0,1 мм$^3$, отмывали физиологическим раствором с антибиотиками. Измельченные семенники помещали в стерильные флаконы с питательной средой 199 и 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой. Культивирование проводили при 32 °С по методу И. С. Турчина и соавт. [3]. Ежедневно производили замену питательной среды, отбор проб и питательной среды, образцов ткани для измерения содержания тестостерона. Содержание тестостерона в питательной среде и гомогенатах ткани определялось радиоиммунологическим методом при помощи набора РИА-СТ-Тестостерон.

После 5-х суток культивирования часть культур подвергалась криоконсервированию под защитой 5%-го ДМСО по двухэтапной программе: 1 °С/мин до –70 °С, затем быстрое погружение в азот. Остальные культуры продолжали культивировать до 10-х суток.

Криоконсервированные культуры после 7 суток хранения при –196 °С извлекали из банка, отогревали на водяной бане при 37 °С до появления жидкой фазы, отмывали от криопротектора и помещали в питательную среду 199 с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой. В течение 10 дней производили рекультивирование деконсервированных культур, замену питательной среды и отбор проб для определения содержания тестостеронов в среде культивирования и гомогенатах ткани.

Пересчет содержания тестостерона производили на количество белка гомогената органной культуры, который измеряли по методу Бредфорда. Статистически результаты обрабатывали по методу Стьюдента–Фишера.

Как показано на рис. 1, высокое содержание тестостерона в нативной культуре семенников (НКС)

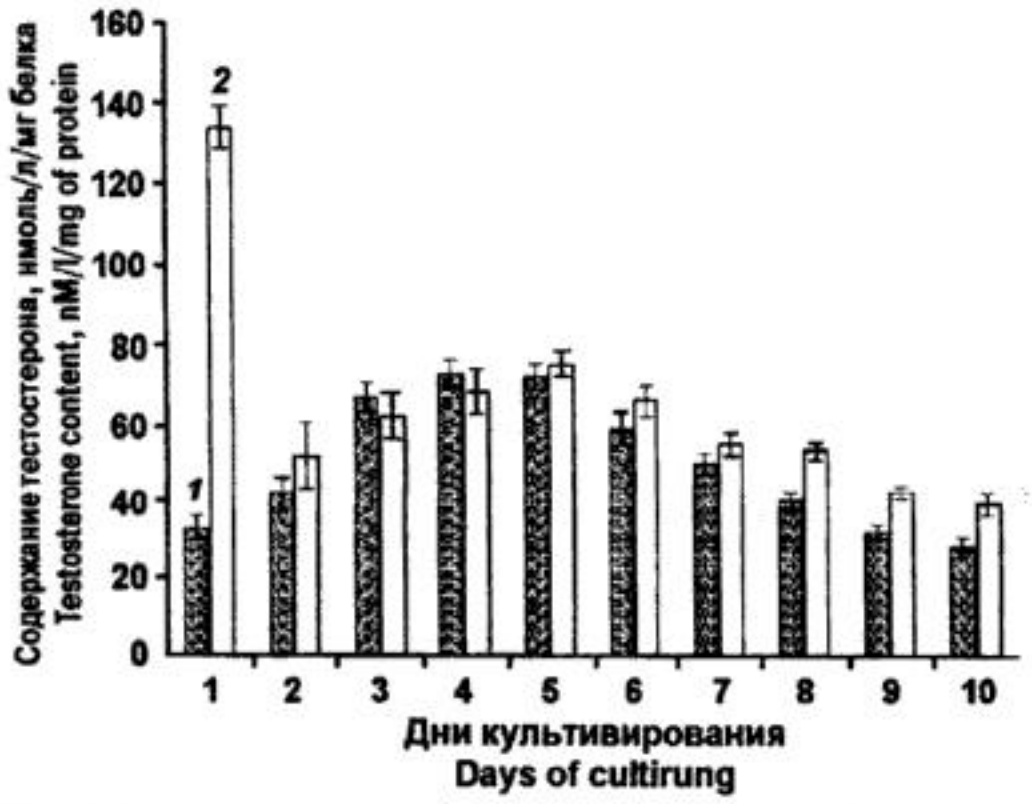



**Рис. 1.** Содержание вне- и внутриклеточной фракций тестостерона в НКС: *1* – гомогенат НКС; *2* – НКС.

**Fig. 1.** Content of extra- and intracellular fractions of testosterone

minced to 0.1 mm$^3$ fragments, washed-out with physiological solution with antibiotics. Minced testes were placed to sterile bottles with nutritive 199 medium and 10% embryonic calf serum. Culturing was performed at 32 °C according to the method of I. S. Turchin et al. [5]. Every day the removal of nutritive medium for another one was done, as well as selection of culturing medium and tissue samples for measuring the content of testosterone. Its content in nutritive medium and homogenate of tissue was determined by radioimmunological method using RIA-ST-Testosterone set.

After 5 days of culturing the part of cultures were subjected to cryopreservation under protection of 5% DMSO according to two-stage programme: 1 °C/min down to –70 °C, then rapid submerging into nitrogen. The culturing of rest cultures was continued up to 10 days.

Cryopreserved cultures after 7 days of storage at –196 °C were taken from the bank, thawed at water bath at 37 °C up to the appearance of liquid phase, washed-out of cryoprotectant and placed into nutritive 199 medium with 10% embryonic calf serum. During 10 days the re-culturing of frozen-thawed cultures was performed, substitution of nutritive medium and selection of the samples for determining of testosterone content in culturing medium and homogenates of tissue.

Counting of testosterone was accomplished in respect of the number of the protein of organ culture homogenate, which was measured according to the Bradford's method. The results were statistically processed on the method of Student's–Fisher.

As it is shown in Fig. 1, a high content of testosterone in native culture of testes (NCT) during the first 24 hrs of culturing is stipulated by its release out of dead owing to ischemia cells and those fragmentated in the result of mechanical effect. In tissue homogenate a low level of testosterone is observed, that testifies to a suppression of the synthesis process in the tissue being within the period of adaptation to non-physiological conditions.

After substitution of nutritive medium to the 2nd day a low level of testosterone content in it is observed, in tissue homogenates a statistically significant rise of testosterone level was also found. From the third up to the fifth days the testosterone content increases in nutritive medium, its content accretion is noted in homogenates as well as the levelling of gradients of concentration of extra- and intracellular fractions of testosterone, i.e. the synthesis and secretion of testosterone occurs de novo. After the 5-th day and up to the 10th there is a tendency to a decrease in the concentration of testosterone in nutritive medium, as well as an increase in concentration gradient between extra- and intracellular fractions of testosterone due to predominant decrease in intracellular fraction, that testifies about starting degenerative processes in a tissue. Obtained by us results on the changes of tes-



Матеріал, захищений авторським правом

в первые сутки культивирования обусловлено его высвобождением из погибших вследствие ишемии и фрагментированных в результате механического воздействия клеток. В гомогенате ткани наблюдается низкий уровень тестостерона, что свидетельствует об угнетении процессов синтеза в ткани, находящейся в периоде адаптации к нефизиологическим условиям.

После замены питательной среды на 2-е сутки наблюдаются низкий уровень содержания в ней тестостерона, а в гомогенатах ткани — достоверное повышение уровня тестостерона. С 3-х вплоть до 5-х суток повышается содержание тестостерона в питательной среде, отмечаются прирост его содержания в гомогенатах и выравнивание градиентов концентрации вне- и внутриклеточных фракций тестостерона, т.е. синтез и секреция тестостерона происходят *de novo*. После 5-х до 10-х суток наблюдаются тенденция к снижению концентрации тестостерона в питательной среде, увеличение градиента концентрации между вне- и внутриклеточными фракциями тестостерона за счет преимущественного снижения внутриклеточной фракции, что свидетельствует о начинающихся дегенеративных процессах в ткани. Полученные нами результаты об изменении в процессе культивирования содержания тестостерона в питательной среде коррелируют с работами [4, 5], в которых исследовалась динамика изменения активности три-бетагидроксистероиддегидрогеназы в процессе культивирования, что также является косвенным подтверждением того, что при культивировании со 2-х по 5-е сутки включительно происходит синтез тестостерона *de novo*.

В размороженной и повторно рекультивированной культуре семенников (РКС) в первые сутки рекультивирования (рис. 2) наблюдается высокое содержание тестостерона, обусловленное массированным его выбросом из поврежденных в результате замораживания-отогрева клеток. В этот же период отмечается низкая концентрация внутриклеточной фракции тестостерона, что связано с угнетением процессов гормонопоэза в результате воздействия повреждающих факторов замораживания. На 2-е сутки после замены питательной среды отмечается снижение концентрации тестостерона в культуральной среде, а в гомогенатах ткани наблюдается незначительная тенденция к увеличению содержания тестостерона, что свидетельствует о происходящих репаративных процессах. С 3-х суток начинается незначительный прирост внеклеточной фракции, который продолжается вплоть до 5-х суток рекультивирования. Внутриклеточная фракция заметно увеличивается со 2-х на 3-и сутки, после чего до 5-х суток остается примерно на одном уровне. Отсутствие выраженных градиентов концентрации между вне- и внутриклеточной фракциями тестостерона со 2-х до 5-х суток рекультивирования свидетельствует о том, что после завершения репаративных процессов в клетках

tosterone content in nutritive medium during culturing process correlate with the works [4, 5], where the dynamics of the change in the activity of 3-betahydroxysteroid dehydrogenase in the process of culturing, that also is an indirect confirmation of the fact, that during culturing from the 2nd to the 5th days the synthesis of testosterone de novo occurs.

In frozen-thawed and repeatedly of re-cultured culture of testes (RCT) (Fig. 2) in the first days of re-culturing a high content of testosterone, stipulated by its mass release out of damaged in result of freeze-thawing cells is observed. In the same period there is a low concentration of intracellular fraction of testosterone, that is related to the suppression of hormonepoiesis processes in the result of the effect of damaging factors of freezing. To the 2nd day after removal of nutritive medium for another one a decrease in testosterone concentration in culturing medium is observed and in tissue homogenates a slight tendency to a rise in testosterone content in seen, that testifies to occurring reparative processes. From the 3rd day a slight accretion of extracellular fraction, continuing up to the 5th day of re-culturing. Intracellular fraction considerably increases from the 2nd to 3rd days after that up to the 5th day it remains practically at the same level. The absence of manifested concentration gradients between extra- and intracellular fractions of testosterone from two to five days of re-culturing testifies to the fact, that after finishing reparative processes in Leydig's cells the synthesis of testosterone de novo renews. From 5th to 10th days the concentration of extracellular fraction of testosterone remains approximately at the same level, but the tendency to its decrease is observed, in this case intracellular fraction sharply reduces its concentration to the favour of prevailing an extracellular testosterone fraction. Less when comparing to native hormone-producing activity of frozen-thawed culture, probably is related to the death of the part of cells under the effect of damaging

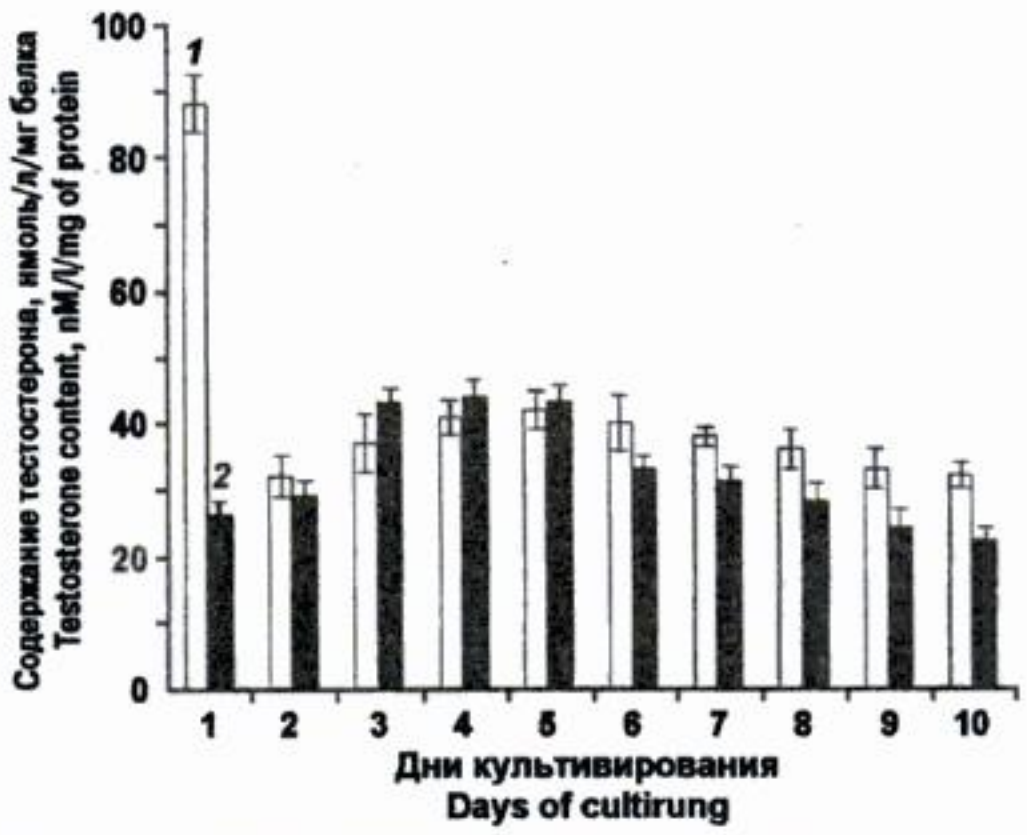



**Рис. 2.** Содержание вне- и внутриклеточной фракций тестостерона в РКС: *1* — РКС; *2* — гомогенат РКС.

**Fig. 2.** Content of extra- and intracellular fractions of testosterone in RCT: *1* — NCT; *2* — homogenat of NCT.



Матеріал, захищений авторським правом

Лейдига возобновляется синтез тестостерона *de novo*. С 5-х до 10-х суток концентрация внеклеточной фракции тестостерона остается примерно на одном уровне, однако наблюдается тенденция к ее снижению, при этом внутриклеточная фракция резко уменьшает свою концентрацию с 5-х суток, за счет чего возрастает градиент концентрации в пользу превалирования внеклеточной фракции тестостерона. Меньшая по сравнению с нативной гормонпродуцирующая активность деконсервированной культуры, по-видимому, связана с гибелью части клеток под действием повреждающих факторов замораживания-оттаивания, однако выжившие клетки сохраняют способность к синтезу и секреции тестостерона.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно утверждать, что органная культура семенников после криоконсервирования по двухэтапной программе под защитой 5%-го ДМСО позволяет сохранить функциональную активность гормонпродуцирующих клеток семенников органной культуры и впоследствии может использоваться для аллотрансплантации экспериментальным животным с целью сравнительной оценки эффективности применения алло- и ксенотрансплантации для коррекции гормонального статуса у модельных животных.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Божедомов В. А., Сухих Г. Т., Молнар Е. М.* Возможности клинической трансплантации яичек как органа и как ткани // Бюл. эксперим. биол.– 1994.– 117, № 4.– С. 400–404.
2. *Керос В. А.* Криоконсервирование фетотестикулярной ткани человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 2001.– 20 с.
3. Потиха О. П., Турчин И. С., Тронько Н. Д. Цитологическая и гормональная характеристика клеточных культур из семенников новорожденных поросят // Физиол. журн.– 1990.– 36, № 4.– С. 80–84.
4. *Centol I., Deniz A., Benitez L. et al.* Functional activity of rat testicular cells in culture // Biochem. Int.– 1988.– 16, № 2.– P. 311–321.
5. *Heggland S. J., Signs S. A., Stalvey J. R.* Testosterone decreases 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase messenger ribonucleic acid in cultured mouse Leydig cells by a strain-specific mechanism // J. Androl.– 1997.– 18, № 6.– P. 646–655.


Поступила 18.03.2002

factors of freeze-thawing, however survived cells retain the capability of testosterone synthesis and secreting.

Thus proceeding from the data obtained one can state that organ culture of testes after cryopreservation according to two-stage programme under protection of 5% DMSO permits to preserve functional activity of hormone-producing cells of testes of organ culture and then can be used for allotransplantation to experimental animals with the aim of comparative estimation of the efficiency of application of allo- and xenotransplantation for the correction of hormonal status in model animals.

## REFERENCES


1. *Bozhedomov V. A., Sukhikh G. T., Molnar E. M.* Possibilities of clinical transplantation of testes both as organ and tissue // Bull. Exp. Biol.– 1994.– 117, № 4.– P. 400–404.
2. *Keros V. A.* Cryopreservation of human fetotesticular tissue. The author's abstract of thesis of the Candidate of Medical Sciences.– Kharkov, 2001.– 20 p.
3. *Potikha O. P., Turchin I. S., Tron'ko N. D.* Cytological and hormonal characteristics of cellular cultures from the testes of newborn piglets // Fiziol. Zhurnal.– 1990.– 36, № 4.– P. 60–84.
4. *Centol I., Deniz A., Bentiz L. et al.* Functional activity of rat testicular cells in culture // Biochem. Int.– 1988.– 16, № 2.– P. 311–321.
5. *Heggland S. J., Signs S. A., Stalvey J. R.* Testosterone decreases 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase messanger ribonucleic acid in cultured mouse Leydig cells by a strain-specific mechanism // J. Androl.– 1997.– 18, № 6.– P. 646–655.


Accepted in 18.03.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-089.843: 611.013.85 UDC 616-089.843: 611.013.85

# Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения

В. И. ГРИЩЕНКО, А. Н. ГОЛЬЦЕВ

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

# Transplantation of the Products of Embryofetoplacental Complex. From Understanding of Mechanism of the Effect to Increasing the Efficiency of Application

V. I. GRISCHENKO, A. N. GOLTSEV

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

Представленная обзорная статья касается фундаментально-прикладных аспектов использования биологического материала, полученного из эмбриофетоплацентарных структур. Фактически речь идет о разработке и освоении нового направления в клинической трансплантологии — минитрансплантации продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК) и поиске путей повышения их эффективности. Анализируется структурно-функциональная организация представителей ПЭФПК: плаценты, клеток эмбриональной печени (КЭП), эмбриональных нервных клеток, которые чаще всего используются в клинической практике. Подробно анализируются продуцируемые этими структурами биологически активные субстанции, которые входят в состав базисных цитокинов (цитомединов, хемокинов), обеспечения гомеостатического постоянства организма — бодигомеостаза. На основе концептуального рассмотрения нейроиммуноэндокринных взаимодействий как основного фактора обеспечения бодигомеостаза высказывается мысль, которая подтверждается данными литературы, что развитие абсолютного большинства системных патологий организма является следствием нарушения функционального взаимодействия в нейроиммуноэндокринной сфере (НИЭС). В основе таких нарушений может быть патология одной из этих систем, которая развивается под действием какого-нибудь индуцибельного фактора. Представлены данные о значении изменения цитокинового профиля в инициации и поддержке скомпрометированного состояния НИЭС. Высказывается предположение, что, обладая большим потенциалом синтезировать субстанции с биомодулирущей активностью, прежде всего иммуномодулирующей, ПЭФПК способны в конкретных условиях развития патологии отвечать на "запрос ситуации", корректируя состояние организма.

Представлена оглядова стаття стосується фундаментально-прикладних аспектів застосування біологічного матеріалу, отриманого з ембріофетоплацентарних структур. Фактично мова йде про розробку та освоєння нового напрямку в клінічній трансплантації — мінітрансплантації продуктів ембріофетоплацентарного комплексу (ПЕФПК) і пошуку шляхів підвищення їх ефективності. Аналізується структурно-функціональна організація представників ПЕФПК: плаценти, клітин ембріональної печінки, ембріональних нервових клітин, які найбільше використовуються в клінічній практиці. Докладно аналізуються продуковані цими структурами біологічно активні субстанції, які входять до складу базисних цитокінів (цитомедінів, хемокінів) забезпечення гомеостатичної сталості організму — бодігомеостазу. На основі концептуального розгляду нейроімуноендокринних взаємодій як основного фактора забезпечення бодігомеостазу висловлюється думка, яка підтверджується даними літератури, що розвиток абсолютної більшості системних патологій організму є наслідком порушення функціональної взаємодії у нейроімуноендокринній сфері (НІЕС). В основі таких порушень може бути патологія однієї з цих систем, яка розвивається під дією будь-якого індуцибельного фактора. Подаються дані про значення зміни цитокінового профілю в ініціації і підтримці скомпрометованого стану НІЕС. Висловлюється припущення, що, маючи великий потенціал синтезувати субстанції з біомодулюючою активністю, перш за все імуномодулюючою, ПЕФПК здатні в конкретних умовах розвитку патології відповідати на "запит ситуації", корегуючи стан організму.

Presented review is devoted to fundamental and applied aspects of the usage of biological material, obtained from embryofetoplacental structures. In fact it includes the elaboration and mastering a new direction in clinical transplantology, minitransplantation of the products of embryofetoplacental complex (PEFPC) and searching the ways for their efficiency increase. Structural and functional organization of PEFPC representatives of placenta, embryonic liver cell, embryonic neural cells, more often used in a clinical practice has been analyzed. Produced by these structures biologically active substances, comprised by basic cytokines (cytomedines, chemokines), providing an organism "body homeostasis" have been analyzed in details. Basing on a conceptual point of view of neuroimmunoendocrinic relationships as the basic factor for bodyhomeostasis providing there is the proposition of the notion, confirmed by the literature data, that the development of an absolute majority of systemic pathologies in an organism is the result of impairment of a functional relationship in neuroimmunoendocrinic sphere (NIES). In the base of such impairments may be the pathology of one of these systems, developed under the effect of any inducible factor. The data about the value of a cytokine profile change in the initiation and maintenance of being compromised NIES state are presented. There is the supposition that PEFPC, possessing a great potential to synthesize the substances with biomodeling activity, primarily, immunomodulating one, are capable of response to a "situation request" under certain conditions of the pathology development by correcting an organism state.



Матеріал, захищений авторським правом

Широкий спектр выполняемых в ИПКиК НАНУ комплексных фундаментально-прикладных программ по изучению влияния холода на биологические объекты и использованию их в различных областях народного хозяйства был дополнен в последнее десятилетие новым важным, перспективным направлением исследований медико-биологического профиля. Речь идет о трансплантации криоконсервированных клеток и тканей эмбриофетоплацентарного комплекса как методе лечения различных патологических состояний организма человека. Учитывая сложность основной задачи трансплантологии обеспечить приемлемое функционирование в организме реципиента генетически чужеродного материала (исключая аутотрансплантацию), ей отведена особая роль в общем перечне клинических дисциплин [45, 62, 90, 94, 97]. Трансплантология является одной из наиболее проблемных, достаточно трудоемкой, зависимой от медицинской этики дисциплиной, требующей четкой идентификации антигенного спектра пересаживаемого материала и его согласования с антигенами гистосовместимости реципиента, иммуносупрессии последнего и т.д. [45, 124, 136, 141]. Главные из этих проблем может решить относительно новая и в то же время имеющая исторический опыт клеточная и тканевая трансплантология. Основным ее преимуществом является то, что для замещения или восстановления функции пораженного органа (ткани) не требуется широкомасштабного хирургического вмешательства и значительного объема донорского материала, а достаточно введения относительно малых доз клеток (тканей). Фактически речь идет о разработке и освоении нового направления в клинической трансплантологии — минитрансплантации ПЭФПК [15, 17, 19, 20, 23–28, 53, 57, 69, 89, 117].

Не исключено, что менее выраженная степень дифференцировки ПЭФПК повышает вероятность их "адаптации" к микроокружению и реабилитации скомпрометированного структурно-функционального состояния органа или ткани, в которых они расселяются при трансплантации. Данное предположение соответствует теоретическим предпосылкам и результатам первых экспериментально-клинических апробаций применения клеток, входящих в компартмент стволовых [62, 89, 117]. С точки зрения поставленной задачи многовекторной коррекции дисфункционального состояния организма, трансплантация материала, формируемого на этапах внутриутробного развития организма млекопитающих, может быть альтернативной этому виду трансплантации. ПЭФПК обладают рядом преимуществ перед донорскими клетками и тканями постнатального периода, например меньшей иммуногенностью, меньшей степенью экспрессии молекул адгезии и, следовательно, большей мобильностью и способностью проникать в поврежденные участки органотканевого плацдарма реципиента, незаан-

A new important, perspective direction of the studies of different medical and biological profile has added a wide spectrum of the complex fundamental and applied programs being conducted at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, on the investigation of a cold effect on biological objects and their application in various fields of national economy within a recent decade. The matter is transplantation of cryopreserved cells and tissues of embryofetoplacental complex as a treatment method for various pathological states of human organism. Considering the complexity of the main task of transplantology to provide a proper functioning of genetically heterogenous material (excluding autotransplantation), this field of science plays a special role in the whole list of clinical disciplines [45, 62, 90, 94, 97]. Transplantation is one of the most problematic discipline, quite labor-consuming, depending on medical ethics, requiring a distinct identification of an antigen spectrum of being transplanted material and its coordination by histocompatibility antigens in a recipient, immune suppression of the latter etc. [45, 124, 136, 141]. The main among these questions can be solved with relatively new discipline and at the same time, cellular and tissue transplantation with a great historical experience. Its major advantage is the fact that for substitution or recovery of the function of damaged organ (tissue) we need no wide-scale surgical invasion and significant volume of donors' material, but the introduction of relatively small doses of cells (tissues) is essential. Practically we speak about the elaboration and mastering of new direction in clinical transplantology - minitransplantation of the products from embryofetoplacental complex (PEFPC) [15, 17, 19, 20, 23–28, 53, 57, 69, 89, 117].

Apparently, less manifested differentiation degree of PEFPC increases the possibility of their "adaptation" to microenvironment and rehabilitation of induced structural and functional state of organ or tissue, in which they are settled during transplantation. Given supposition corresponds to theoretical preconditions and results of initial experimental and clinical approbation for the application of cells, which are the part of stem cells compartment [62, 89, 117]. From the point of view of the set task of multi-vector correction of the dysfunctional state of an organism, transplantation of the material developed at the stages of intrauterine development of mammalian organism, can be an alternative to this type of transplantation. PEFPC possess the series of advantages comparing to donor cells and tissues of postnatal period, for example, less immunogeneity, lower expression of adhesive molecules and, therefore, higher mobility and capability of penetration into damaged parts of organ or



Матеріал, захищений авторським правом

гажированностью дифференцировки в строго определенном гистогенетическом направлении и т.д. [22, 53, 68]. Не менее важно и то, что в отличие от ранее применяемых биологически активных субстанций животного и неживотного происхождения (например, экстрактов) тканевая и клеточная трансплантация в виде ПЭФПК предусматривает введение в организм живых, функционально активных клеточно-тканевых субстратов [22, 23, 27].

Эффект трансплантации ПЭФПК реализуется через сложные механизмы взаимодействия вводимого материала и скомпрометированного структурно-функционального профиля различных систем организма пациента. Такого рода изменения могут быть результатом разбалансировки регуляторно-адаптационных механизмов, реализуемых взаимодействием НИЭС, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма — бодигомеостаз. Задача клеточной и тканевой трансплантации и состоит в том, чтобы скоррегировать межсистемные взаимодействия, минимизируя отрицательные последствия развившегося патологического процесса. Существует несколько представлений о механизмах действия на организм ПЭФПК. Один из них, видимо, ведущий, заключается в том, что ПЭФПК потенциально способны продуцировать широчайший спектр сбалансированных по концентрации биологически активных субстанций, реализующих свое действие в конкретных условиях и коррегирующих функциональный статус систем обеспечения бодигомеостаза. Преимущество ПЭФПК в том, что они обеспечивают такое состояние реципиента не только после их введения, но и на протяжении всего срока экспансии жизнеспособного трансплантата в организме. Адаптируясь к условиям микроокружения и отвечая на местные органо- и тканеспецифические регуляторные сигналы, трансплантат в виде ПЭФПК может к тому же выступать и в роли "пластического строительного" материала, реализующего функцию морфогенеза и обновления структур поврежденной области [22, 52, 89].

Не вызывает сомнения, что разбалансировка взаимодействия систем обеспечения бодигомеостаза приводит к дальнейшему снижению порога устойчивости организма к действию неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды. На этом фоне острый период ответной реакции организма на возмущающий фактор пролонгируется, часто переходя в хроническую форму ее проявления. Примером развития такого рода событий на уровне иммунной системы (ИС) является переход иммуновоспалительного процесса в хроническую форму, все чаще ассоциируемую с развитием аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [14, 18, 65].

Очевидно, что развивающаяся в такой форме патология в одной из составляющих НИЭС будет обусловливать развитие дисфункционального состояния остальных систем. При коррекции ском-

tissue compartment in a recipient, extent of non-engagement of differentiation in a certain histogenetic direction [22, 53, 68] etc. Nevertheless, the fact, that in contrast to applied earlier biologically active substances of organic and non-organic origin (for example, extracts), tissue and cell transplantation of PEFPC foresees introduction into an organism of alive, functionally active cell and tissue substrates [22, 23, 27].

The effect of PEFPC transplantation has been realized through complete mechanisms for the interaction of being injected material and caused structural and functional profile of different systems in a patient's organism. Such changes can be caused by dysbalance in regulatory-adaptive mechanisms, realized by means of interaction of neuro-humoral endocrine spheres, providing a constancy of an organism inner environment, so called body homeostasis. The aim of cell and tissue transplantation consists in the correction inter-systemic interactions, minimizing negative consequences of the developed pathological process. There are some notions about the effect mechanisms of PEFPC on an organism. One of them, probably, is the major one, it reports that these PEFPC are potentially capable of producing a huge spectrum of being balanced on the concentration biologically active substances (BAS), realizing their effect under certain conditions and correcting a functional status of the systems, providing "body homeostasis". PEFPC advantage is in providing such a state of a recipient not just after introduction, but during the whole term of expansion of a viable transplant in an organism. When adapting to microenvironment conditions and do not responding to local organo- and tissue-specific regulatory signals, PEFPC can have a role of "plastic building material", realizing the function of morphogenesis and recovery of the structures in a damaged area [22, 52, 89].

No doubt, that dysbalance in the interaction of the systems for providing body homeostasis, results in the following decrease of the threshold of an organism stability to the effect of unfavorable factors of inner and outer environment. At this background an acute period of the organism's response to a provoking factor is prolonged, often turning into a chronic form of its manifestation. Transition of the immune inflammatory process into a chronic form, which is often associated with the development of autuimmune diseases (AID), can be an example of the development of such events at the level of immune system [14, 18, 65].

Obviously, the pathology developed in such a form in one of its components of neuro-immune-endocrinic sphere will stipulate the development of dysfunctional state of other systems. When correcting the caused function of each system of the homeostasis "golden triangle" [33, 35], an improvement of inter-system



Матеріал, захищений авторським правом

прометированной функции каждой системы "золотого треугольника" гомеостаза [33, 35] мы вправе ожидать улучшения межсистемных взаимодействий. Этот тезис должен быть основополагающим при поиске путей и средств эффективного лечения большинства патологических состояний организма. Более того, на примере АИЗ можно проследить как общие механизмы развития патофизиологического процесса, так и особенности влияния на него применяемых ПЭФПК. Экспериментальные исследования в этом направлении являются основополагающими, в связи с чем в общем перечне фундаментально-прикладных работ нашего института им уделяется серьезное внимание [14, 18, 67].

Абсолютное большинство патологических процессов протекает в организме млекопитающих с участием субстратов ИС, включая иммунокомпетентные клетки (ИКК) [33, 40, 49, 51, 56]. При этом отмечается, что на характер и степень развития этих процессов существенное влияние оказывают нарушение взаиморегулирующей активности различных субпопуляций ИКК и отклонение от физиологического баланса уровня продуцируемых ими цитокинов [8–10, 39, 51, 56]. Межклеточная взаимосвязь базируется на двух важнейших механизмах ее реализации: непосредственно на основе межклеточных контактов и путем акцепции клетками продуцируемых цитокинов [8, 9, 51, 78, 135]. Цитокины исследованы достаточно и в задачу нашей работы не входит детальный их анализ. И все же цитокины представляют собой базовые полипептидные гормоны, хотя этот термин часто используют для обозначения молекул, продуцируемых клетками ИС или действующих на эти клетки. В совокупности с другими гормонами цитокины реализуют свое действие, связываясь со специфическими поверхностными рецепторами мембран клеток-мишеней [38, 144]. В абсолютном большинстве они являются короткоживущими и осуществляют свою регуляцию либо локально на другие клетки (паракринно), либо на их продуцирующие клетки (аутокринно), или же дистантно системно (эндокринно) [8, 10, 78].

Главнейшими свойствами цитокинов являются дублируемость какой-либо активности многими из них, а также плейотропизм [8, 9, 56, 78, 129]. Понимание того, каким путем ИС реализует типы ответа на данный раздражитель, является важной темой современных исследований в иммунологии. Множество различных стимулов инициируют в ИС широкий спектр защитных механизмов и хотя наше представление об иммунорегуляции до настоящего времени остается неполным, определенные сведения о функционировании системы все же имеются.

Использование мышиных Т-клеточных клонов позволило установить факт поляризации Т-клеточно обусловленного иммунного ответа с активацией различных субпопуляций СД4$^+$ хелперных (Тх) клеток, вырабатывающих присущие каждой субпо-

interrelations should be supposed. This notion should be the basic when searching the ways and means of efficient treatment of the majority of pathological states of an organism. More over, on the example of AID we can observe both general mechanisms of the development of pathophysiological process and peculiarities of the effect of applied PEFPC on it. Experimental investigations at given direction are the basic ones, in this connection in a general list of fundamental and applied works of our Institute are of great attention [14, 18, 67].

An absolute majority of pathological processes occurring in mammalian organism with the participation of substrates, including the cells of immune system, immunocompetent cells (ICC) [33, 40, 49, 51, 56]. Thereat it is noted, that the character and development degree of these processes are significantly affected by the impairment of inter-regulating activity of various ICC subpopulations and deviation from a physiological balance of the level of produced by it cytokines [8–10, 39, 51, 56]. Intercellular interrelation is based on two the most important mechanisms of its realization: directly basing on intercellular contacts and by cell acception of produced cytokines [8, 9, 51, 78, 135]. Cytokines are investigated quite completely, and we did not set the aim of their detailed analysis. However, cytokines are basic polypeptide hormones, but this term is often used to name molecules, produced by immune system cells, affecting these cells [38, 144]. Together with other hormones, cytokines realize their effect by binding with specific superficial receptors of the membranes of cells-targets [38, 144]. In an absolute majority these are short-living cells, and accomplish their regulation both locally on other ones (paracrinically) or their producing cells (autocrinically), or distantly systemically [8, 10, 78].

Ability to duplication of any activity by many of cytokines, as well as pleiotropy are the main cytokine properties [62, 78]. Understanding of the way whether an immune system realizes the type of response to given irritant is an important topic of current investigations in immunology. A lot of different stimuli initiate a wide spectrum of protective mechanisms in immune system. In spite of the fact that our notions about immune regulation to the moment are insufficient, some information on the system functioning is available.

Usage of murine T-cellular clones allowed to establish the fact of polarization of T-cellular stipulated immune response with the activation of various subpopulations of CD4$^+$ helper cells (HC), producing cytokine forms which are characteristic for each subpopulation, and realizing certain functional loading. Two pools of cell-helpers was identified, among them Tx1 was responsible for realization of hypersensitivity



Матеріал, захищений авторським правом

пуляции формы цитокинов и реализующих определенные функциональные нагрузки. Идентифицировано два пула хелперных клеток, из которых Тх1 ответственен за реализацию реакций гиперчувствительности замедленного типа. Эти клетки секретируют такие цитокины, как ИЛ-2, ИФ-γ и ИФ-α, фактор некроза опухоли (ФНО) в изоформах -α и -β [14, 70, 78]. Цитокины, продуцируемые Тх1-клетками, являются провоспалительными, активируют макрофаги, ЕК-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты, усиливают продукцию антител с цитотоксической активностью IgG2a-изотипа [70]. Тх2-клетки секретируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13 после антигенной нагрузки, а также оказывают помощь В-клеткам в продукции широкого спектра антител. Предшественниками Тх1- и Тх2-клеток являются Тх0-лимфоциты, которые вырабатывают триггерные цитокины ИЛ-12 и ИЛ-4, проявляющие антагонистическую активность в ориентации дифференцировки Тх0-клеток в Тх1- или Тх2-пул [70, 135]. Вектор дифференцировки при антигенном стимуле определяется количественными соотношениями цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-12, а также характером антигенной нагрузки. В общем, первично активированные Тх0-клетки могут обеспечивать цитокиновое микроокружение, способствующее экспансии одного из видов ответа, ингибируя при этом другой, что обусловлено противоположной активностью цитокинов Тх1- и Тх2-клеток. Другими словами, активация Тх1-клеток приводит к проявлению провоспалительного эффекта, а Тх2-клеток — противовоспалительного.

Инициация и развитие всех видов иммунных реакций в рамках "физиологического коридора" сопровождаются транзиторным всплеском содержания цитокинов с поддержанием их на каком-то определенном уровне [56, 144]. Неспособность в силу тех или иных причин систем гомеостаза и прежде всего ИС завершать процесс в острой форме обусловливает его переход в хроническую фазу с высокой степенью вероятности инициации аутоиммунной патологии в виде АИЗ. В этом случае развивается дисбаланс внутри цитокиновой сети, так называемый "цитокиновый шторм" [70, 91]. Исходя из этого одной из форм лечения подобных состояний, т.е. с извращенным цитокиновым профилем, может быть использование экзогенных цитокинов, коррегирующих баланс про- и противовоспалительных медиаторов. Данное предположение подтверждается результатами клинико-экспериментальных исследований. Так, введение при инсулинзависимом сахарном диабете, аутоиммунной патологии, сопровождающейся гиперпродукцией цитокинов 1-го типа, антагонистов Тх-1-клеток и/или агонистов Тх-2-клеток, приводит к положительным результатам [88]. В этом же ракурсе можно рассматривать и результаты успешного применения ИЛ-4, ИЛ-10 и анти-ФНО-антител для купирования развития экспериментального ал-

of slow type. Such cells secrete such cytokines as IL-2, IF-γ and IF-α, necrosis tumor factor in -α and β-isoforms [14, 70, 78]. Cytokines, produced by Tx1 cells, are proinflammatory ones, they activate macrophages, NK cells and cytotoxic T-lymphocytes, accelerate production of antibodies with cytotoxic activity of IgG2a-isotype [70]. Tx2 cell secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 and IL-13 after antigen loading, as well as help B-cells in the production of a wide spectrum of antibodies. Tx0-lymphocytes, producing IL-12 and IL-4 trigger cytokines, manifesting antagonistic activity in the orientation of differentiation of Tx0-cells into Tx1- or Tx2-pool, are precursors of Tx1- and Tx2-cells [70, 135]. Vector of differentiation at antigenous stimulus is determined by a quantitative ratio of IL-12 and IL-4 cytokines, as well as the character of antigen loading. In general, initially activated Tx0 cells can provide a cytokine microenvironment, promoting to the expansion of one response type, thereat inhibiting another one, that is stipulated by an opposite cytokine activity of Tx1- and Tx2-cells. By another words, the activation of Tx1-cells results in the manifestation of proinflammatory effect, and activation of Tx2-cells — to antiinflammatory one.

Initiation and development of all types of immune responses within the frames of "physiological passage" are accompanied with transitory splash of cytokine content with their keeping at a certain level [56, 144]. Incapability of homeostasis systems and, first of all, immune system of finishing the process in an acute form, stipulates its transition into a chronic phase with a high degree of probability of autoimmune pathology initiation like AID. In this case a dysbalance inside a cytokine net, so-called "cytokine storm" [70, 91] is developed. Proceeding from this fact, the usage of exogenous cytokines, correcting the balance of pro- and antiinflammatory mediators, can be one of the forms of such states treatment, i.e. ones with distorted cytokine profile. Given supposition is confirmed with the results of clinical and experimental investigations. Introduction of Tx1- and Tx2-cells antagonists at insulin-dependent Diabetes mellitus, which is an autoimmune pathology, accompanying with hyperproduction of type 2 cytokines, shows positive results [88]. The results of successful application of IL-4, IL-10 and anti-FHO-antibodies for cupping the development of experimental allergic encephalomyelitis, in the keeping of the course of those Tx1-cells participate, can be foreshortened in the same way [99, 135]. At the same time to treat visceral liesmaniosis, which is the pathology, related to the prevailing of cytokines, produced by Tx-2 cells, opposite to them interferon-γ is applied [116].

However, in spite of distinct positive results of such a pharmacotherapy, possibility of the usage of



Матеріал, захищений авторським правом

лергического энцефаломиелита (ЭАЭ), в поддержании течения которого принимают участие Тх1-клетки [99, 135]. В то же время для лечения висцерального лейшманиоза, патологии, связанной с преобладанием цитокинов, продуцируемых Тх-2-клетками, применяют оппозитный им интерферон-γ (ИФ-γ) [116].

Однако, несмотря на определенные положительные результаты такого рода фармакотерапии, возможность использования цитокинов per se как лекарственных средств для лечения ряда патологий, включая и АИЗ, является проблематичной. В последнее время получены данные, свидетельствующие о том, что абсолютное большинство цитокинов обладает плейотропным действием на различные клетки фундальных систем обеспечения бодигомеостаза [8, 56]. При этом действие цитокинов реализуется как в отношении регуляторных, так и эффекторных звеньев ИС. В связи с этим применение моно-, а также комплексной цитокиновой терапии всегда связано с риском развития непредсказуемых последствий. Например, применение ИЛ-4 как противовоспалительного цитокина при лечении реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), развивающейся на фоне активации провоспалительного цитокинового каскада, вызывало не ингибицию развития синдрома, а его активацию [91]. Дополнительным осложняющим моментом такой тактики цитокинотерапии может быть то, что один и тот же цитокин потенциально обладает способностью проявлять оппозитную активность (от стимуляции до ингибиции) в зависимости от степени и характера антигенной нагрузки на ИС, а также фазы развития иммунного ответа [51, 56, 129]. Другими словами, проявление той или иной активности вводимого цитокина может определяться фазой развития иммуновоспалительной реакции, а следовательно, степенью изменения цитокинового профиля организма в этих условиях.

Более перспективными являются апробация и внедрение в клиническую практику модуляторов системного воздействия, коррегирующих функциональный статус систем обеспечения бодигомеостаза, т.е. нейроиммуноэндокринной сферы. Оптимальным, с нашей точки зрения, может быть применение "полифункциональных" препаратов, обладающих, во-первых, потенциально способностью продуцировать широкий спектр биологически активных субстанций, во-вторых, возможностью продуцировать те из них, в которых в данный момент нуждается организм для коррекции генерального цитокинового профиля и минимизации экспансии патологического процесса. В значительной степени наша концепция совпадает с концепцией фундатора антигомотоксической терапии немецкого врача-гомеопата профессора Ганса Генриха Реккевега, утверждающего, что "...для излечения любых болезней необходимо воздействие сразу несколькими лекарственными средствами..., восста-

cytokines per se as therapeutical means for treatment of many pathologies, including AID, is quite problematic. Recently there are the data, testifying that an absolute majority of cytokines possess a pleiotropic effect on different cells of main systems for "body homeostasis" providing [8, 56]. Thereat their effect is realized both in respect of regulatory and effectory links of immune system. In this connection application of mono- and complex cytokine therapy always is related to the risk of development of unexpected consequences. For example, IL-4 application as antiinflammatory cytokine when treating graft versus host reaction (GVHR), developed at the background of activation of proinflammatory cytokine cascade, caused an activation of syndrome development, but not its inhibition [91]. Additional complicating moment of such a cytokine-therapy tactics can be the fact, that one and the same cytokine possesses potentially the capability of manifestation of an opposite activity (from stimulation to inhibition) depending on the degree and character of antigen loading on an immune system, as well as the phase of immune response development [54, 64, 129]. By another words, manifestation of a certain activity of introduced cytokine can be determined with the phase of development of immune inflammatory response, and, therefore, by the value of the change of an organism cytokine profile under these conditions.

Approbation and introduction into clinics of the modulators of systemic effect, correcting a functional status of the systems for "body homeostasis" providing, i.e. neuroimmune endocrinic sphere, are more perspective aspects. From our point of view, application of "polyfunctional" preparations, possessing, first of all, a potential capability of producing a wide spectrum of biologically active substances, then, the possibility to produce the ones necessary at the moment for an organism to correct a general cytokine profile and expansion minimization of pathological process, is optimum. Generally, our conception coincides with the notion of HG Reckeveg, who is the founder of antihomotoxic theory, noting that "...to treat any diseases it is necessary to affect at the same time with several therapeutic means, recovering sequenced interaction of immune, endocrine and nerve systems" [47]. Namely their unsynchronized interaction, as well as perversion of autocrine profile in each of them can be the cause of initiation of the development of many pathologies. Indeed, under the conditions of the development of pathologies, which were earlier explained as immune deficits, in reality there is no deficit, but dysfunctional state of the subpopulations of immunoregulatory cells (Tx-1 and Tx-2) and, as a result, dysbalance of a cytokine profile of the organism in a whole.



Матеріал, захищений авторським правом

навливающими согласованные взаимодействия иммунной, эндокринной и нервной систем..." [47]. Именно их несинхронизированное взаимодействие, а также искажение аутокринного профиля в каждой из них может быть причиной инициации развития многих патологий. Действительно, в условиях развития тех патологий, которые ранее истолковывались как иммунодефициты, реально имеют место не дефицит, а дисфункциональное состояние субпопуляций иммунорегуляторных клеток (Тх-1 и Тх-2) и, как следствие, разбалансировка цитокинового профиля организма в целом.

Стратегия лечения патологических состояний, к которым можно отнести и АИЗ, должна соответствовать основным положениям теории сетей второй генерации ИС. Согласно этой теории длительно текущие иммуновоспалительные процессы являются следствием развивающегося дисбаланса продуцируемых про- и противовоспалительных цитокинов, а также изменяющейся в этих условиях активности продукции аутореактивных иммуноглобулинов [14, 34, 83, 143]. В результате нарушается скоординированная связь между отдельными клонами ИКК. Исходя из этого, основополагающим принципом лечения заболеваний, в основе которых лежат эти процессы, должна быть коррекция взаимодействия клонов ИКК. Косвенно такого рода предположения подтверждаются эффективностью клинического применения "системных" модуляторов, какими являются гемо- и миелотрансфузии [72, 75, 105, 108, 121, 128, 141]. Резюмируя сказанное, можно прийти к выводу, что для восстановления широкого спектра развивающихся дисрегуляторных состояний ИС при различных патологиях организма человека требуются препараты не локальной клональной направленности, а надклональной, системной регуляции нейроиммуноэндокринного комплекса. Эффект их лечебного действия может быть достигнут коррекцией статуса любой из систем, входящей в этот комплекс. К такого рода препаратам, т.е. обладающим свойствами надклональной регуляции, можно отнести ПЭФПК. Считается, что их биологическая активность ассоциирована с присутствующими в клетках и тканях, так называемых белков зоны беременности (БЗБ). В зависимости от классификации они могут быть сгруппированы по происхождению в эмбриофетальные и трофобластические белок-пептидные структуры, а по функции — с гормональной, ферментативной или пока еще не установленной активностью [15, 22, 41, 52, 54, 59, 60, 63, 64, 139].

Рассматривая вопрос обеспечения бодигомеостаза с позиций неоходимости реализации нейроиммуноэндокринных взаимодействий и анализируя характер функциональной активности регуляторных субстанций, продуцируемых той или иной структурой, входящей в ПЭФПК, можно прийти к выводу, что БЗБ вне зависимости от принадлежности к какой-либо белок-пептидной струк-

The strategy for pathological states treatment, as well as AID, should be corresponded to main notions of the theory of the second generation of immune system. According to this theory, long-term immune inflammatory processes are the consequence of developing dysbalance of produced pro- and antiinflammatory cytokines, as well as changed under these conditions activity of the production of autoreactive immunoglobulins [14, 34, 83, 143]. As a result co-ordinated link between single clones of ICC is damaged. Proceeding from this fact, correction of the interaction of ICC clones should be the basic principle for the treatment of diseases, having these processes in the base. Indirectly such suppositions are confirmed by the efficiency of clinical application of "systemic" modulators, i.e. hemo- and myelotransfusions [72, 75, 105, 108, 121, 128, 141]. Summarizing all the mentioned above, it should be concluded, that to recover a wide spectrum of developing dysregulatory states of immune system at different pathologies in a human organism, we need the preparations of non-local clonal direction, but over-clonal, systemic regulation of neuroimmune endocrinic complex. Their clinical effect can be achieved when correcting the status of any system of this complex. PEFPC can be related to such preparations, possessing characteristics for over-clonal regulation. It is considered, that their biological activity is associated with present in cells and tissues so-called proteins of pregnancy zone (PPZ). Depending on the classification, they can be grouped by origin as embryo-fetal and trophoblastic protein-peptide structures, and on the function: ones with hormone, enzymic or not yet established activity [15, 22, 41, 52, 54, 59, 60, 63, 64, 139].

Considering the question on providing "body homeostasis" from positions of the necessity for realization of neuroimmune-endocrinic interactions and analyzing the character of a functional activity of regulatory substances, produced by any structure of PEFPC, it should be concluded, that PPZ independently on belonging to any protein-peptide structure has an integral characteristic, which is the capability to manifest immune modulating activity. We can see this when studying a regulatory potential and biological activity of such PEFPC representatives as placenta, embryonic liver cells (ELC) and embryonic neuronal tissue (ENT). Accumulated information testifies to the fact that placenta, which is considered as a certain adaptational organ, located on periphery and capable of maintaining the constancy of individual, different from the mother's internal environment of developing organism due to the production of cytokines, various metabolites, presence of regulatory structures etc, has the most manifested activity in respect of substrates of immune system. Placenta has been



Матеріал, захищений авторським правом

туре присуще интегральное свойство — способность проявлять иммуномодулирующую активность. Это можно проследить при изучении регуляторного потенциала и биологической активности таких представителей ПЭФПК, как плацента, КЭП и эмбриональная нервная ткань (ЭНТ). Накопленная информация свидетельствует о том, что наиболее выраженную активность в отношении субстратов ИС проявляет плацента, которая рассматривается как своеобразный адаптационный орган, вынесенный на периферию и способный за счет продукции цитокинов, различных метаболитов, наличия регуляторных структур и т.д. поддерживать постоянство индивидуальной, отличающейся от матери внутренней среды развивающегося организма [12, 22, 41, 59, 96]. Проявляя высокой степени эндокринную активность, плацента инициирует развитие широкого спектра взаимообусловленных изменений, реализуя полный гормональный контроль над организмом беременной [37, 57, 59]. Одним из основных векторов проявления функциональной активности плацентарных гормонов является прямое или опосредованное действие на различные структуры иммунокомпетентной сферы [13, 63, 64, 67, 139]. Хорионический соматотропин, например, проявляет иммуносупрессивную активность в отношении ИКК, реализующих реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Более широкий спектр иммуномодулирующих свойств присущ хорионическому гонадотропину: местное иммуносупрессивное, ингибиция РБТЛ и смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), причем строго дозозависимая. Локальную иммуносупрессивную активность в отношении Т- и В-клеток проявляет и синтезируемый в синцитиотрофобласте плацентарный лактоген (ПЛ), концентрация которого в трофобласт-децидуальном пространстве значительно выше, чем в периферической крови [13, 42, 59]. В то же время продукт децидуального эндометрия пролактин в большей степени оказывает позитивное влияние на ИКК [13]. Блокирование синтеза ПЛ вызывает снижение уровня ответа Т-клеток в СКЛ и, что немаловажно, снижение массы тимуса [13, 22], указывая на его способность участвовать в процессах либо стимуляции пролиферации тимоцитов, либо активации апоптотических процессов в них. Стимулирующее действие на иммуноциты, в большей степени на В-лимфоциты, оказывает и хорионический тиреотропный гормон [59, 60]. Под его влиянием изменяется изотипный репертуар продуцируемых Ig в сторону увеличения блокирующих антител, реализующих феномен иммунного усиления [13, 34]. Достаточно интригующей является способность выработки плацентой хорионического адренокортикотропного гормона (ХАКТГ). Высказывается предположение о возможном альтернативном механизме повышения функции коры надпочечников при беременности, реализуемом за счет изменения уровня содержания АКТГ, синте-

considered as an adaptational organ, located on a periphery and capable of the stability maintenance in the developing organism, which is different from the mother's internal environment due to the production of cytokines, various metabolites and the presence of regulatory structures etc [12, 22, 41, 59, 96]. By manifesting a high level of endocrine activity, placenta initiates the development of a wide spectrum of interstipulated changes, realizing a complete hormone control over the organism of pregnant woman [37, 57, 59]. One of the main vectors of the manifestation of functional activity of placental hormones is direct or indirect effect on various structures of immune-competent sphere [13, 63, 64, 67, 139]. For example, chronic somatotropin (CST) manifests immunosuppressive activity in respect of ICC, realizing the reaction of the lymphocytes blast-transformation (RLBT). A wider spectrum of immunomodulating properties is characteristic for chorionic gonadotropin (CGT): a local immunosuppressive, inhibition of RLBT and strictly dose-dependent combined culture of lymphocytes. A local immunosuppressive activity in respect of T- and B-cells is also manifested by placental lactogen, synthesized in scincitiotrophoblast, which concentration in trophoblast-decidual space is significantly higher, than in peripheric blood [13, 42, 59]. At the same time the product of decidual endometrium, prolactin, in a considerable degree positively affects ICC [13]. Blocking of placental lactogen synthesis causes a decrease of the level of T-cell response in combined lymphocytes culture and, that is of great importance, a decrease of thymus mass [13, 22], testifying to its capability to participate both in the processes for stimulation of lymphocytes proliferation, or the activation of apoptotic processes. Stimulating effect on immunocytes, in a greater extent than on B-lymphocytes, also affects chorionic gonadotropic hormone [59, 60]. Under its effect an isotypic repertoire of produced Ig, directed to an increase of blocking antibodies, realizing the phenomenon of immune rising, is changed [13, 34]. Quite an intriguing is the fact of production of chorionic adrenocorticotropic hormone (CACTH) by placenta. There is a supposition about a possible alternative mechanism of the function increase of adrenal cortex during pregnancy, realized due to the change of ACTH content, synthesized by placenta [59, 60]. However the fact, that hypophysis removal in pregnant rats results in the adrenal glands involution, does not exclude the capability of placenta to stimulate ACTH synthesis in hypophysis. Placenta, for example, synthesises in vitro thyro- and luteotropine stimulating releasing factors, which are analogues to produced by a reticular formation mediators. Such interactions are quite regular, substantiated and are not capable just production of a single hormone.



Матеріал, захищений авторським правом

зируемого именно плацентой [59, 60]. Однако тот факт, что удаление гипофиза у беременных крыс приводит к инволюции надпочечников, не исключает способности плаценты стимулировать синтез АКТГ в гипофизе [59]. Плацента, например, синтезирует *in vivo* тирео- и лютеотропинстимулирующие релизинг факторы, аналоги продуцируемым ретикулярной формацией медиаторам. Такого рода взаимодействия являются вполне закономерными, обоснованными и не замыкаются только на общности продукции какого-то одного гормона. Фактически проявление плацентой способности участвовать в активации АКТГ является одним из звеньев цепи развивающихся событий, направленных на ингибицию активности эффекторных клеток материнского организма в отношении "чужеродного трансплантата" [13, 39, 60].

Существенный вклад в развитие иммунных взаимодействий в системе "мать–плод" вносят продуцируемые плацентой моноамины. При определении концентрации ацетилхолина, серотонина и гистамина в сыворотке крови матери и плаценте было установлено, что количество плацентарного серотонина и ацетилхолина не увеличивается, тогда как гистамина повышается [59]. Такие изменения содержания гистамина обусловлены, по-видимому, необходимостью переориентации специфики проявления функциональной активности ИКК. В общей их популяции рецептор к гистамину экспрессируют Т-супрессоры [33, 34], для которых он может выступать в роли одного из триггерных факторов активации. Этим, видимо, и определяется способность цитокина предупреждать развитие угрозы прерывания беременности (УПБ) и тормозить наступление преждевременных родов, также рассматриваемых как иммунный конфликт, развивающийся на фоне снижения активности Т-супрессоров и активации эффекторных клеток матери [60]. Однако слишком высокая концентрация гистамина способствует развитию токсикоза, предупреждение которого при физиологическом протекании беременности (ФПБ) обеспечивается активацией гистаминазы, ее концентрация со 2-го по 6-й месяцы беременности повышается почти в 1 000 раз [59]. Высокая концентрация фермента и некоторое уменьшение продукции гистамина в последние сроки беременности снижают его способность активировать Т-супрессоры. В экспериментальных исследованиях показано, что в родах Т-супрессорная активность децидуальных лимфоцитов значительно ниже, чем в ранние сроки беременности [13].

В каскадно развивающиеся нейроиммуноэндокринные взаимодействия при беременности плацента вносит существенный вклад, не только продуцируя медиаторы с иммунотропной активностью, но и регулируя состояние других составляющих этой триады. Особый интерес представляет факт синтеза плацентой пептидов, по структуре

Practically manifestation by placenta of the capability to participate in ACTH activation is one of the links in a chain of developed events, directed to the activity inhibition of effector cells in a mother's organism in respect of "heterologous transplant" [13, 39, 60].

Produced by placenta monoamines make a significant contribution into the development of immune interactions in the "mother-fetus" system. When determining acetylcholine, serotonin and histamine concentrations both in a mother's blood serum and placenta it has been established that the quantity of placental serotonin and acetylcholine has not been increased , at the same time histamine quantity increases [59, 61]. Such changes of histamin content are, obviously, stipulated by the necessity of re-orientation of the specificity of manifestation of ICC functional activity. In their total population the receptor to histamine express T-suppressors [33, 34], to those it can play the role of one of three activation factors. Cytokine capability to prevent the development of spontaneous abortion and inhibit premature birth, which are also considered as immune conflict, developed at the background of the decrease of T-suppressor activity and activation of the mother's cells effectors are, probably, determined by this fact [60]. However quite a high histamine concentration promotes to toxicosis development, preventing of which in physiological pregnancy course is provided by the activation of histaminase, and its concentration beginning from the 2nd to 6th months of pregnancy increases practically by 1000 times [59]. A high enzyme concentration and a slight decrease of histamine production reduce its capability to activate T-suppressors at last pregnancy terms. Experimental investigations demonstrated that during labors the T-suppressor activity of decidual lymphocytes is significantly lower than at early terms of pregnancy [13].

Placenta makes a great contribution into cascade-developing neuro-immune-endocrinic interactions during pregnancy, producing mediators not just with immunotropic activity, but also regulating the state of other components of this triade. The fact of accumulation by placenta of peptides identical on the structure to brain neuropeptides, namely endorphins and encephalins is of special interest. These peptides like the whole family of the hormones with ACTH-activity, have the same progenitor, proopiomelanocartine [104]. Possessing the property of autocrinic regulators, i.e. determining a functional status of CNS cells, synthesizing them, encephalins and endorphins manifest a regulatory activity in respect of ICC, expressing receptors to them [3, 5, 43, 74]. As for the direction of an immune modulating activity of neuropeptides, there are various data, testifying both to the stimulation and suppression of the ICC function. Under cer-



Матеріал, захищений авторським правом

идентичных нейропептидам головного мозга, а именно эндорфинам и энкифалинам. Эти пептиды, подобно всему семейству гормонов с АКТГ-активностью, происходят из общего предшественника — проопиомеланокартина [104]. Обладая свойством аутокринных регуляторов, т.е. определяя функциональный статус синтезирующих их клеток ЦНС, энкифалины и эндорфины проявляют регуляторную активность к ИКК, экспрессирующим к ним рецепторы [43, 74]. Что касается направленности иммуномодулирующей активности нейропептидов, то существуют неоднозначные данные, свидетельствующие как о стимуляции функции ИКК, так и супрессии. При определенных концентрациях β-эндорфин активирует Т-супрессоры подобно высоким дозам лектина Кон-А, а при совместном их применении наблюдается синергизм действия [6, 59]. После внесения пептида в культуру мононуклеаров периферической крови человека в зависимости от дозы наблюдались как стимулирующий, так и ингибирующий эффекты синтеза противовирусных антител [64]. Вместе с тем показано, что нейропептиды в широком диапазоне концентраций могут стимулировать ответ Т-клеток на митогены, например, β-эндорфин проявляет дозозависимую стимулирующую активность к ИКК в системах *in vivo* и *in vitro*. Еще более выраженную активность к этим клеткам проявляли мет- и лейэнкифалины. Продукция плацентарных нейропептидов при ФПБ усиливается к концу гестационного периода и, наряду с другими факторами, может усиливать активацию ИКК, создавая условия для физиологического разрешения иммунного отторжения плода — родов.

В общем спектре БЗБ присутствуют и другие продуцируемые плацентой белки, обладающие иммунотропностью и способностью изменять функциональный статус ИКК. Выделенный из сыворотки крови беременных женщин трофобластический гликопротеин (ТБГ) $\beta_1$ [54] обладает выраженным иммуномодулирующим действием, ингибируя РБТЛ, реакции СКЛ, стимулируя продукцию миграции ингибирующего фактора [13, 54, 64, 67] и т.д. Он определяется уже на 4–6-й неделе беременности, но достигает максимальной концентрации к последним неделям пренатального периода. В различные сроки беременности "чувствительность" ИКК к этому гликопротеину различна. Факт усиления процесса Кон-А-активированной продукции Т-супрессоров у беременных [63, 93] в полной мере соответствует представлению о том, что содержание субпопуляции Т-супрессоров в периферической крови беременных женщин среди ТБГ-положительных лимфоцитов существенно выше, чем у небеременных. К последним срокам беременности их уровень достигает 50% от всех Т-супрессорных клеток [13].

Полипептидный белок $\alpha_2$-макроглобулин ($\alpha_2$-МГ), являясь самым высокомолекулярным из всех

tain concentrations β-endorphin activates T-suppressors in the same way with high doses of Con-A lectine, but during their combined application the effect synergism is observed [6, 53]. After a peptide introduction into the mononuclear culture of human peripheric blood depending on the dose both stimulating and inhibiting effects of the synthesis of antiviral antibodies are observed. In addition, it has been shown, that neuropeptides with a wide range of concentrations can stimulate T-cell response to mitogens; for example, β-endorphin, manifests a dose-dependent stimulating activity to ICC in *in vitro* and *in vivo* systems [64]. More manifested activity to these cells has been shown by meth- and leiencephalines. Placental neuropeptides production during a physiological pregnancy course is increased up to the final stage of gestational period and, together with other factors can accelerate the ICC activation, providing the conditions for a child birth, which is a physiological outcome of a fetus immune rejection.

In the whole spectrum of PPZ there are other proteins, produced by placenta, possessing immunotropicity and capability of changing the ICC functional status. Isolated from the blood of pregnant women the trophoblastic $\beta_1$-glycoprotein (TBG) possesses a manifested immune modulating effect, inhibiting RLBT, mixed lymphocytes culture (MLC) reactions, stimulating the production of an inhibiting factor migration [13, 54, 64, 67] etc. It even can be determined to the 4–6th week of pregnancy, but achieved a maximum concentration up to last weeks of a prenatal period. At various pregnancy terms the ICC susceptibility to this glycoprotein is the different. The fact of an increase of the process of Con-A-activated production of T-suppressors in pregnant women [63, 93] completely corresponds to our notion that the content of T-suppressors subpopulation in a peripheric blood of the latter is significantly higher among TBG-positive lymphocytes than in non-pregnant ones. Up to final pregnancy terms its content reaches 50% of all T-suppressor cells [13].

$\alpha_2$-macroglobulin ($\alpha_2$-MG), being the most highly molecular one among all PPZ has been also produced by trophoblast and possesses, like TBH, the receptors on ICC, mostly on T-lymphocytes and monocytes [13, 55, 63]. Immune modulating activity of $\alpha_2$-RAM is manifested directly in the suppression of T-cells, realizing the responses of cellular-mediated immunity [22, 63, 104]. It is known, that $\alpha_2$-RAM damage by proteases promoted to the recovery of the ICC function [51]. In respect of the mechanism of the $\alpha_2$-RAM effect, its possible role as prostaglandin antagonists has been noted [51, 57].

One considers that immune modulating activity of PPZ is realized at the level of recognition of antigen



Матеріал, захищений авторським правом

БЗБ, также продуцируется трофобластом и имеет как и ТБГ рецепторы на ИКК, преимущественно на Т-лимфоцитах и моноцитах [13, 55, 59]. Иммуномодулирующая активность $\alpha_2$-МГ проявляется непосредственно в супрессии Т-клеток, реализующих реакции клеточно-опосредованного иммунитета [22, 63, 104]. Известно, что разрушение $\alpha_2$-МГ протеазами способствует восстановлению функции ИКК [51]. Указывается на возможную роль механизма действия $\alpha_2$-МГ как антагониста простагландинов [51, 57].

Считается, что иммуномодулирующая активность БЗБ реализуется на уровне распознавания антигенных структур, активации процесса и клональной экспансии антигенраспознающих клеток [42]. Подтверждением может быть реализация активности ассоциированного с беременностью $\alpha_2$-гликопротеина ($\alpha_2$-ГП). Этот белок секретируется децидуальными клетками плаценты и рассматривается как белок острой фазы из ряда α-МГ. Он существенно угнетает экспрессию на клетках антигенов HLA II класса. Ингибируя функциональную активность клеток, экспрессирующих антигены HLA DR-локуса, белок способен нарушать развитие иммунных реакций на уровне афферентного звена, а именно передачи сигнала с антигенпрезентирующих клеток на клеточный рецептор и структуры Т-клеток, акцептирующие костимуляционные сигналы (например, CD28) [22, 23, 53].Существует мнение, что механизм такого рода взаимодействий может быть результатом проявления способности $\alpha_2$-ГП ингибировать клеточные протеазы. Связываясь с протеолитическим ферментом, белок образует тетрамерный комплекс, не способный взаимодействовать с пептидным субстратом [51]. Не исключено, что $\alpha_2$-ГП распознает антигенный комплекс HLA DR как аналог протеаз, связываясь с ним и инактивируя функции лимфоцитов. Немаловажна способность $\alpha_2$-ГП ингибировать продукцию Т-хелперами ИЛ-2. Механизм его действия подобен циклоспорину-А, применение которого в трансплантологии и было обусловлено способностью ингибировать продукцию Т-клетками ИЛ-2, активацию Т-цитотоксических лимфоцитов (эффекторов) и в итоге пролонгировать сроки приживления трансплантата [71, 147].

В любом случае интегральная активность БЗБ прежде всего направлена на поддержание баланса между сниженным клеточно опосредованным и более выраженным гуморальным иммунитетом. При этом надо отметить, что на каждом этапе гестационного периода при ФПБ совокупность присутствующих в ПЭФПК регуляторных медиаторов с противоположной активностью не "провоцирует" развитие патологического состояния. Работы последних лет подтвердили, что сохранность ЭФПК во время беременности полностью зависит от типа цитокинов, продуцируемых инфильтрирующими децидуальные структуры Т-клетками. Показано, что

structures, activation of the process and clone expansion of antigen-recognizing cells [42]. Realization of the activity of associated with pregnancy *alphasub*2-glycoprotein ($\alpha_2$-GP) can be the confirmation. This protein is secreted by placental decidual cells and considered as a protein of an acute phase of α-MG lineage. It significantly suppresses an expression on HLA antigen cells of the 2nd class. By inhibiting the cell functional activity, expressing HLA DR-locus antigens, protein is capable of the impairment in the development of immune responses at the level of afferent link, namely, when transferring the signal with antigen-presenting cell to cellular receptor and T-cell structures, accepting co-stimulation signals (for example, CD28) [22, 23, 53]. There is a notion that the mechanism of such interactions can be caused due to manifestation of the $\alpha_2$-GP capability to inhibit cellular proteases. When binding with a proteolytic enzyme, protein forms a tetramere complex, not capable of the interaction with a peptide substrate [51]. Apparently, that $\alpha_2$-GP recognizes the HLA DR antigen complex as a protease analogue, binding with it and inactivating the lymphocytes function. T-helper capability to inhibit an IL-2 production is quite an important peculiarity. Its mechanism is similar to cyclosporine-A (scand-immune), which application in transplantology was stipulated by the capability of the inhibition of IL-2 production by T-cells, activation of T-cytotoxic lymphocytes (effectors) and, in a result: prolongation of the term of a transplant life [71, 147].

In any case an integral activity of PPZ, first of all, is directed to the keeping balance between a decreased cellular mediated immunity and more manifested humoral one. Thereat it should be noted, that at each term of gestational period during physiological course of pregnancy the whole complex of the present regulatory mediators in PEFPC with a contrast activity does not "provoke" the development of a pathological state. Recent works confirmed that the integrity of EFPC during pregnancy absolutely depended on the type of cytokines, produced by infiltrating decidual structures of T-cells. Indeed, it was shown that the ratio of cytokines, produced by Tx-1:Tx-2 cells in women with physiological pregnancy course was reduced comparing to their content in mitogen-stimulated ICC [130]. The results of experimental data also testify to this fact. Introduction of FHO-$\alpha_1$, IF-γ and IL-2 accelerated the resolution of germinal structures in the pre-disposed to abortion mice (CBAxDBA/2)F1, at the same time introduction of IL3 ND GM-CSF (cytokines of Tx2 cells) maximally increased viability of these structures [81, 82, 130]. More over, in (CBAxDBA/2)$F_1$ mice with the deficit of placental IL-4 and IL-10 a decrease in the intensity of the growth of germinal structures was observed in



Матеріал, захищений авторським правом

отношение цитокинов, вырабатываемых Тх-1 : Тх-2 клетками у женщин с ФПБ при сравнении с их содержанием в митогенстимулированных ИКК, снижено [130]. Этому соответствуют и результаты экспериментальных данных. Так, введение ФНО-$\alpha_1$, ИФ-$\gamma$ и ИЛ-2 ускоряло рассасывание зародышевых структур у предрасположенных к аборту мышей (СВА×ДВА/2)$F_1$, в то время как введение ИЛ-3 и ГМ-КСФ (цитокинов Тх-2 клеток) повышало максимально выживаемость этих структур [81, 82, 130]. Более того, у мышей (СВА×ДВА/2)$F_1$ с дефицитом плацентарных ИЛ-4 и ИЛ-10 отмечается в 50–70% случаев снижение интенсивности роста зародышевых структур, что ликвидируется внутрибрюшинным введением ИЛ-10 [79, 80]. Показано, что цитокины Тх-1 клеток, особенно ИФ-$\gamma$ и ФНО-$\alpha$, ослабляют рост эмбриона на ранних стадиях так же, как рост и функцию трофобласта [130]. Проведя мониторинг продукции цитокинов в разные периоды гестации, Lin с соавт. [115] отметили, что цитокины, продуцируемые Тх-2 клетками, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, определяются во внутреннем материнско-фетальном пространстве на протяжении всего срока гестации, тогда как ИФ-$\gamma$ определялся только в ранние его сроки. Учитывая, что цитокины Тх-1 клеток способствуют отторжению аллотрансплантата и таким образом усугубляют течение беременности, в материнско-фетальном регионе усиливается продукция цитокинов Тх-2 клеток, ингибирующих предыдущие. Действительно, у беременных мышей уровень экспрессии мРНК ИЛ-4 в плаценте был в 5–10 раз выше, чем в периферической крови [86]. В пользу такого рода переориентации цитокинового профиля говорят и повышение содержания у беременных женщин В-лимфоцитов в периферической крови и соответственно снижение показателя соотношения Т/В-лимфоцитов [13, 57]. Усиленная экспансия цитокинов Тх-2 клеток при беременности "устраняет" предпосылки развития на этом фоне АИЗ. Подтверждением этому является факт временной ремиссии ревматоидного артрита (патология, обусловленная активацией Тх-1 клеток) примерно у 70% беременных женщин с данной патологией [91]. Наряду с этим, развитие системной красной волчанки, при которой принципиальную патогенетическую роль играют аутоантитела (продуцируемые в повышенном количестве при активации Тх-2 клеток), существенно усугубляется, особенно у женщин, перенесших обострение процесса незадолго до зачатия [91].

Hill et al. [101] показали, что у женщин с хроническим развитием УПБ неясной этиологии трофобласт-активированные мононуклеары периферической крови (МПК) продуцируют в высоких концентрациях ИФ-$\gamma$, ФНО-$\alpha$ и фактор эмбриотоксической активности (ФЭА). Такие же клетки женщин, у которых беременность протекает нормально, вообще не продуцируют ФЭА и цитокины

50–70% of cases, that was cancelled with an intraperitoneal injection of IL-10 [79, 80]. In the works [130] it has been shown that Tx-1 cell type cytokines, especially IF-$\gamma$ and FNO-$\alpha$ make weak an embryo growth at early stages, as well as the growth and function of trophoblast. After carrying-out the monitoring of cytokine production at various gestation terms, Lin et al noted [115], that the cytokines, produced by Tx2-cells, IL-4, IL-5, IL-10, have been determined inside the mother's fetal surface within the whole term of gestation, at the same time IF-$\gamma$ was revealed just at its early terms. Taking into account that cytokines of Tx-1 cells promote to an allotransplant rejection and in such a way aggravate the pregnancy course, the production of Tx-2 cell cytokines, inhibiting the previous one, was accelerated in the mother-fetus region. Indeed, in pregnant mice the level of IL-4 mRNA expression in placenta was by 5–10 times higher than in a peripheric blood [86]. An increase of B-lymphocytes content in peripheric blood of pregnant women and, correspondingly, reduction of the ratio index of T/B-lymphocytes testify to the favor of such a re-orientation of a cytokine profile [13, 32]. An increased expansion of Tx-2 cell cytokines during pregnancy "cancels" the preconditions for AID development at this background. The fact of temporary remission of rheumatoid arthritis (pathology, stipulated by the activation of Tx-1 cells) in about of 70% of pregnant women with this pathology, confirms the given fact [91]. In addition, the development of systemic lupus erythematosus (SLE) significantly aggravates, when autoantibodies, produced in an increased number during the activation of Tx-2 cells, play a principal pathogenetic role, especially in women with an acute process before pregnancy [91].

Hill et al. [101] showed that in women with a chronic development of the risk of spontaneous abortion of unknown etiology, trophoblast-activated mononuclears of peripheric blood produce in high concentrations IF-$\gamma$, FHO-$\alpha$ and factor of embryotoxic activity. The same cells in women with normal pregnancy course do not produce the factor of embryotoxic activity and Tx-1 cell cytokines, but synthesize IL-4 and IL-10 at analogous antigen stimulation.

When studying the mechanisms for biological activity realization of produced by placenta substances, the researchers from our Institute established their new properties: capability of not just modulation of the ICC state, for example, activation of a suppressor immunity link of peripheric compartments of IS, but also modification of cytogenesis processes in its central organs [16, 19, 22]. More over, placenta capability with the transplantation of human placenta homogenate (HPH) to modulate the state of hemopoietic "place d'arms" in pregnant women have been demon-



Матеріал, захищений авторським правом

Тх-1 клеток, но синтезируют ИЛ-4 и ИЛ-10 при аналогичной антигенной стимуляции.

При изучении механизмов реализации биологической активности продуцируемых плацентой субстанций сотрудники нашего института, помимо указанных, установили и новые их свойства: способность не только модулировать состояние ИКК, например, активировать супрессорное звено иммунитета периферических отделов ИС, но и модифицировать процессы цитогенеза в центральных ее органах [16, 19, 22]. Более того, была продемонстрирована способность плаценты (в экспериментах с трансплантацией гомогената плаценты человека – ГПЧ) модулировать состояние гемопоэтического плацдарма беременных [22, 23]. Несмотря на оригинальность результатов, они являются закономерными, подтверждая активность продуцируемых плацентой гематотропных субстанций. В плаценте идентифицированы классические ростовые факторы кроветворной системы – ГМ-КСФ и М-КСФ [60, 104]. М-КСФ является не только мощным аутокринным фактором для инфильтрирующих плаценту макрофагов, но и трофическим, стимулирующим рост самой плаценты [59, 60]. Под действием М-КСФ клетки моноцитарно-фагоцитарной системы усиливают продукцию ФНО-α, в определенной концентрации активирующий Тх-2 клетки, что и отмечается при беременности. Судя по направленности действия в отношении клеток МФС, М-КСФ является отпозитным к $\alpha_2$-МГ цитокином [51, 60]. Плацентарный ГМ-КСФ также влияет на процессы пролиферации клеток и роста плаценты и усиливает выработку ФНО-α [22, 59, 104]. Он 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 $\alpha_2$-МГ, может при определенных условиях проявлять противоположную М-КСФ иммуномодулирующую активность. Вместе с тем надо отметить, что в наших работах по оценке гематотропной активности ГПЧ был установлен факт уникальной его способности амплифицировать функциональный статус компартмента малодифференцированных кроветворных предшественников – КОЕс-12 [22]. Был сделан важный вывод о том, что в плаценте присутствуют стимуляторы роста не только коммитированных кроветворных предшественников (например КОЕ-ГМ), но и их менее дифференцированных форм. Анализ продуцируемых плацентой цитокинов подтверждает эту точку зрения. Помимо КСФ-1 и ГМ-КСФ, плацента синтезирует интерлейкины: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 [41, 130, 139]. Ранее отмечалось, что разделение цитокинов на отдельные классы в какой-то степени является условным, поскольку вместе с традиционными КСФ в регуляции функционального состояния полипотентных стволовых

strated [22, 23]. In spite of original results, they are regular, confirming the activity of produced by placenta hematotropic substances. Indeed, in placenta classic growth factors of hemopoietic system, GM-CSF and M-CSF were identified [64, 104]. M-CSF is not just a strong autocrinic factor for macrophages infiltrating placenta, but also a trophic one, stimulating growth of placenta itself [22, 59, 104]. Under the effect of M-CSF the cells of monocyte-macrophage system accelerate FHO-α production, which under certain concentration activates Tx2-cells, that is revealed during pregnancy [51, 64]. Judging on the direction of the effect in respect of MPS cells, M-CSF is an opposite cytokine to #2-macroglobuline [22, 53]. Placental GM-CSF also affects the processes of cell proliferation and placenta growth, as well as increases the FHO-α production. This factor is capable of a stimulating effect on early precursors of T-lymphocytes, orienting their differentiation into CD4-cells, which express the receptor to IL-2, i.e. T-lymhocytes of proinflammatory differentiation cascade. Therefore, GM-CSF like $\alpha_2$-MG, under certain conditions can manifest an opposite to M-CSF immune modulating activity [55]. In addition it should be noted that in our investigations on the estimation of hematotropic activity of HPH the fact of its unique capability to amplify a functional status of the compartment of slightly differentiated hemopoietic precursors, CFUs-12 has been established [22]. An important conclusion was made about the fact, that in placenta not just growth stimulators of committed hemopoietic precursors were present, for example (CFU-GM), but also of their less differentiated forms. Analysis of produced by placenta cytokines confirms this point of view. Besides CSF-1 and GM-CSF, placenta synthesizes interleukines:IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 [41, 130, 139]. Earlier it was mentioned, that cytokines division into classes in some extent is conditional, because with traditional CSF also such cytokines as IL-1, Il-3, Il-6, IL-11, IL-12, IL-15 participate in the regulation of a functional state of polypotent hemopoietic stem cells (PHSC). Presence of IL-1 and IL-6 in this list allows to consider as possible the manifestation by placenta homogenate of hematotropic activity in *in vivo* system, that was confirmed by our results. Such an activity of HPH in respect of 12-days COEs, that is the closest form to PHSC, obviously, testifies to the presence in placenta of the factors for hemopoiesis regulation, similar to stem-cell factor (SCF), i.e. Still's factor [8, 44], possessing the capability to carry-out proliferation and PHSC differentiation. This factor is produced by fibroblasts, stromal, epithelial and endothelial cells, i.e. the structures, which are present in placenta.



Матеріал, захищений авторським правом

кроветворных клеток (ПСКК) принимают участие и такие цитокины, как ИЛ-1, ИЛ -3, ИЛ -6, ИЛ -11, ИЛ -12, ИЛ -15. Присутствие в этом перечне ИЛ-1 и ИЛ-6 позволяет считать возможным проявление гомогенатом плаценты гематотропной активности в системе *in vivo*, что и подтверждается полученными нами результатами. Такого рода активность ГПЧ в отношении 12-суточных КОЕс, являющихся наиболее приближенной формой к ПСКК, по-видимому, свидетельствует о наличии в плаценте факторов регуляции кроветворения, подобных стволовоклеточному фактору (СКФ), т.е. фактору Стилла [8, 44], обладающему способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку ПСКК. Этот фактор продуцируется фибробластами, стромальными, эпителиальными и эндотелиальными клетками, т.е. структурами, присутствующими в плаценте.

Таким образом, на основании анализа приведенных выше данных можно заключить, что полифункциональность действия плацентарных цитокинов может определяться их способностью проявлять иммуно- и гемопоэзкоррегирующую активность.

Активностью продуцировать вышеуказанные медиаторы и регулировать состояние многих систем обладает и другой представитель ПЭФПК, широко используемый в клинической практике, — КЭП. Несмотря на казалось бы достаточно подробную информацию, полученную при изучении этого биологического объекта, продолжаются исследования по идентификации его новых свойств и возможности расширения спектра показаний клинического применения. Общеизвестен факт высокой регенераторной способности эмбриональной печени [12]. Это свойство объясняется присутствием в ней печеночных стволовых клеток (hepatic stem cells — HSC), полифункциональных и обладающих высокой гемопоэтической активностью [23, 24, 49]. Максимальная концентрация этих клеток в эмбриональной печени человека отмечается на 6–14 неделе гестации [12, 19, 24]. В экспериментах с использованием иммунодефицитных мышей было показано, что КЭП человека способны восстанавливать лимфогемопоэтический комплекс мышей-реципиентов без развития выраженных иммуноконфликтных ситуаций [138]. В отличие от человеческого костного мозга КЭП, трансплантируемые иммунодефицитным мышам, не нуждались в предварительном создании "плацдарма" человеческих ростовых цитокинов для поддержания собственного роста. Данный факт свидетельствует о способности КЭП выступать в роли продуцента таких цитокинов, т.е. фактора аутокринной регуляции. Хотя в общей популяции КЭП и присутствуют относящиеся к Т-ряду клетки, все они экспрессируют маркеры незрелых лимфоцитов — ОКТ6, СД38; среди этих клеток лишь малое количество экспрессирует маркеры СД3/ТКРα, β/, характерные

Thus, basing on the analysis of the mentioned above data it should be concluded, that polyfunction of the effect of placental cytokines can be determined by their capability to manifest immuno- and hemopoiesis correcting activity.

Another representative of PEFPC, widely applied in clinics, embryonic liver cell (ELC) possesses an activity to produce the mentioned mediators and regulate the state of many systems. In spite of quite a detailed information, obtained when studying this biological object [12], the investigations on the identification of its new characteristics and opportunity to expand the spectrum of the indices for clinical application have been continued. It is a well-known fact that embryonic liver possesses a high regenerative activity. This property is explained by the presence in it of hepatic stem cells (HSC), possessing a high hemopoietic activity [23, 24, 49]. Maximum concentration of these cells in human embryonic liver was noted at 6–14 gestation weeks [12, 19, 24]. In experiments using immune deficient mice it was shown that human ELC are capable to recover lymphohemopoietic complex in mice-recipients without the development of manifested immune conflict situations. In contrast to a human bone marrow, ELC, being transplanted to immune-deficient mice, need no preliminary forming of a "place d'arms" of human growth cytokines for keeping their own growth [138]. This fact testifies to ELC capability to be a producent of such cytokines, i.e. factor of autocrine regulation. In spite of the fact that in total ELC population there are T-cells, all of them express markers of immature lymphocytes – OKT6, CD38; among these cells just a slight number of them express CD3 markers (TKPα, β), which are characteristic for mature ICC. Receptors to IL2 (CD25) are not identified on ELC. In the population of ELC there is a small content of antigen presenting elements, and in the cells possessing this capability a slight expression of II class antigens, the main complex of histocompatibility (MCH) was noted [16, 17], i.e. when transplanting ELC probability of the development of antigen-induced immune response was minimized, there are preconditions to form the tolerance of transplanted ICC (or their precursors) to host antigens. Hepatic stem cells phenotypically are related to $CD34^+$ cells and due to this marker we can not just identify them, but determine the level of differentiation. It is of great interest, that within a total volume of bone marrow the number of CD34+ cells is by 1.5–2 times higher, than in ELC of the mentioned gestation terms, however by means of immunofluorescent method it has been shown that fluorescence degree of various cells significantly differs. $CD34^+$ cells with a high fluorescence is by 2–3 times higher than ELC, than in bone marrow. It



Матеріал, захищений авторським правом

для зрелых ИКК. Не идентифицируются на КЭП и рецепторы к ИЛ-2 /СД25/. В популяции КЭП мало антигенпрезентирующих элементов, а у обладающих этим свойством клеток отмечается слабая экспрессия антигенов II класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) [19, 24], т.е. при пересадке КЭП минимизирована вероятность развития антигениндуцированного иммунного ответа, имеются предпосылки формирования толерантности пересаженных ИКК (или их предшественников) к антигенам хозяина. HSC с гемопоэтической активностью фенотипически относятся к СД34$^+$ клеткам и с помощью этого маркера удается не только их идентифицировать, но и определить степень дифференцировки. Интересно, что в общем объеме костного мозга СД34$^+$ клеток в 1,5–2 раза больше, чем в КЭП указанных сроков гестации, хотя степень свечения тех и других клеток существенно отличается. Высокосветящихся СД34$^{+++}$ клеток в 2–3 раза больше в КЭП, чем в костном мозге. Известно, что по мере дифференцировки кроветворных предшественников степень экспрессии СД34-маркера снижается и что СД34$^{+++}$ клеток в общем компартменте стволовых гемопоэтических предшественников представляют пул малодифференцированных клеток с высоким пролиферативным потенциалом [19]. Важно, что в популяции клеток, несущих СД34-маркер, присутствуют не только стволовые кроветворные, но и акцессорно-регуляторные элементы, определяющие их функциональный статус. Следовательно, трансплантируемые КЭП в организме реципиента могут коррегировать состояние гемопоэтического плацдарма как за счет экспансии донорских кроветворных предшественников, так и регуляции скомпрометированного гемопоэтического микроокружения и функционального состояния гемопоэтических предшественников реципиента [17, 106, 112]. Более того, получены убедительные данные о влиянии КЭП на состояние сотрансплантируемых с ними кроветворных элементов костного мозга и в целом функционального статуса миелотрансплантата. При сингенной трансплантации такого рода влияние проявляется в усилении колониеобразующей активности костного мозга, а при введении гистонесовместимого костного мозга — в снижении его иммунореактивности, выражающейся в минимизации степени развития наиболее неприятного последствия алломиелотрансплантации – РТПХ-синдрома [16, 19, 22]. Следовательно, КЭП обладают как минимум дуалистической активностью, реализуемой на уровне гемопоэтической и иммунокомпетентной сфер. Механизм реализации процесса модуляции состояния гемо- и иммунопоэза под действием КЭП может быть многогранным. Показано, что РТПХ в любой ее форме развивается на фоне дисрегуляции цитокинов ("цитокиновый шторм") [70, 91]. Например, при хроническом ее течении преобладают ИЛ-4 и ИЛ-10, продуцируемые СД4$^+$ Тх-2 клетками [91].

is known that with differentiation of hemopoietic precursors the expression level of CD34$^+$ marker decreases and CD34$^{+++}$ in the whole compartment of hemopoietic stem cells, represent the pool of slightly differentiated cells with a high proliferative potential (HPP) [19]. It is very important that in population of the cells with CD34 marker, not just hemopoietic stem cells are present, but also accessory-regulative elements, determining their functional status, i.e. transplanted ELC in a recipient's organism can correct the state of hemopoietic "place d'arms" both due to expansion of donors' hemopoietic progenitors, as well as regulation of status-impaires hemopoietic microenvironment and functional state of the recipient's hemopoietic progenitors [17, 106, 112]. More over, convincing data about the effect of ELC on the state of co-transplanted with them hemopoietic bone marrow elements and functional state of myelotransplant in the whole have been obtained. At such a syngenic transplantation the effect is manifested in an increase of colony forming activity in bone marrow, and when introducing histo-in-compatible bone marrow this index is shown in a decrease of its immune reactivity, manifesting in the minimization of the development value of the most unfavorable consequence after allomyelotransplantation, GVH-syndrome [16, 19]. Therefore, ELCs possess as minimum a double activity, realized at the level of hemopoietic and immunocompetent sphere. The mechanism of a process realization of the modulation of a hemo- and immunopoiesis state under ELC effect can be versatile. It was shown that GVHR in any of its form is developed at the background of cytokine dysregulation ("cytokine storm") [70, 91]. For example, during its chronic course IL-4 and IL-10, produced by CD4$^+$ Tx2-cells, prevail. IL-10 is the IL-1 antagonist, which activates T-cellular proliferation, including an increase of thymocytes content [19]. A decrease in IL-1 concentration can be an additional cause of the reduction of thymus cellularity under the conditions of a chronic stress during GVHR. In addition, IL-10 and IL-4 inhibit the IL-2 and IL-7 production, which potentiate each other and are quite important for expansion of T-cell clone. Neutralization of IL-7 or its receptors by monoclonal antibodies is accompanied with a critical decrease of thymus cellularity [8]. By other words, at chronic GVHR there are all the conditions for the development of thymus aplasia. Thereat injected ELC and products of their activity play the role of pleiotropic factor, correcting a disbalanced system of cytokine production.

Immunosuppressory activity of ELC in respect of allomyelotransplant is its the most intriguing property, which is characteristic namely for embryonic material, because the introduction with bone marrow



Матеріал, захищений авторським правом

ИЛ-10 является антагонистом ИЛ-1, который активирует Т-клеточную пролиферацию, включая увеличение содержания тимоцитов [19]. Снижение концентрации ИЛ-1 может быть дополнительной причиной уменьшения клеточности тимуса в условиях хронического стресса при РТПХ. Кроме того, ИЛ-10 и ИЛ-4 ингибируют продукцию ИЛ-2 и ИЛ-7, потенциирующих друг друга и крайне необходимых для экспансии клона Т-клеток. Нейтрализация ИЛ-7 или его рецепторов моноклональными антителами (МАТ) сопровождается критическим снижением клеточности тимуса [8]. Другими словами, при хронической РТПХ создаются все условия для развития аплазии тимуса. При этом вводимые КЭП и продукты их деятельности выступают как плейотропный фактор, корректирующий разбалансированную систему продукции цитокинов.

Иммуносупрессорная активность КЭП в отношении алломиелотрансплантата является наиболее интригующим ее свойством, присущим именно эмбриональному материалу, поскольку введение с костным мозгом взрослых гепатоцитов не вызывало таких изменений [17, 19], т.е. именно КЭП присуще свойство продуцировать иммунотропные субстанции. Одной из них может быть альфафетопротеин (АФП). Этот фетальный белок вырабатывается КЭП на протяжении всего срока беременности и выступает в роли пускового фактора — активатора супрессорного звена иммунитета [1, 13, 60, 64], ингибирующего Т-эффекторы. Предполагается и альтернативный вариант действия АФП, реализуемый не через взаимодействие пептида с рецепторами мембран Т-супрессоров, а путем изменения функции Т-хелперов. Показано, что АФП ингибирует экспрессию Ia-структур на антигенпрезентирующие клетки (АПК) [1]; Ia-белок формирует с процессированным АПК антигеном комплекс, презентируемый Т-хелперам [14], запуская каскад специфических иммунных реакций по отношению к данному антигену. Таким образом, АФП, подавляя экспрессию Ia-белка, препятствует развитию начальных этапов иммунного распознавания антигена и способствует накоплению непроцессированного АПК антигена. В этой форме антиген стимулирует формирование в организме Т-супрессоров и толерантность к нему [6, 34]. Иначе говоря, оба вектора направленности действия АФП в итоге могут вызывать активацию Т-супрессоров. Не исключены и другие механизмы проявления иммунотропной активности КЭП. Их объяснение связано с пониманием возможности модификации цитокинового профиля реципиента путем изменения активности регуляторных субпопуляций СД4 Т-хелперов (Тх-1 и Тх-2) [102, 103]. Эмбриональная печень содержит достаточное количество тучных клеток (ТК) и их предшественников. Показана трансформация их в культуре *in vitro* из КЭП с продукцией гистамина [107]. Известно также, что ТК в организме синтезируют значитель-

of adult hepatocytes did not cause such changes [17], i.e. namely ELC have the capability to produce immunotropic substances. One of them can be α-fetoprotein (AFP). This fetal protein is produced by ELC within the whole pregnancy term and is playing the role of a starting factor, activator of a suppressory link of immunity [1, 13, 60, 64], inhibiting T-effectors. There is an alternative variant being supposed about the AFP effect, realized not through a peptide interaction with the receptors of T-suppressor membranes, but by changing the function of T-helpers. It was shown that AFP inhibited expression of Ia-structures on antigen-presenting cells (APC) [1], Ia-protein formed with processed by antigen an APC complex, presented to T-helpers [14], starting a cascade of specific immune reactions regarding to given antigen. Thus, AFP, suppressing expression of IL-protein, prevents the development of initial stages of an antigen immune recognition and promotes to the accumulation of non-processed by APC antigen. In this form antigen stimulates forming in an organism of T-suppressors and tolerance to it [6, 34]. By other words, both vectors of the direction of AFP effect as a result can cause an activation of T-suppressors. Other mechanisms for the manifestation of ELC immunotropic activity are not excluded. Their explanation is related to the understanding of the probability of the modification of a recipient's cytokine profile by changing the activity of regulatory subpopulations of CD4 T-helpers (Tx1- and Tx2-). Embryonic liver contains a sufficient number of mast cells (MC) and their progenitors. Their transformation in a culture in vitro from ELC with histamine production has been shown. It is also known that MCs in an organism synthesize a significant quantity of IL-4 [102, 103]. This cytokine except an inhibition of cellular immunity responses, is the mediator of Tx2- cell autocrine regulation [107]. Thus, ELC possesses one more opportunity to interfere the process of GVHR inhibition of formed from allomyelotransplant antigen-reactive T-cells. Inhibition activity regarding the latter can be manifested by the present in ELC natural suppressors (NS), which are phenotypically related to zero and characterized as $CD4^-CD8^-\alpha\beta^+$ or $CD4^-CD8^-\alpha\beta^-$ [132]. Enriching them with allogeneic BM decreases its GVHR activity, and NS activity is non-restricted with antigen differences on the main histocompatibility complex. NS cloning *in vitro* is accompanied with the production by them of cytokine, inhibiting secretion of IL2 in a mixed culture of lymphocytes and APC function [8, 133]. It could be supposed, that we speak about IL-4 or IL-10, produced by Tx2- cells or similar ones.

The highest concentration of NS is noted in the tissues with a high hemopoietic activity and expansion of erythroid and myeloid hemopoiesis lineages [51],



Матеріал, захищений авторським правом

ное количество ИЛ-4 [8]. Этот цитокин, помимо ингибиции реакций клеточного иммунитета, является медиатором аутокринной регуляции Тх-2 клеток. Следовательно, КЭП обладают еще одной возможностью вмешиваться в процесс ингибиции РТПХ-активности формируемых из алломиелотрансплантата антигенреактивных Т-клеток. Ингибирующую активность в отношении последних могут проявлять и присутствующие в КЭП естественные супрессоры (ЕС), которые фенотипически относятся к нулевым клеткам и характеризуются как $CD4^-CD8^-\alpha\beta^+$ или $CD4^-CD8^-\alpha\beta^-$ [132]. Обогащение ими аллогенного КМ снижает его РТПХ-активность, причем активность ЕС не рестриктирована антигенными различиями по главному комплексу гистосовместимости. Клонирование ЕС *in vitro* сопровождается выработкой ими цитокина, ингибирующего секрецию ИЛ-2 в СКЛ и функцию АПК [8, 133]. Можно предположить, что речь идет об ИЛ-4 или ИЛ-10, продуцируемом Тх-2 клетками или им подобными.

Наибольшая концентрация ЕС отмечается в тканях с высокой гемопоэтической активностью и экспансией эритроидного и миелоидного ростков кроветворения с характерными признаками функции эмбриональной печени [49, 132]. Тот факт, что КЭП не проявляют высокой колониеобразующей активности в классических тестах их оценки, в целом не свидетельствует о низкой гемопоэтической активности КЭП. Кроветворные элементы КЭП, как отмечалось выше, относятся в основном к мультипотентным недифференцированным предшественникам [19, 23, 89, 117], функциональный статус которых находится под контролем СКФ [44, 107]. Акцептором этого лиганда на мембране является c-kit-протоонкоген-рецептор (СД117). Оказалось, что в общем пуле КЭП $c\text{-}kit^+$ клеток в 3–5 раз больше, чем в КМ [107]. Такая концентрация $c\text{-}kit^+$ клеток в КЭП в какой-то степени коррелирует с содержанием в ней $СД34^{+++}$ клеток с высоким пролиферативным потенциалом (КВПП). Способность формировать колонии в селезенке эти клетки приобретают только после прохождения ряда дифференцировочных этапов.

В последнее время получены данные, в новом свете характеризующие КЭП. С помощью проточной цитофлуориметрии и МАТ (анти-c-kit, integrin α6/β, CD45, TER119) из общего пула КЭП удалось выделить фракцию КВПП и способных в системе *in vitro* формировать колонии с подобными элементами – КВПП-гемопоэтических колониеобразующих единиц (ГКОЕ) [138]. Формирование колоний наблюдалось при сокультивировании FACS-выделенных клеток с ламинином, входящим в группу субстанций экстрацеллюлярного матрикса, для которых рецепторами являются субъединицы интегринов $\beta_1$ и $\beta_3$–$\beta_8$, входящих в суперсемейство молекул адгезии [100]. Эти молекулы участвуют в регуляции функционального состояния многих

with characteristic signs of embryonic liver function. The fact that ELC do not manifest a high colony forming activity in classical tests of their estimation [19, 23, 89, 117], in general, does not testify to low hemopoietic activity of ELC. Hemopoietic elements of ELC, as it was mentioned above, are related, mainly, to multipotent non-differentiated progenitors [19, 25, 89, 117], functional status of those is under the control of stem cell factor (SCF) [44, 107]. Acceptor of this ligand on a membrane is c-kit-protooncogene receptor (CD117). It has been occurred that in the whole pool of ELC the content of $c\text{-}kit^+$ cells occurred to be by 3–5 times higher, than BM [107]. Such a concentration of c-kit +cells in ELC in a certain extent correlates with the content in it of $CD34^{+++}$ (HPPC). Capability of forming colonies in a spleen was gained by these cells just after passing many differentiating stages.

Recently the data, characterizing ELC in a new light have been obtained. By means of flow cytofluorimetry and MAT (anti-c kit, β-integrin, CD45, TER119) from the whole pool of ELC we succeeded to isolate the fraction of HPPC and capable of forming in *in vitro* system the colonies with such elements as HPP-HCFU [138]. Colony forming was observed during co-culturing of FASC-isolated cells with laminine, present in the group of substances of extracellular matrix, for those the receptors are subunits of *betasub*1 and $\beta_3$–$\beta_8$ integrins, present in a superfamily of the adhesion molecules. These molecules participate in the regulation of a functional state of many cells, first of all, leukocytes [100]. Proceeding from the noted phenomenology, it is obvious, that HPP-HCFU of embryonic liver are expressing β-integrin both directly or through ones, being in FACS, isolated suspension of accessory elements, starting in proliferation. When culturing the FACS-isolated hemopoietic stem cells (HSC) the authors have shown that number of HPP-HCFU colonies rise when the hepatocyte growth factor was brought into cultivation media. From this proceeds that during in vivo cultivation of ELC in sedimentation place d'armes of these cells (test of splenic colony formation) there are no optimal conditions for colony formation and self-maintenance. It is important that under these cultivation conditions in each colony both the HPP-HCFU and cells with hepatocyte and cholangiocyte linear markers were formed. This fact testifies to bipotent differentiation potential of HSC, that was confirmed when transplanting them to CSA-congenic mice, in which hepatic hemopoietic place d'armes of donor type was formed in post-transplantation period.

Homeostatic importance of neuroimmune endocrinic interactions is expressed in a mediated response of each system to an effect of "unifactor" perturbation,



Матеріал, захищений авторським правом

клеток, в первую очередь лейкоцитов [51]. Исходя из отмеченной феноменологии, очевидно, что КВПП-ГКОЕ эмбриональной печени либо непосредственно экспрессируют β-интегрин, либо через находящиеся в FACS-выделенной суспензии акцессорные элементы запускаются в пролиферацию. Культивируя FACS-выделенные стволовые гемопоэтические клетки (СГК), авторы показали, что количество колоний с КВПП-ГКОЕ увеличивалось при внесении в среду культивирования гепатоцитарного ростового фактора. Из этого следует, что при культивировании КЭП *in vivo* в плацдарме оседания этих клеток (тест селезеночного колониеобразования) отсутствуют оптимальные условия для колониеобразования и самоподдержания. Важно также, что при указанных условиях культивирования в каждой колонии формировались не только КВПП-ГКОЕ, но и клетки с линейными маркерами гепатоцитов и холангиоцитов. Данный факт свидетельствует о бипотентном дифференцировочном потенциале СГК, что было подтверждено и при их трансплантации CSA-конгенным мышам, у которых в посттрансплантационном периоде формировался гепатокроветворный плацдарм донорского типа.

Гомеостатическая значимость нейроиммуноэндокринных взаимодействий выражается в опосредованном их отклике на действие "унифактора" возмущения тропного, казалось бы,только к какой-то из этих систем. Фактически эти взаимодействия осуществляются в рамках механизма жесткой взаиморегуляции. Особое место в них принадлежит взаимоотношениям нервной и иммунной систем. Смещение акцента в сторону взаимодействия этих систем вполне оправдано идентичностью многих структурно-функциональных параметров (морфологическое строение клеток и их антигенного спектра [74, 77], продукции одних и тех же цитокинов и т.д. [2, 95]. Известно также, что строма и паренхима органов и тканей иммунокомпетентной сферы иннервируются симпатическими и парасимпатическими отделами [85]. В свою очередь на ИКК экспрессируются рецепторы к нейромедиаторам (адреналин, норадреналин, ацетилхолин) и нейропептидам (энкифалин, эндорфин) [119]. Роли нейропептидов в регуляции гомеостатического состояния организма уделяется все большее внимание. Они входят в класс так называемых пептидных биорегуляторов, именуемых цитомединами, поддерживающими структурный и функциональный гомеостаз клеточных популяций [38]. Цитомедины выделены из широкого спектра органов и тканей, включая плаценту, нервную ткань центральных структур, паренхимы печени. Для нейропептидов гипоталамуса и других структур головного мозга показана, например, способность модулировать функциональный статус клеток лимфоидной системы [38]. Многими исследователями поддерживается идея, что именно ИС является

seeming to be tropic to just one of them. Actually these interactions are carried out within the frames of strict inter-regulation mechanism. The special place in it belongs to the interactions of neuronal and immune systems. A shift of accent to the interaction of these systems is quite caused by identity of many structural and functional parameters (morphological structure of cells and of their antigen spectrum [74, 77], production of the same cytokines etc.) [2, 7, 95]. It is also known that the stroma and parenchyma of immunocompetent organs and tissues are sympathetically and parasympathetically innervated [85]. In its turn, on immunocompetent cells the receptors to neuromediators (adrenaline, norepinephrine, acetyl choline) and neuropeptides (encephaline, endorphine) are expressed [119]. More attention is given to the role of neuropeptides in regulation of homeostatic state of organism. They belong to the class of so-called peptide bioregulators – the cytomedines, which maintain the structural and functional homeostasis of cell population [38]. The cytomedines are found in a wide spectrum of organs and tissues, including placenta, neuronal tissue of central structures, liver parenchyma. The ability to modulate the functional status of lymphoid system cells is shown for hypothalamus and other brain structures [38]. Many investigators support the idea that exactly immune system is the main target of endorphine and encephaline effect [2, 95]. Became real the concept that cytomedine production in central organ of immune system, the thymus, is under strength control of hypophysis. Moreover, the receptor expression to neuropeptides on the ICC and their ability to produce mediators demonstrate the possibility of distinct intercellular co-operation in that systems. The summarised information about neuronal and immune interactions allows to say reliat brain structures, first of all, hypophysis, can be included to central organs of immune state regulation [109]. In this case we should take into account that in such interactions distinct bidirectional mechanism can be traced. For example, both hypophysis neuropeptides regulate the cytomedines production level in thymus, and thymic cytomedines manifest a regulatory activity for hypophysis. There is an interesting fact that neuropeptides ability to maintain the immune response is strictly dose-dependent and, that is not less importantly, depends on initial level of ICC functional activity [2].

In summarising works comparing nervous and immune systems an ability to network interactions between its compounds is noted [2, 137, 143]. Bidirectional activity of these systems is realised on account both of general mediators production and of presence of antigen determinant on cells of nervous and immune system [4, 5, 7, 40]. Macrophages express Mac-1



Матеріал, захищений авторським правом

первостепенной мишенью действия эндорфинов и энкефалинов [2, 4, 5]. Из области предположения в область реально существующих фактов перекочевала концепция о том, что продукция цитомединов в центральном органе ИС – тимусе – находится под строгим контролем гипофиза. Более того, экспрессия рецепторов к нейропептидам на ИКК и способность ими продуцировать медиаторы демонстрирует возможность четкой межклеточной кооперации в этих системах. Накопленная информация о нейроиммунных взаимодействиях позволяет с уверенностью сказать, что структуры головного мозга и прежде всего гипофиз могут быть включены в перечень центральных органов управления состоянием иммунитета [109]. При этом надо учитывать, что в такого рода взаимоотношениях прослеживается четкий двунаправленный механизм. Например, не только нейропептиды гипофиза регулируют уровень продукции цитомединов в тимусе, но и цитомедины тимуса проявляют регуляторную активность в отношении гипофиза. Представляет интерес и тот факт, что способность нейропептидов поддерживать иммунный ответ является строго дозозависимой и, что не менее важно, зависимой от исходного уровня функциональной активности ИКК [2].

В обобщающих работах по сравнению нервной и иммунной систем отмечена их способность к сетевым взаимодействиям составляющих элементов [2, 137, 143]. Обоюдонаправленная активность этих систем реализуется не только за счет продукции общих медиаторов, но и наличия антигенных детерминант на клетках нервной и иммунной систем [4, 5, 7, 40]. Макрофаги экспрессируют Mac-1 и Ia-антигены, определяемые также на глиальных структурах мозга [5]. Идентифицированы общие антигены на нейронах и лимфоцитах Т-ряда, например, Thy-1 антиген, присутствующий во фракциях синаптосом, синаптических плазматических мембран и синаптических соединительных комплексов, а именно на нейронах [3, 5, 127, 137]. Общность продуцируемых медиаторов и акцептируемых их структур определяет возможность реализации однотипных реакций этими системами. Например, выделенный из костного мозга стимулятор клеток-антителопродуцентов (САП) способен изменять тактильную и ноцицептивную чувствительность [46]. Следовательно, САП обладает эндорфиноподобными свойствами. Введение фракции тяжелых синаптосом из сингенного костного мозга (экспрессирующих Thy-1 антиген) половозрелым тимэктомированным мышам нормализует содержание Т-клеток в их лимфоидных органах и восстанавливает реакции гуморального иммунитета. Культивируемые клетки глиобластомы синтезируют факторы с активностью ИЛ-1 и индуцируют продукцию ИЛ-2 Т-лимфоцитами [133]. Продемонстрирована также способность определенных структур головного мозга (резидентная микроглия,

and 1a antigens, which can be found also on brain glial structures [5]. General antigens are identified on neurones and T-lymphocytes. First of all it concerns Thy-1 antigen, presenting in fractions of synaptosomes, synaptic plasmatic membranes and synaptic connective complexes, namely on neurones. Similarity of produced mediators and accepted by them structures determine the possibility of realisation of monotype reactions by these systems. For example, isolated from bone marrow stimulator of antibody producing cells (APS) can change the tactile and nociceptive sensitivity [46]. Hence, the APS posses endorphine-like properties. Injection of heavy synaptosome fraction (expressing Thy-1 antigen) from syngeneic bone marrow to mature thymectomised mice normalises the T-cell content in their lymphoid organs and recoveres humoral immunity reactions. Being cultivated glioblastoma cells synthesise the factors with IL-1 activity and induce the IL-2 production by T-lymphocytes [133]. The ability of some brain structures (residental microglia, astrocytes) to express the MHC II-class antigens by potential APC CNS is demonstrated [40]. Activated microglial cells of intratecal structures can produce also TNF-α [131], T-cytotoxic lymphocytes activator [134].

Thus, nervous and immune systems structures are identical both by some phenotypic markers and functional characteristics. The preconditions of such similarity are based probably on early ontogenesis stages [12, 36, 137]. During embryogenesis from ectoderm forms a temporary formation on the sides of nerve tube (neural crest) [36], the cells of which are able to migrate along an embryo [114] and give the start to pigment cells, many cells of nervous system, adrenal glands medulla and others [2, 114]. Neural crest cells differentiate in various directions not by themselves but depending on regulatory activity of microenvironment in which they settle. This property determines mainly the diversity of structures formed by their own. Just from these positions the problem of similarity of nerve tissue progenitor cells and immunocompetent structures progenitor cells should be considered [137]. It seems that the hypothesis about mesodermal origin of hemopoietic cells should not be doubted [12, 36]. Nevertheless the data are obtained, which testify to neural crest origin of some tissues which origin was earlier considered as mesodermal one [36, 114]. It is assumed that a part of hemopoietic stem cells originate from neural crest elements [2]. It has been already proved that nerve tissue stem cells possess the potential ability to give origin not only to neurones, but also differentiate to bloodforming elements, vessels and liver cells [64, 137]. It is shown in experiment that various transplanted stem cells take part in forming of tissues, which histogenetically differ



Матеріал, захищений авторським правом

астроциты) экспрессировать антигены II класса ГКГ потенциальными АПК ЦНС [40]. Кроме того, активированные микроглиальные клетки интратекальных структур могут продуцировать ФНО-α [131], активатор Т-цитотоксических лимфоцитов [134].

Таким образом, структуры нервной и иммунной систем идентичны как по ряду фенотипических маркеров, так и функциональных характеристик. Предпосылки такого рода общности закладываются, видимо, на ранних этапах онтогенеза [12, 36, 137]. В процессе эмбриогенеза из эктодермы формируется временное образование по бокам нервной трубки — нервный гребень [36], клетки которого обладают способностью мигрировать по эмбриону [114]. Мигрируя, они дают начало пигментным клеткам, множеству клеток нервной системы, мозговому веществу надпочечников и др. [2, 114]. Клетки нервного гребня дифференцируются в том или ином направлении не сами по себе, а в зависимости от регуляторной активности микроокружения, в котором они расселяются. Это их свойство во многом определяет разнообразие формируемых ими структур. Именно с этих позиций следует, видимо, рассматривать вопрос общности клеток-предшественников нервной ткани и структур иммунокомпетентной сферы [137]. Казалось бы, не должен подвергаться сомнению тезис происхождения гемопоэтических клеток из мезодермы [12, 36]. Тем не менее получены данные, свидетельствующие о том, что ряд тканей, происхождение которых ранее приписывали мезодерме, формируются из элементов нервного гребня [36, 114]. Предполагается, что и часть кроветворных стволовых клеток происходит из элементов нервного гребня [2]. Уже доказано, что стволовые клетки нервной ткани обладают потенциальной способностью не только давать рост нейронам, но также дифференцироваться в кроветворные элементы, клетки сосудов и печени [62, 137]. В эксперименте показано, что трансплантируемые различные стволовые клетки принимают участие в формировании тканей, гистогенетически отличающихся от тех, у которых получены эти клетки. Те же клетки нервного гребня, внедряясь в желточный мешок и зачатки эмбриональной печени под действием регуляторов микроокружения, приобретают способность экспрессировать фенотипические маркеры ранних предшественников гемопоэза. Дальнейший путь их дифференцировки классический, включая этапы трансформации в предшественники иммунокомпетентных клеток [22, 23, 62, 111, 125].

Можно сказать, что структуры иммунокомпетентной сферы продуцируют субстанции, регулирующие состояние нервной системы, а клетки нервной ткани синтезируют иммунотропные факторы, влияющие на ИС. Следовательно, в обеспечении бодигомеостаза существенное значение будут иметь сбалансированные взаимоотношения качест-

from those, they were derived from. The same neural crest cells, introduced in yolk sac and embryonic liver under microenvironmental regulation, get the ability to express phenotypic markers of early hemopoiesis progenitors. Their further differentiation way is classic, including the stages of transformation to immunocompetent cells progenitors [22, 23, 62, 111, 125].

It is generally possible to say that immunocompetent structures produce the substances, which regulate the state of nervous system, and nerve tissue cells synthesise the immunotropic factors, affecting the immune system. Hence, in the maintenance of organism state the essential importance will be inherent to the balanced interactions of qualitative and quantitative parameters of both systems. It is no wonder that destructive processes in various sections of nervous system, developing as a primary part or as a response to aggression of other systems cells (or their mediators), break the physiological state of immunocompetent sphere. Such disbalanced interaction of nervous and immune system can make the base of pathogenesis mechanism of some pathologies of CNS, in particular one of the most complex form of its manifestation — multiple sclerosis and its experimental analogue, autoimmune allergic encephalomyelitis (EAE) [73, 81, 147], characterising by brain structures demyelinisation. It is assumed, that such myelin proteins as main myelin protein, proteolipid protein and, probably, oligodendrocytic myelin glycoprotein are the target for pathogenic СД4$^+$T-cells [81, 122, 123]. Histocytological analysis shows mainly T-cell response in perivascular zone and region of myelin localisation [123]. Autoreactive T-cells (mainly in HLA-$DW_2$ individuals) activated by molecular mimicry in the presence of virus antigens, which are similar to myelin epitopes [122], initiate the tolerance failure. Besides, activated T-cells in CNS stimulate cytokine production and adhesion molecules expression on endothelial cells. On them, and also on ICC under influence of inflammatory process the substances, acting both locally and as system, considerably rises the selectine expression [73, 75, 76, 82]. On a background of additional increase of ICAM-1 expression in inflammatory region rises the ICC readiness for cooperation and inflammation maintenance. In these conditions enhances the blood brain barrier permeability and ICC passing from peripheric channel. Involving of additional ICC to this process finally aggravates the brain structures demyelinisation [123].

Anti-myelin specific T-cells produce pro- and antiinflammatory cytokine depending on disease development stage [122, 123]. Such proinflammatory cytokines as TNF-α and IF-γ are revealed at the stage of acute process and can damage, because they strength the expression of MHC II-class antigen mole-



Матеріал, захищений авторським правом

венно-количественных параметров обеих систем. Неудивительно, что деструктивные процессы в различных отделах нервной системы, развивающиеся как "первичное" звено или же как отклик на агрессию клеток других систем (или их медиаторов), нарушают физиологическое состояние иммунокомпетентной сферы. Подобное разбалансированное взаимодействие нервной и иммунной систем может лежать в основе механизма патогенеза ряда патологий ЦНС, в частности одной из наиболее сложных форм ее проявления — рассеянного склероза (РС) и его экспериментального аналога — аутоиммунно-аллергического энцефаломиелита [73, 81, 147], характеризующегося демиелинизацией структур мозга. Предполагается, что такие миелиновые белки, как основной белок миелина, протеолипидный белок и, возможно, олигодендроцитарный гликопротеин миелина, являются мишенью для патогенных СД4$^+$Т-клеток [81, 122, 123]. Гистоцитологический анализ демонстрирует преимущественный Т-клеточный ответ в периваскулярной зоне и области локализации миелина [123]. Аутореактивные Т-клетки (преимущественно у HLA-$DW_2$ индивидов), активированные молекулярной мимикрией в присутствии вирусных антигенов, имеющих сходство с эпитопами миелина [122], инициируют срыв толерантности. К тому же активированные Т-клетки в ЦНС стимулируют продукцию цитокинов и экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках. На них, а также ИКК под влиянием субстанций воспалительного процесса, действующих как локально, так и системно, значительно усиливается экспрессия селектинов [73, 75, 76, 82]. На фоне дополнительного повышения экспрессии ICAM-1 в области воспаления увеличивается готовность ИКК к кооперации и поддержанию воспаления. В этих условиях повышаются проницаемость ГЭБ и прохождение в ЦНС из периферического русла ИКК. Вовлечение в этот процесс дополнительных ИКК в конечном счете усугубляет демиелинизацию структур мозга [123].

Антимиелинспецифические Т-клетки продуцируют про- и противовоспалительные цитокины в зависимости от стадии развития заболевания [122, 123]. Такие провоспалительные цитокины, как ФНО-α и ИФ-γ, выявляются в фазе обострения процесса и могут причинять вред, поскольку усиливают экспрессию молекул антигенов II класса ГКГ на астроцитах и в микроглии [45, 92, 131]. Переключение с про- на противовоспалительный цитокиновый профиль (ИЛ-4, ИЛ-10) или трансформирующий ростовой фактор-β) происходит во время ремиссии и ассоциировано с периодом завершения заболевания [40, 73, 122, 147]. Изменение цитокинового профиля *in situ*, а также структурной организации клеток ИС и НС коррелирует с изменением состояния иммунокомпетентной сферы организма в целом [92]. В данном случае, как впрочем и при других патологиях ЦНС (болез-

cules on astrocytes and microglia [45, 92, 131]. Switching from pro- to antiinflammatory cytokine profile (IL-4, IL-10) or transforming growth factor (TGF-β) vice versa occurs in time of remission and is associated with disease terminating period [29, 58]. Changing of cytokine profile in situ and of structural organisation of IS and NS cells correlates with changes in organism immunocompetent sphere state in a whole [92]. In this case, as well as at other CNS pathologies (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Korsakoff's syndrome etc.) there is a developement of a "vicious circle" of breaks in neuroimmunal interactions, involving also the endocrine sphere in such disfunctional state [33].

In the majority of cases the cure both of multiple sclerosis and of EAE requires the application of such immunosuppressants as glucocorticoids, cytostatics, and in several cases the lymphoid structures irradiation [76, 81, 135]. Affecting in a certain degree positively the process development, these therapies have some significant disadvantages. Taking into account the above stated specifics of developing processes in CNS at indicated pathologies, the special importance during its cure is gained by transplantation of embryonic nerve tissue.

To present time the tactical and strategic problems of obtaining, collection, storage and transplantation methods of ENT are solved. There is the accumulation of positive experience of experimental and clinical application of this tissue when treating some CNS pathologies [31, 110, 118]. No doubt that the cure effect of implanted ENT is connected to its ability to secrete and release to an environment the biologically active substances: the neuromediators, neuropeptides and other protein-peptide structures with neurotrophic activity [3, 11, 84]. We should not exclude the fact, that tissue implanted to organism is able to construct the relationship with recipient CNS structures, to correct the cytokine profile in sites of pathology development, in situ settled ICC composition and expression extent of their reaction to neighbouring antigen spectra. Finally, the structural and functional organisation recovers for both of CNS and of immune system "co-subordinated" to it. It is shown, that after ENT transplantation the T-cell immune response to myeline antigen in general population of peripheric blood mononuclears under conditions of experimental encephalomyelitis development although it was not completely cancelled, but was considerably reduced [81].

So, the stated above information once again has confirmed the presence in providing the organism homeostasis of close interrelations of immune, nervous and endocrine systems and possible consequences for such interrelations of pathological process develop-



Матеріал, захищений авторським правом

ни Альцгеймера, Паркинсона, синдром Корсакова и др.), развивается как бы "порочный круг" нарушений нейроиммунных взаимодействий, вовлекающих в такое дисфункциональное состояние и эндокринную сферу [33].

В большинстве случаев лечение РС, как и ЭАЭ, предусматривает применение иммуносупресантов в виде глюкокортикоидов, цитостатиков, а в некоторых случаях облучение лимфоидных структур [76, 81, 135]. Оказывая в определенной степени положительное влияние на течение процесса, эти виды терапии имеют и существенные недостатки. Учитывая приведенную выше специфику развивающихся процессов в ЦНС при указанных патологиях, особое значение при их лечении приобретает трансплантация ЭНТ.

К настоящему времени решены тактические и стратегические вопросы получения, накопления, хранения и методов трансплантации ЭНТ. Накоплен положительный опыт экспериментального и клинического применения этой ткани при лечении ряда патологий ЦНС [50, 110, 118]. Не вызывает сомнения тот факт, что лечебный эффект вводимых ЭНТ связан с ее способностью секретировать и выделять в окружающую среду биологически активные субстанции: нейромедиаторы, нейропептиды и другие белок-пептидные структуры с нейротрофической активностью [3, 11, 84]. Нельзя исключить и того, что вводимая в организм ткань способна конструировать взаимосвязь со структурами ЦНС реципиента, коррегировать цитокиновый профиль в участках развития патологии, состав расположенных *in situ* ИКК и степень выраженности их реакции на окружающий антигенный спектр. В итоге восстанавливается структурно-функциональная организация как собственно ЦНС, так и "соподчиненной" ей ИС. Показано, например, что после трансплантации ЭНТ в общей популяции МПК иммунный ответ Т-клеток на антигены миелина в условиях развития экспериментального энцефаломиелита хотя и не отменялся полностью, но существенно снижался [81].

Итак, приведенная выше информация еще раз подтвердила наличие теснейших взаимосвязей в обеспечении бодигомеостаза иммунной, нервной и эндокринной систем и возможных последствий для такого рода взаимодействий развития патологического процесса в какой-то из этих систем. Многочисленные данные свидетельствуют о наличии в таких эмбриофетоплацентарных тканях, как плацента, КЭП и ЭНТ, активных биорегуляторов, выступающих в роли лигандов рецепторов клеток нейроиммуноэндокринной сферы. Кроме того, биорегуляторы класса цитомединов могут реализовать свое влияние на клетки не через мембранные рецепторы, а путем прямого взаимодействия с макромолекулами фермента [43, 48], т.е. они способны непосредственно или опосредованно модулировать состояние этих систем и, следовательно, могут

ment in one of these systems. Numerous data testify to the presence in such embryophetoplacental tissues as placenta, ELC and ENT, of active bioregulators, acting as a ligands of neuroimmuneendocrine cells receptors. That is they are able directly or indirectly to modulate the state of these systems [43, 48] and, hence, they can be used for recovery of their structural and functional status. Probably, the mechanism of homeostasis system modulation can be accomplished by another way. Despite of a weak degree of MHC antigens expression, PEFPC transplanted in any form represent for an organism immune system an immunogenic factor, activating specific or non-specific immune reactions, that indirectly cause the modulation of neuroendocrine sphere.

In the majority of cases the presence of a pathological process in an organism initiates the development of immune inflammatory responses [33, 35]. IS failure in the finishing these reactions within the limits of time and normergic parameters determines the necessity of such a state correction. Considering the notion of "body homeostasis" through the prism of current interpretation as a balanced profile of pro- and antiinflammatory cytokines, one can explain the therapeutic effect of PEFPC. Indeed, a superexpansion of immune inflammatory process is characterized by an excessive activation of $CD4^+$ Tx-1 cells and production of proinflammatory cytokines (FNO-α, IF, IL-2 etc.) [91]. Increasing the $CD4^+$ Tx-1 cells activity and production of IL-4, IL-10 proinflammatory cytokines can be one of the ways for a cytokine profile correction. Presented results show that namely these IS substrates can be activated when transplanting PEFPC (placenta, ELC, ENT). Obviously, PEFPC immunocorrecting activity is a particular, but on of the most important components of therapeutic efficiency of their application. However namely this correction of the state of immunocompetent sphere is the main aim of current investigations on the optimization of the method for treatment of a wide spectrum of pathological states in human organism. Generalized forms of chronic diseases developing under the conditions of an IS dysfunctional state are serious medical problems, for solving of those the researchers in the field of cell and molecular biology are working. On many points the interests of their work in this direction are similar to the interests when transplanting PEFPC, though the methods for achieving this purpose can be various. The method of "gene transfer" is one of such methods [81]. Strategy of such methodic approaches consists in the opportunity of determining the pathogenetic role of mediators of intercellular relationship, for example, cytokines of metaloproteinases, neu ropeptides of active oxygen forms and natural soluble-like receptors, which are their antagonists,



Матеріал, захищений авторським правом

быть использованы для восстановления их структурно-функционального статуса. Видимо, механизм модуляции систем гомеостаза может включаться и другим путем. Несмотря на слабую степень экспрессии антигенов ГКГ, трансплантируемые в любой форме ПЭФПК, представляют для ИС организма иммуногенный фактор, активирующий специфические или неспецифические иммунные реакции, что опосредованно вызывает модуляцию нейроэндокринной сферы.

В большинстве случаев наличие в организме патологического процесса инициирует развитие иммуновоспалительных реакций [33–35]. Несостоятельность ИС в силу тех или иных причин завершить эти реакции в пределах нормэргических параметров и временных пределов определяет необходимость коррекции такого состояния. Рассматривая через призму современной трактовки понятия бодигомеостаз как сбалансированный профиль про- и антивоспалительных цитокинов, можно найти объяснение терапевтического эффекта ПЭФПК. Действительно, суперэкспансия иммуновоспалительного процесса характеризуется чрезмерной активацией СД4$^+$Тх-1 клеток и продукцией провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИФ-γ, ИЛ-2 и др.) [91]. Одним из путей коррекции цитокинового профиля может быть повышение активности СД4Тх-2 клеток и продукции противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10. Приведенные результаты показывают, что именно эти субстраты ИС могут активироваться при трансплантации ПЭФПК (плацента, КЭП, ЭНТ). Возможно, иммунокоррегирующая активность ПЭФПК является частным, но одним из важнейших компонентов терапевтической эффективности их применения. Но именно коррекция состояния иммунокомпетентной сферы — основная цель современных исследований по оптимизации методов лечения широкого спектра патологических состояний организма человека. Генерализованные формы хронических заболеваний, развивающихся в условиях дисфункционального состояния ИС, представляют серьезную медицинскую проблему, над которой работают исследователи в области клеточной и молекулярной биологии, иммунологии. Во многом интересы их работы в этом направлении схожи с теми интересами, которые мы преследуем при трансплантации ПЭФПК, хотя методы достижения поставленной цели могут быть различными. Одним из таких методов является метод "генного переноса" [81]. Стратегия таких методических подходов состоит в возможности определения патогенетической роли медиаторов межклеточного взаимодействия, например, цитокинов металлопротеиназ, нейропептидов, активных форм кислорода и их природных антагонистов в виде растворимых рецепторов, тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМз), а также таких "нейтрализующих" ферментов, как супероксиддисмутаза и каталаза в разtissue inhibitors of metalloproteinases (TIMs), as well as such "neutralizing" enzymes as superoxidedismutase and catalase in the pathological state development [51]. The authors consider that their results would promote to gene transfer introduction into clinical practice. Thereat it is noted, that the modulation of immune response is the basic role of such investigations.

Common points in the problems set in the presented material on the determination of the mechanism of PEFPC effect and gene therapy consists in the selection of experimental models of pathological states, when the effect of both methods: rheumatoid arthritis (RA), RS, tumor growth etc. is observed most of all. Majority of these pathologies are chosen as the diseases of autoimmune origin, this point was also noted when discussing the question of transition of immune inflammatory response into a chronic form with AID signs and possibility to use PEFPC during their treatment. Cytokine profile correction during AID (RA and RS), consisting in the inhibition of proinflammatory cytokines, for example FNO, was obtained due to the result of gene engineering of dimeric forms of its soluble receptor.

Not less interesting are the papers on optimization of the methods of the delivery of genes, responsible for the production of the mentioned substances, to specific sites of inflammation or damaged tissue. There is an evidence of the fact, that pathogenic T-lymphocytes of peripheric blood capable of adaptively realize AID in an organism of healthy recipient are the carriers of therapeutic genes [81]. Migrating through endothelial barrier out of blood to organs and tissues, these cells meet and recognize an exquisite specific structures and proliferate in situ. Therapeutic/biological effect of reconstructed with gene engineering arthritis-genic T-cells is proved. Producing the transforming growth factor-β of the inhibitor of proinflammatory cytokines [51], these cells minimized both the extent of the development of arthritis with stopping of autoimmune process and caused protective effect on joints by suppressing the activity by the induction of tissue inhibitors of metal proteinases (TIMs) and manifesting anabolic effect in respect of cartilages , stimulating the synthesis of collagen and proteoglycans [81].

Analysis of the material on the estimation of biological activity of PEFPC allows to trace the similarity in realization of their mechanism effect and mentioned therapy of "gene transfer". In fact, the PEFPC transplantation is an alternative to the methods of genetic correction, application of which in practical medicine due to the complexity is limited. It is logic t ask the question why PEFPC at least those mentioned here manifest a distinct therapeutic efficiency



Матеріал, захищений авторським правом

витии патологического состояния [51]. Авторы считают, что их результаты будут способствовать внедрению генного переноса в клиническую практику. При этом подчеркивается, что модуляция иммунного ответа является основной целью таких исследований.

Общность поставленных задач в представленном материале по определению механизма действия ПЭФПК и упоминаемой генной терапии состоит и в выборе экспериментальных моделей патологических состояний, при которых наиболее прослеживается эффект действия обоих методов: ревматоидный артрит (РА), РС, опухолевый рост и др. Большинство из этих патологий выбраны как заболевания аутоиммунной природы, на что мы также указывали при обсуждении вопроса частого перерастания иммуновоспалительной реакции в хроническую форму с признаками АИЗ и возможности использования ПЭФПК при их лечении. Коррекция цитокинового профиля при АИЗ (РА и РС) в виде ингибирования провоспалительных цитокинов, например ФНО, получена в результате генной инженерии димерных форм его растворимого рецептора.

Не менее интересными являются работы по оптимизации методов доставки генов, ответственных за продукцию указанных субстанций, в специфические места воспаления или пораженной ткани. Имеются доказательства того, что патогенные Т-лимфоциты периферической крови, способные адаптивно реализовать АИЗ в организме здорового реципиента, являются своего рода переносчиками терапевтических генов [81]. Мигрируя через эндотелиальный барьер из крови в органы и ткани, эти клетки встречаются и распознают эксквизитные специфические структуры и пролиферируют *in situ*. Подтвержден терапевтический/биологический эффект реконструированных с помощью генной инженерии артритогенных Т-клеток. Продуцируя трансформирующий ростовой фактор β, ингибитор провоспалительных цитокинов [51], эти клетки как минимизировали степень развития артрита с остановкой аутоиммунного процесса, так и оказывали протекторный эффект на суставы, подавляя активность путем индукции ТИМз-1 и проявляя анаболический эффект в отношении хрящей, стимулирующих синтез коллагена и протеогликанов [81].

Анализ материала по оценке биологической активности ПЭФПК позволяет проследить подобие в реализации механизма их действия и упоминаемой терапии "генного переноса". Фактически трансплантация ПЭФПК является альтернативой методам генетической коррекции, применение которых в практической медицине из-за достаточной сложности затруднено. Логично задать вопрос, почему ПЭФПК, по крайней мере, те, которые здесь упоминались, проявляют выраженную терапевтическую эффективность при самых разнопрофильных патологиях. Ответ, по-видимому, должен быть

under the pathologies of very versatile profile. The answer probably should be also logical continuation of the analysis of the presented material. Possessing a huge potential to synthesize the substances with biomodulating activity and perhaps morphogenetic ability, these structures in a recipient's organism not only realize the regulatory role via the production of essential it is at this moment active sources, but also accomplish integrating function. By other words, PEFPC can under distinct conditions of the state of an organism to respond to the "situation request". Actually, the same cytomedins are capable of interaction with ICCs and pass on them the information about "general" state of an organism and by the corresponding way to respond it. Polyfunctionality of the effect of these bioregulators is explained probably by the fact that being different between themselves they all contain the fractions with common physical and chemical properties, that determines their both specific and non-specific modulating activity [35, 38]. In general these thoughts are confirmed by the results of experiments, conducted by the collaborators of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine (IPC&C) of the National Academy of Sciences of the Ukraine, that permitted to intensify the works on the introduction of this method in clinical practice [14, 26, 28, 31, 65, 68, 69].

The field of application of this material (cells of embryonic liver) is quite wide, but it is evident that the spectrum of indications of its application will further extend. The results of works can be considered as successful, when we mention the conducted at clinical bases of the IPC&C on transplantation of PEFPC to patients with hemopoiesis and immune status impairments, septic states, disorders of the function of visual apparatus, developing on the background of Diabetes mellitus [31]. The same preparations were also very successful for treating at certain stages of development of malignant tumors, allowing significantly to enhance therapeutic efficiency of light and chemotherapy [22]. As the corrector of immune competent sphere of patients with this and other pathologies the tissue of embryo-fetal thymus [26] is applied. There were obtained clinical data of successful treatment of pathologies of endocrinic sphere by transplantation of fetal insulin-producing cells of pancreas, hormone-producing cells of adrenal gland cortex etc. [27]. Mastering of methodical approaches to identification and isolation by the collaborators of the IPC&C gave the possibility successfully to apply them when treating the series of pathologies of human nervous system [50]. Quite intensively the placenta preparations are used in clinical practice [24, 28, 60]. In particular, homogenate and fragments of placenta are applied when treating inflammatory processes, various pa-



Матеріал, захищений авторським правом

также логичным продолжением анализа представленного материала. Обладая огромным потенциалом синтезировать субстанции с биомодулирующей активностью и, возможно, морфогенетической способностью, эти структуры в организме реципиента не только реализуют регуляторную роль через продукцию необходимых именно в данный момент активных начал, но и осуществляют интегрирующую функцию. Другими словами, ПЭФПК могут в конкретных условиях состояния организма отвечать на "запрос ситуации". Действительно, те же цитомедины способны взаимодействовать с ИКК и передавать им информацию о "генеральном" состоянии организма и соответствующим образом откликаться на нее. Полифункционализм действия этих биорегуляторов объясняется, видимо, тем, что, отличаясь между собой рядом свойств, все они содержат фракции с общими физико-химическими свойствами, что определяет их как специфическую, так и неспецифическую модулирующую активность [35, 38]. В общем эти тезисы подкрепляются результатами экспериментальных исследований, выполненных сотрудниками ИПКиК НАНУ, что позволило интенсифицировать работы по внедрению метода в клиническую практику [14, 26, 28, 31, 65–69].

Область применения этого материала достаточно широка, но, очевидно, что спектр показаний его применения будет и дальше расширяться. Успешными можно признать результаты работ, выполненных на клинических базах ИПКиК НАНУ по трансплантации ПЭФПК больным с расстройствами кроветворения и ИС, септических состояний, нарушений функции зрительного аппарата, развивающихся на фоне сахарного диабета КЭП [31]. Эти же препараты хорошо зарекомендовали себя при лечении на определенных этапах развития злокачественных новообразований, позволяя существенно повысить терапевтическую эффективность лучевой и химиотерапии [22]. В качестве корректора иммунокомпетентной сферы больных с данной и другими патологиями применяется ткань эмбриофетального тимуса [68]. Получены клинические данные успешного лечения патологий эндокринной сферы трансплантацией фетальных инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы [69], гормонпродуцирующих клеток коры надпочечников и др. [27]. Освоение сотрудниками ИПКиК НАНУ методических подходов идентификации и выделения эмбриоплодных нервных клеток и тканей дало возможность с успехом применять их при лечении ряда патологий нервной системы человека [50]. Достаточно интенсивно используются в клинической практике и препараты плаценты. В частности, гомогенат и фрагменты плаценты применяются при лечении воспалительных процессов, различных патологий беременности, в основе которых лежат нарушения состояния кроветворной, иммунной и нейроэндокринной сфер

thologies of pregnancy, in the base of which there are the impairments of the state of hemopoietic, immune and neuroendocrinic spheres [14, 15, 22, 24, 65]. More complete information about clinical usage of PEFPC as the transplant – corrector of dysfunctional states of human organism of various genesis are presented in numerous publications of the collaborators of the IPC&C of the National Academy of Sciences of the Ukraine.

Obtained data on experimental and clinical works on PEFPC transplantation and their interpretation are just our point of view, basing on the results of summarizing of accumulated literature data, own results, nut no way as any dogma, rejecting alternative ways of realization of therapeutic effect of PEFPC. One can for instance to suppose, that observed in this or another case result does not reflect a true therapeutic potential of the material to be applied. Whether the introduced doses of this or that material are optimal. Do they provide the highest extent of correction of the "body homeostasis" system? These and other questions are actual and testify to the fact that in perspective there is a possibility of improvement of the protocols of application for not only any PEFPC (volume, number of introduction sessions etc.), but also their co-transplantation, determination of optimal terms of material obtaining in embryogenesis for treating different pathologies etc. Besides, these questions can not be solved without improving the estimation of the state of fundamental systems of homeostasis of an organism and probably first of all of immune competent sphere.

## REFERENCES


1. *Abelev G. I.* Alpha–fetoprotein: biology, biochemistry, molecular genetics // Immunologiya.– 1994.– № 3.– P. 4–10.
2. *Abramov V. V.* Interaction of immune and nerve systems.– Novosibirsk: Nauka. Siberian Department, 1998.– 166 P.
3. *Aleksandrova M. A., Loseva E. V., Ermakova I. V.* Embryonic cell behavior during transplantation into the brain // Ontogenez.– 1993.– 24, № 5.– P. 43–50.
4. *Belokrylov G. A.* Appearance of teta–antigen in human embryonic development // Ontogenez.– 1982.– 13, № 2.– P. 191–193.
5. *Belokrylov G. A., Turovsky V. S.* Effect of different subcellular fractions from cortex of syngeneic brain on cellular and humoral indices of the immunity in adult thymectomised and intact mice // Immunologiya.– 1982.– № 5.– P. 37–41.
6. *Brondz B. D.* T-lymphocytes and their receptors in immunological recognition.– M.: Nauka, 1987.– 471 p.
7. *Butenko G. M.* Immunology of aging // imunologiya ta alergologiya.– 1998.– № 1.– P. 26–29.
8. *Vozianov A. F., Butenko A. K., Zak K. P.* Cytokines. Biological and anti-tumoral properties.– Kiev: Nauk. dumka, 1998.– 316 p.
9. *Vozianov A. F., Babich V. M., Zak K. P. et al.* Combined treatment and the immune rehabilitation of patients with progressing hepato-cellular carcinoma (HCC) when applying cytokines and 5-fluoruracil (5–FU) // Int. Immunorehabilit.– 1997.– № 4.– P. 153–154.
10. *Vosianov A. F., Zak K. P., Zubko V. I.* Perspectives in cytokine application when treating kidney cancer with me-




Матеріал, захищений авторським правом

[26, 65, 66]. Более полная информация о клиническом использовании ПЭФПК как трансплантате-корректоре дисфункциональных состояний организма человека различного генеза представлены в многочисленных публикациях сотрудников ИПКиК НАНУ. Полученные данные экспериментально-клинических работ по трансплантации ПЭФПК и их трактовка являются лишь нашей точкой зрения, базирующейся на результатах обобщения накопленных данных литературы, собственных результатах, но ни в коем случае не каким-то догматом, отвергающим альтернативные пути реализации лечебного эффекта ПЭФПК. Можно, например, предположить, что наблюдаемый в том или ином случае результат не отражает истинного лечебного потенциала применяемого материала. Оптимальными ли являются вводимые дозы того или другого препарата? Обеспечивают ли они наибольшую степень коррекции систем бодигомеостаза? Эти и другие вопросы актуальны и свидетельствуют о том, что в перспективе открывается возможность совершенствования схем применения не только какого-то ПЭФПК (объем, кратность введения и т.д.), но и их сотрансплантации, определения оптимальных сроков получения материала в эмбриогенезе для лечения различных патологий и т.д. Кроме того, эти вопросы не могут быть решены без совершенствования методических подходов оценки состояния фундальных систем гомеостаза организма и, видимо, в первую очередь иммунокомпетентной сферы.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Абелев Г. И.* Альфа-фетопротеин: биология, биохимия, молекулярная генетика // Иммунология.–1994.– № 3.– С. 4–10.
2. *Абрамов В. В.* Взаимодействие иммунной и нервной систем.–Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1988.–166 с.
3. *Александрова М. А., Лосева Е. В., Ермакова И. В.* Поведение эмбриональных клеток при трансплантации в мозг // Онтогенез.–1993.– 24, № 5.– С. 43–50.
4. *Белокрылов Г. А.* Появление тета–антигена в эмбриональном развитии человека // Онтогенез.–1982.–13, № 2.– С. 191–193.
5. *Белокрылов Г. А., Туровский В. С.* Влияние различных субклеточных фракций из коры сингенного головного мозга на клеточные и гуморальные показатели иммунитета у взрослых тимэктомированных и интактных мышей // Иммунология.–1982.– № 5.– С. 37–41.
6. *Брондз Б. Д.* Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании.– М.: Наука, 1987.– 471 с.
7. *Бутенко Г. М.* Иммунология старения // Імунологія та алергологія.–1998.–№ 1.– С. 26–29.
8. *Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П.* Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства.–Киев: Наук. думка, 1998.– 316 с.
9. *Возианов А. Ф., Бабич В. М., Зак К. П. и др.* Комбинированное лечение и иммунореабилитация больных с прогрессирующей почечно–клеточной карциномой (ПКК) при применении цитокинов и 5–фторурацила (5–ФУ) // Int. J Immunorehabilit.–1997.– № 4.– С. 153–154.
10. *Возіанов А. Ф., Зак К. П, Зубко В. І.* Перспективи застосування цитокінів при лікуванні раку нирок з метастазами: Тези доп. IX з'їзду онкологів України.– Київ, 1995.– С. 23–25.
11. *Gilerovich E. G.* Xenotransplantation of embryonic nerve tissues (morphological and immunological aspects) // Morphology.– 1993.–104, № 3.– 4.– P. 11–12.
12. *Histology* / Ed. by E.G. Ulumbekova, Yu.A. Chelysheva.– M.: Meditsina, 1998.– 947 p.
13. *Govallo V. I.* Immunology of reproduction.– M.: Meditsina, 1987.– 303 p.
14. *Goltsev A. N.* Possible causes of autoimmune pathology development and search for ways of its treatment // Problemy med nauki ta osvity.– 2000.– № 1.–P. 22–37.
15. *Goltsev A. N., Grischenko O. V., Kushnirenko N. N., Opanasenko E. V.* Pathophysiological bases of change in an organism's immune reactivity after introducing products of fetoplacental complex // Vestnik problem biologii i meditsiny.– 1997.– № 10.– P. 95–106.
16. *Goltsev A. N., Dubrava T. G., Lutsenko E. D. et al.* Search for alternative to cryopreservation ways for modifying allomielotransplant immune reactivity. Part I // Problemy kriobiologii.– 1996.– № 4.– P. 3–15.
17. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D.* Cryopreservation as possible method for estimating the role of mielotransplant's component composition in the manifestation of functional activity of hemopoietic cells // Problemy kriobiologii.– 1994.– № 1.– P. 3–13.
18. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D., Dubrava T. G. et al.* Experimental substantiation of possibility for applying the products of fetoplacental complex (PFPC) for autoimmune diseases treatment // Imunologiya ta alergologiya.– 1999.– № 3.– P. 47.
19. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D., Dubrava T. G. et al.* Search for alternative to cryopreservation ways for modifying allomielotransplant immune reactivity. Part II. Possibility of embryonic liver co–transplantation // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 1.– P. 10–21.
20. *Goltsev A. N., Lutsenko E. D., Ostankova L. V. et al.* Possibilities of cryobiology when solving immunoconflict problems at the transplantation of histonon–compatible bone marrow // Problemy kriobiologii.– 1996.– № 2.– P. 3–10.
21. *Goltsev A. N., Ostankova L. V., Lutsenko E. D. et al.* Functional activity of cryopreserved hemopoietic cells (KOEc) depending on mielotransplant's component composition // Problemy kriobiologii.– 1993.– № 4.– P. 34–39.
22. *Goltsev A. N., Ostankova L. V., Lutsenko E. D. et al.* Response of lymphohemopoietic system of an organism to the introduction of products of fetoplacental complex // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 2.– P. 15–30.
23. *Grischenko V. I., Goltsev A. N.* State modification of an organism's lymphohemopoietic complex under conditions of application of products of fetoplacental complex // Transplantologiya.– 2001.– № 3.– P. 5.
24. *Grischenko V. I., Lobyntseva G. S., Votyakova I. A., Shereshkov S. I.* Hemopoietic cells of embryonic liver.– Kiev: Naukova Dumka, 1998.– 316 p.
25. *Grischenko V. I., Morozova T. F., Vorotilin O. M. et al.* Preparation and storage of cryopreserved suspension of placenta for clinical use: Methodical recommendations.– Kharkiv, 1997.– 14 p.
26. *Grischenko V. I., Pit'ko V. A., Subbota N. P.* Influence of tissue stimulators on immunological indices in women with subacute salpingoophoritis // Pediatriya, akusherstvo i ginekologiya.– 2000.– № 3.– P. 27–31.
27. *Grischenko V. I., Prokopyuk O. S., Yurchenko T. M., Strona V. I.* Preparation, cryopreservation of fetal tissue extracts and their clinical aoppiilcation: Methodical recommendations.– 1999.– 4 p.
28. *Grischenko V. I., Sandomirsky B. P.* Conception of cellular therapy // Problemy kriobiologii.– 2000.– № 1.– P. 3–7.
29. *Gubin Yu. M., Kuznetsova F. M.* State of biologically active substances in mother–placenta–fetus system at pregnancy and labor // Akusherstvo i ginekologiya.– 1976.– № 1.– P. 22–25.
30. *Gusev E. I., Bojko A. N., Salmash Zh. M. et al.* Allergy and immune pathology (immune mechanisms of formation, therapy principles).– M.: Meditsina, 1999.– P. 226–239.




Матеріал, захищений авторським правом

11. *Гилерович Е. Г.* Ксенотрансплантация эмбриональных нервных тканей (морфологические и иммунологические аспекты) // Морфология.– 1993.– 104, № 3–4.– С. 11–12.
12. *Гистология* / Под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челышева.– М.: Медицина, 1998.– 947 с.
13. *Говалло В. И.* Иммунология репродукции.– М.: Медицина, 1987.– 303 с.
14. *Гольцев А. Н.* Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Пробл. мед. науки та освіти.– 2000.– № 1.– С. 22–37.
15. *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.
16. *Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Луценко Е. Д. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть I // Пробл. криобиологии.– 1996.– № 4.– С. 3–15.
17. *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.
18. *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.
19. *Гольцев А. Н., Луценко Е. Д., Дубрава Т. Г. и др.* Поиск альтернативных криоконсервированию путей модификации иммунореактивности алломиелотрансплантата. Часть II. Возможность сотрансплантации эмбриональной печени // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 10–21.
20. *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.
21. *Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Луценко Е. Д. и др.* Функциональная активность криоконсервированных кроветворных клеток (КОЕс) в зависимости от компонентного состава миелотрансплантата // Пробл. криобиологии.– 1993.– № 4.– С. 34–39.
22. *Гольцев А. Н., Останкова Л. В., Луценко Е. Д. и др.* Ответ лимфогемопоэтической системы организма на введение продуктов фетоплацентарного комплекса // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 15–30.
23. *Грищенко В. І., Гольцев А. М.* Модифікація стану лімфогемопоетичного комплексу організму в умовах застосування продуктів фетоплацентарного комплексу // Трансплантологія.– 2001.– № 3.– С. 5.
24. *Грищенко В. И., Лобынцева Г. С., Вотякова И. А., Шерешков С. И.* Гемопоэтические клетки эмбриональной печени (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование).– Киев: Наук. думка, 1988.– 192 с.
25. *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.
26. *Грищенко В. І., Пітько В. А., Субота Н. П.* Вплив тканинних біостимуляторів на імунологічні показники у жінок з підгострим сальпінгоофоритом // Педіатрія, акушерство і гінекологія.– 2000.– № 3.– С. 27–31.
27. *Грищенко В. І., Прокопюк О. С., Юрченко Т. М., Строна В. І.* Заготівля, кріоконсервування екстрактів фетальних тканин та їх клінічне застосування: Метод. рекомендації.– 1999.– 4 с.
28. *Грищенко В. И., Сандомирский Б. П.* Концепция клеточной терапии // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 3–7.
29. *Губин Ю. М., Кузнецова Ф. М.* Состояние биологически активных веществ в системе мать–плацента–плод при беременности и родах // Акушер. и гинекол.– 1976.– № 1.– С. 22–25.
31. *Demin Yu. A., Petrenko A. Yu., Goncharuk E. I.* Application of "Gemoneuronal" preparation in a complex treatment of patients with diabetic retinopathy // Problemy kriobiologii.– 2001.– № 3.– P. 92.
32. *Zemskov V. M., Rodionov S. V.* Functional activity of macrophage subpopulations, separated in temperature gradient on polysterol // Immunologiya.– 1991.– № 6.– P. 31–34.
33. *Ignatieva G. A.* Immune system and pathology // Zhurnal patofiziologii i eksperimentalnoy meditsiny.– 1997.– № 4.– P. 26–37.
34. *Yeger L.* Clinical immunology and allergology.– M.: Meditsina, 1990.– V. 3.– 529 p.
35. *Kazantseva S. T.* Role of peptide bioregulators (cytomedines) in homeostasis regulation.– L.: Nauka, 1987.– 146 p.
36. *Karlson B. M.* Bases of embryology by Petten.– M.: Mir, 1983.– 357 p.
37. *Krichevskaya E. I., Dish T. N.* Role of histamine in regulation of placental barrier permeability and its necessity for fetus development: Physiology and pathology of histohematic barriers.– M., 1968.– 288–292 p.
38. *Kuznik B. I., Morozov V. G., Khavinson V. Kh.* Cytomedines and their role on reluation of physiological functions // Uspekhi sovremennoj biologii.– 1995.– 115, № 3.– P. 353–367.
39. *Leush S. S.* Fetus-allotransplant. Premature labor // Collection of abstracts of scientific works: Kyiv, 1997.– P. 244–247.
40. *Lisyanyj N. I., Markova O. V., Gorobets O. B., Belskaya L.N.* Functional state of immune competent cells in rat's spleen and brain after induction of experimental allergic encephalomyelitis // Immunologiya ta alergologiya.– 1998.– № 1.– P. 98–103.
41. *Lomakin M. S., Artsimovich N. G.* Biologically active substances associated with placenta // Akusherstvo i ginekologiya.– 1991.– № 9.– P. 6–9.
42. *Morozova P., Kozulina E., Nokolenko I. et al.* Placenta is a source of biologically active substances // Ukrainskij biokhimichnyj zhurnal.– 1999.– 74, № 4.– P. 21–29.
43. *Muranevich S. A.* Is a modulating effect of neuropeptides realised through receptors only? // Fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenov.– 1993.– № 4.– P. 9–15.
44. *Natan D. G., Ziff K. A.* Hemopoiesis regulation // Gematologiya i transfuziologiya, 1994.– 39, № 2.– P. 3–10.
45. *Transplantation* of organs and tissues in human being/Edited by F.Rapoport and Zh. Dosse.– M.: Meditsina, 1973.– 527 p.
46. *Petrov R. V., Mikhajlova A. A.* Bone marrow stimulator of antigen producers SAP // Itogi nauki i tekhniki. Immunologiya.– 1983.– N12.– P. 63–85.
47. *Popovich S. A.* Antihomotoxical therapy – bridge between traditional medicine and homeopathy // Doktor.– 2001.– № 1.– P. 64.
48. *Rybalchenko V. K., Mogilevich B. R., Ostrovskaya G. V.* Role of lipid matrix of a plasmatic membrane during the process of information transfer to regulatory peptides // Bulleten' eksperimentalnoj biologii i meditsiny.– 1993.– № 5.– P. 477–481.
49. *Semina O. V., Semenets T. N., Poverennyj A. M.* Mechanisms o lymphoid regulation and radio–sensitivity of hemopoietic system // Radiobiologiya.– 1992.– 32. Issue 2.– P. 225–240.
50. *Sipityj V. I., Pyatikop V. A., Kutovoj I. A., Petrenko A. Yu.* Application of cryopreserved nerve stem cells for correcting dysfunctions of dofaminergic structures in patients with Parkinson's disease and for treating patients with other



Матеріал, захищений авторським правом

30. *Гусев Е. И., Бойко А. Н., Салмаш Ж. М. и др.* Аллергия и иммунопатология (иммунные механизмы формирования, принципы терапии).– М.: Медицина, 1999.– С. 226–239.
31. *Демин Ю. А., Петренко А. Ю., Гончарук Е. И.* Применение препарата "Гемонейронал" в комплексном лечении больных с диабетической ретинопатией // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 3.– С. 92.
32. *Земсков В. М., Родионов С. В.* Функциональная активность субпопуляций макрофагов, разделяемых в градиенте температуры на полистероле // Иммунология.– 1991.– № 6.– С. 31–34.
33. *Игнатьева Г. А.* Иммунная система и патология // Журн. патфизиологии и экспериментальной медицины.– 1997.– № 4.– С. 26–37.
34. *Йегер Л.* Клиническая иммунология и аллергология.– М.: Медицина, 1990.– Т. 3.– 529 с.
35. *Казанцева С. Т.* Роль пептидных биорегуляторов (цитомидинов) в регуляции гомеостаза.– Л.: Наука, 1987.– 146 с.
36. *Карлсон Б. М.* Основы эмбриологии по Пэттену.– М.: Мир, 1983.– 357 с.
37. *Кричевская Е. И., Диш Т. Н.* Роль гистамина в регуляции проницаемости плацентарного барьера и необходимость его для развития плода // Физиология и патология гисто–гематических барьеров.– М., 1968.– С. 288–292.
38. *Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х.* Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи совр. биологии.– 1995.– 115, № 3.– С. 353–367.
39. *Леуш С. С.* Плід — алотрансплантат. Невиношування вагітності // Збірник тез наук. праць: Київ, 1997.– С. 244–247.
40. *Лисяный Н. И., Маркова О. В., Горобец О. Б., Бельская Л. Н.* Функциональное состояние иммунокомпетентных клеток в селезенке и в головном мозге крыс после индукции экспериментального аллергического энцефаломиелита // Імунологія та алергологія.– 1998.– № 1.– С. 98–103.
41. *Ломакин М. С., Арцимович Н. Г.* Биологически активные вещества, ассоциированные с плацентой // Акушер. и гинекол.– 1991.– № 9.– С. 6–9.
42. *Морозова Р., Козулина Е., Николенко И. и др.* Плацента — источник биологически активных веществ // Укр. біохім. журн.– 1999.– 74, № 4.– С. 21–29.
43. *Мураневич С. А.* Только ли через рецепторы осуществляется модулирующее действие нейропептидов? // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 1993.– № 4.– С. 9–15.
44. *Натан Д. Г., Зифф К. А.* Регуляция кроветворения // Гематология и трансфузиология.– 1994.– 39, № 2.– С. 3–10.
45. *Пересадка* органов и тканей у человека / Под ред. Ф. Рапопорта и Ж. Доссе.– М.: Медицина, 1973.– 527 с.
46. *Петров Р. В., Михайлова А. А.* Костномозговой стимулятор антителопродуцентов САП // Итоги науки и техники. Иммунология.– 1983.– 12.– С. 63–85.
47. *Попович С. А.* Антигомотоксическая терапия – мост между традиционной медициной и гомеопатией //Доктор.– 2001.– № 1.– С. 64.
48. *Рыбальченко В. К., Могилевич Б. Р., Островская Г. В.* Роль липидного матрикса плазматической мембраны в процессе передачи информации регуляторными пептидами // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1993.– № 5.– С. 477–481.
49. *Семина О. В., Семенец Т. Н., Поверенный А. М.* Механизмы лимфоидной регуляции и радиочувствительности системы кроветворения // Радиобиология.– 1992.– 32, Вып. 2.– С. 225–240.
50. *Сипитый В. И., Пятикоп В. А., Кутовой И. А., Петренко А. Ю.* Применение криоконсервированных нервных стволовых клеток для коррекции дисфункции дофаминергических структур у больных болезнью Паркинсона и forms of extrapyramidal hyperkinesysias // Problemy kriobiologii.– 2001.– № 3.– P. 32.
51. *Systemic* enzyme therapy / Ed. by V. I. Mazurov, A. M. Lila.– SPb: Nauka, 1996.– 206 p.
52. *Subbota N. P., Pashinsky P. P., Rozanova E.D.* Biological properties of fetal tissue cryoextracts // Problemy kriobiologii.– 1998.– № 3.– P. 35–42.
53. *Sukhikh G. T., Bordanova I. M., Malajtsev V. V., Fisenko A. P.* Immunological aspects of fetal cell transplantation // Bulleten' eksperimentalnoj biologii i meditsiny.– 1998.– 126, № 1.– P. 178–181.
54. *Tatarinov Yu. S.* Trophoblast beta1–glycoprotein // Uspekhi sovremennoj biologii.– 1983.– 95, № 1.– P. 57–67.
55. *Tatarinov Yu. S., Oliferenko G. A., Petrunin D. D.* Alpha A2-microglobulin of fertility // Uspekhi sovremennoj biologii.– 1985.– 100, № 3.– P. 465.
56. *Uteshev B. S., Sergeyev A. S., Korostelev S. A.* Analysis of actual directions in immunotrop means creation // Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.– 1995.– 58, № 3.– P. 3–7.
57. *Fedorova M. V., Kalashnikova E. P.* Placenta and its role during preganany.– M.: Meditsina, 1986.– 252 p.
58. *Khaitov R. M., Pinegin B. V.* Estimation of human immune status in the norm and at a pathology // Immunologiya.– 2001.– № 4.– P. 4–6.
59. *Tsirel'nikov N. I.* Human placenta histophysiology.– Novosibirsk: Nauka.– 1980.– 183 p.
60. *Chernyshev V. P., Valitskiy V. L.* Comparative analysis of pregnancy proteins in the regulation of functional activity of T-supressors // Bulleten' eksperimentalnoj biologii i meditsiny.– 1989.– 108, № 8.– P. 229–231.
61. *Chertkov I. L., Gurevich O. A.* Stem cell and its microsurrounding.– M.: Meditsina, 1984.– 234 p.
62. *Chertkov I. L., Drize N. I. Successes and falls of cellular haematology for 45 years // Gematologiya.– 2001.– № 3, 2.– P. 10–14.*
63. *Shirshev S. V., Kevorkov N. N.* Reproductive hormones of protein-peptide nature as regulators of immune reactions // Uspekhi sovremennoj biologii.– 1991.– 111, № 5.– P. 683–697.
64. *Shirshev S. V.* Proteins of fetoplacental complex in immune reactions regulation // Uspekhi sovremennoj biologii.– 1993.– 113, N2.– P. 230–247.
65. *Patent № 30723A* Ukraine, МПК$^6$ A61K35/50. Method for treating autoimmune diseases / A. M. Goltsev, V. I. Grischenko, T. G. Dubrava et al. Applied 28.04.98; Published 15.12.2000.– Bull. № 7.– II.–P. 1.9.
66. *Patent № 33487A* Ukraine, МПК$^6$ A61K35/28. Method for treating subacute inflammatory diseases of uterine appendages / V. I. Grischenko, V. A. Pit'ko, Applied 26.02.1999; Published 15.02.2001.– Bull. № 1.– II.–P. 1.57.
67. *Patent № 33888A* Ukraine МПК$^6$ A61K35/28, A61K35/407. Method of decrease in immune reactivity of allogenic bone marrow of experimental animals / V. I. Grischenko, A. N. Goltsev, L. V. Ostankova et al. Applied 24.04.99; Published 15.02.2001.– Bull. № 1– II.– P. 1.57.
68. *Patent № 36324A* Ukraine МПК$^7$ A61K35/28, A61K35/48. Method for stimulating hemopoietic activity of cryopreserved allomyelotransplant / A. N. Goltsev, L. V. Ostankova, O. D. Lutsenko, T. G. Dubrava. Applied 03.12.99. Published 16.04.2001.– Bull. № 3.– II.– P. 1.51.
69. *Patent № 38083A* Ukraine МПК$^7$ A61K35/50. Method for stimulation of bone marrow hemopoietic activity / V. I. Grischenko, A. N. Goltsev, T. G. Dubrava et al. Applied 26.05.2000; Published 15.05.2001.– Bull. № 4.– P. 1.64.



Матеріал, захищений авторським правом

лечения больных с другими формами экстрапирамидных гиперкинезов // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 3.– С. 32.

51. *Системная* энзимотерапия / Под ред. В. И. Мазурова, А. М. Лила.– СПб.: Наука, 1996.– 206 с.
52. *Суббота Н. П., Пашинский П. П., Розанова Е. Д.* Биологические свойства криоэкстрактов фетальных тканей // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 3.– С. 35–42.
53. *Сухих Г. Т., Богданова И. М., Малайцев В. В., Фисенко А. П.* Иммунологические аспекты трансплантации фетальных клеток // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1998.– 126, № 1.– С. 178–181.
54. *Татаринов Ю. С.* Трофобластический $\beta_1$-гликопротеин // Успехи совр. биологии.–1983.– 95, № 1.– С. 57–67.
55. *Татаринов Ю. С., Олиференко Г. А., Петрунин Д. Д.* Альфа $A_2$-микроглобулин фертильности // Успехи совр. биологии.–1985.– 100, № 3.– С. 465.
56. *Утешев Б. С., Сергеев А. С., Коростелев С. А.* Анализ современных направлений в создании иммунотропных средств // Экспер. и клин. фармакология.– 1995.– 58, № 3.– С. 3–7.
57. *Федорова М. В., Калашникова Е. П.* Плацента и ее роль при беременности.– М.: Медицина, 1986.– 252 с.
58. *Хаитов Р. М., Пинегин Б. В.* Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии // Иммунология.– 2001.– № 4.– С. 4–6.
59. *Цирельников Н. И.* Гистофизиология плаценты человека.– Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1980.– 183 с.
60. *Чернышев В. П., Валицкий В. Л.* Сравнительный анализ белков беременности в регуляции функциональной активности Т–супрессоров // Бюл. экспер. биол. и мед.– 1989.– 108, № 8.– С. 229–231.
61. *Чертков И. Л., Гуревич О. А.* Стволовая клетка и ее микроокружение.– М.: Медицина, 1984.– 234 с.
62. *Чертков И. Л., Дризе Н. И.* Взлеты и падения клеточной гематологии за три четверти века // Гематология и трансфузиология.– 2001.– № 3, 2.– С. 10–14.
63. *Ширшев С. В., Кеворков Н. Н.* Репродуктивные гормоны белково–пептидной природы как регуляторы иммунных реакций // Успехи совр. биологии.– 1991.– 111, № 5.– С. 683–697.
64. *Ширшев С. В.* Белки фетоплацентарного комплекса в регуляции иммунных реакций // Успехи совр. биологии.– 1993.– 113, № 2.– С. 230–247.
65. *Пат. № 30723А* Украина, МПК[6] А61К35/50 Спосіб лікування аутоімунних захворювань / А. М. Гольцев, В. І. Грищенко, Т. Г. Дубрава та ін. Заявлено 28. 04. 98. Публ. 15. 12. 2000.– Бюл. № 7– II.– С. 1.9.
66. *Пат. № 33487А* Україна МПК[6] А61К35/28. Спосіб лікування підгострих запалювальних захворювань придатків матки / В. І. Грищенко, В. А. Пітько. Заявлено 26.02.1999; Публ. 15.02.2001.– Бюл. № 1–II.– С. 1.57.
67. *Пат. № 33888А* Україна МПК[6] А61К35/407. Спосіб зменшення імунореактивності алогенного кісткового мозку експериментальних тварин / В. І. Грищенко, А. М. Гольцев, Л. В. Останкова та ін. Заявлено 24.04.99; Публ. 15.02.2001.– Бюл. № 1–II.– С. 1.57.
68. *Пат. № 34962А* Украина, МПК[6] А61В17/00, Спосіб профілактики рецидивів спайкового процесу / В. І. Грищенко, Г. В. Іванов, Л. В. Потапова. Заявлено 22. 07. 99. Публ. 15. 03. 2001.– Бюл. № 2– II.– С. 1.19.
69. *Пат. № 44560А* Україна МПК[7] А61В17/00. Хірургічний спосіб лікування цукрового діабету / Є. Д. Хворостов, Б. П. Сандомирський, О. М. Побеленський, І. В. Бєлочкіна, В. М. Лебідь. Заявлено 23.05.2001. Публ. 15.02.2002.– Бюл. № 2-II.– С. 1.18.
70. *Antin J. Y., Ferrara J. L. M.* Cytokyne desregulation and acute graft–versus–host disease // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 2964–2968.
71. *Atkins M. B.* Interleukin–2 based chemoimmuno–therapy for metastatic renal carcinoma: the united states experience // Chiron. Symp. Chemoimmunother. of cancer.– Paris, 1995.– P. 1–4.
72. *Bensinger W. I., Weaver C. H., Appelboum F. R. et al.* Transplantation of allogenic peripheral blood cells mobilized by recjmbinant human granulocytes colony–stimulating factor // Blood.– 1995.– 85, № 6.– P. 1655–1658.
73. *Berger T., Weerth S., Kojima K. et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central nervous system // Lab. Invest.– 1997.– 76.– P. 355–364.
74. *Blalock E.* A molecular bacis of biderectional communication between the immune and neuroendocrine systems // Physiol. Rev.– 1989.– 69, № 1.– P. 1–32.
75. *Burt R. K., Burns W., Hess A.* Bone marrow transplantation for multiple sclerosis // Bone marrow transplant.– 1995.– 16.– P. 1–23.
76. *Burt R. K., Traynor A. E., Pope R. et al.* Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation // Blood.– 1998.– 92, № 10.– P. 3505–3514.
77. *Carr X., Blalock E.* A molecular basis for intersystem communication between the immune and neuroendocrine systems // Int. Rev. Immunol.– 1989.– 4, № 3.– P. 213–228.
78. *Cell* interactions: Cytokines.– N. Y.: American society of hematology, 2001.– 128 p.
79. *Chaouat G.* Synergy of lipopolysacharide and inflamatory cytokines in murine pregnancy: Alloimmunization prevents abortion, but does not affect the induction of preterm delivery // Cell Immunol.– 1994.– 157.– P. 328–340.
80. *Chaouat G., Assal–Meliani A., Martal J. et al.* IL–10 prevents naturally ocuring fetal loss in the CBAxDBA/2 mating combination in corrected by in vivo injection of IFN // J. Immunol.– 1995.– 154.– P. 4261–4268.
81. *Chen C. C., Rivera A., Ron N. et al.* A gene therapy approach for treating T-cell–mediated autoimmune diseases // Blood.– 2001.– 97, № 4.– P. 886–894.
82. *Chen N., Field E. H.* Thanced type 2 and diminished type1 cytokines in neonanal tolerance // Transplantation.– 1995.– 59, № 7.– P. 933–941.
83. *Cohen I. R.* The cognitive paradigm and the immunological homunculus // Immunol. Today.– 1992.– 13, № 12.– P. 490–494.
84. *Collier I. J, Gallagher M. S, Sladek C. D.* Cryopreservation and storage of embrionic rat mesencephalic dopaktine neurous for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts // Brain. Research.– 1993.– 623, № 2.– P. 249–256.
85. *Croiset G., Heijnen C., Wal W. et al.* A role for the automic nervous system in modulating the immune response during mild into fionat stimull // Life Seinc.– 1990.– 46, № 6.– P. 419–425.
86. *Delassus S., Continho G. C., Saucier C. et al.* Defferential cytokin expression in maternal blood and placenta during murine gestation // J. Immunol.– 1994.– 152.– P. 2411–2420.
87. *Dietrich G., Varela F. J., Hurez V. et al.* Selection of the expressed B cell repertoire by infusion of normal immunoglobulin G in a patient with autoimmune thyroiditis // Eur. J. Immunol.– 1993 – 23, № 11.– P. 2945–2950.



Матеріал, захищений авторським правом

88. *Dinarello C. A.* Modalities for reducing interleukin 1 activity in disease // Trends Pharmacol. Sci.–1993.– 14, № 5.– P. 155–159.

89. *Donovan P. J., Gearhart J.* The end of the beginning for pluripotent stem cells // Nature.– 2001.– 414, № 1.– P. 92–97.

90. *Drobyski W. R., Hessner M. J.* The use of the polymerase chin reaction to predict for subsequent relapse in unrelated marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia // Leuk. Lymphoma.– 1998.– 31, № 3–4.– P. 317–323.

91. *Ferrara J., Deeg H.* Graft–versus–host disease // N. Engl. J. Med.– 1991.– 324, № 3.– P. 667–673.

92. *Fierz W., Endler B., Reske K. et al.* Astrocytes as antigen presenting cells // J. Immunol.–1985.– 134, № 6.– P. 3785–3793.

93. *Fontana A., Weber E., Dayer J. M.* Synthesis of IL–1/endogenous pyrogen in the brain of endotoxin–treated mice: a step in fever induction // J. Immunol.–1984.– 133, № 4.– P. 1696–1698.

94. *Foster R. D., Fan L., Niepp M. et al.* Donor–specific tolerance induction in composite tissue allografts // Am. J. Surg.– 1998.– 76, № 5.– P. 418–421.

95. *Geenon U., Robert H., Legros J. et al.* Neuroendocrine immunology: from sistemic interactions to immune of sef neuroendocrine functions // Acta clin. belg.– 1991.– 46, № 3.– P. 135–141.

96. *Gibbons J., Mitnich M., Chieff V.* In vitro biosynthesis of TSN – and LH – releasing factors by the human placenta // Am. J. Obstet. Gynec.– 1975.– 121, № 1.– C. 127–131.

97. *Goldberg S. L., Klumpp T. R., Magdalinski A. J., Mangan K. F.* Value of the pretransplant evaluation in predicting toxic day–100 mortality among blood stem–cell and bone marrow transplant recipients // J. Clin. Oncol.–1998.– 16, № 12.– P. 3796–3802.

98. *Goulmyn E.* Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy // Immunol. Rev.– 1997.– 157.– P. 125–145.

99. *Henderson B., Blake S.* Therapeutic potential of cytokine manipulation // Trends Pharmacol Sci.– 1992.– 13, № 4.– P. 145–152.

100. *Hershkoviz R., Miron S., Cohen I. R. et al.* T lymphocyte adhesion to the fibronectin and laminin components of the extracellular matrix is regulated by the CD4 molecule // Eur. J. Immnol.–1992.– 22, № 1.– P. 7–13.

101. *Hill J. A., Polgar K., Anderson D. J.* T-helper 1–type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion // JAMA.– 1995.– 2, № 3.– P. 1933–1936.

102. *Hooper D. C., Evans R. G.* Anti–proliferative action of murine alpha–fetoprotein on activated T–lymphocytes // J. Reprod. Immunol.– 1989.– 16, № 1.– P. 83–96.

103. *Hooper D. C., Murgita R. A.* Regulathion on murine T cell responses to autologous antigens by alpha–fetoprotein // Cell. Immunol.– 1981.– 15, 63(2).– P. 417–425.

104. *Horne C. H. W., Nisbet A. D., Hooper D. C., Murgita R. A.* Pregnency proteins: a review // Invest. Cell. Pathol.– 1979.– 2, № 3.– P. 217–431.

105. *Ikehara S.* Treatment of autoimmune diseases by hematopoietic stem cell transplantation // Exp. Hematol.– 2001.– 29, № 6.– P. 661–669.

106. *Ikehara S.* Successful allogeneic bone marrow transplantation. Crucial roles of stromal cells in prevention of graft rejection. // Acta Hematol.– 2001.– 105, № 3.– P. 172–178.

107. *Irani A.–M. A., Nilsson G., Miettinen U. et al.* Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cell from dispersed human fetal liver cells // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3009–3021.

108. *Jantunen E., Myllykangas–Luosujarvi R.* Stem cells transplantation for rheumatoid diseases // Duodecim.– 1998.– 114, № 5.– P. 403–404.

109. *Jonson E., Mantsopoulos M.* Neuroimmunological axis rheumatic disiases // Eur. J. Clin. invest.– 1992.– 22, Suppl 1.– P. 2–5.

110. *Kerlero de Rosbo N., Mendel I., Ben-Nun A.* Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)–derived hehtide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes // Eur. J. Immunol.– 1995.– 25.– P. 985–993.

111. *Kozak T., Havrdova E., Pit'ha J. et at.* Immunoablative therapy with autologous stem cell transplantation in the treatment of poor risk multiple sclerosis // Transplant. Proc.– 2001.– 33, № 3.– P. 2179–2181.

112. *Kushida T., Inaba M., Hisha H. et al.* Crucial role of donor–derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice by BMT via portalvein // Stem cells.– 2001.– 19.– P. 226–235.

113. *Machold K. P. , Smolen J. S.* Stem cells transplantation: limits and hopes // Ann Rheum. Dis.– 2001.– 60, № 6.– P. 548–549.

114. *LeDouarin N. M., Dieterlen-Lievre F., Oliver P. D.* Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells // Amer. J. Anatomy.– 1984.– 170, № 3.– P. 261–299.

115. *Lin H., Mosmann T. R., Guilbert L. et al.* Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal–fetal interface // J. Immunol.– 1993.– 151, № 1.– P. 4562–4573.

116. *Locksley R. M., Scott P.* Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function // Immunol. Today.– 1991.– 12.– P. A58–A61.

117. *Lovell-Badge R.* The future for stem cell research // Nature.– 2001.– 414, № 1.– P. 88–91.

118. *Mancardi G. L., Saccardi R., Filippi M et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd–enhanced MRI activity in MS // Neurology.– 2001.– 57, № 1.– P. 62–68.

119. *Marchall P.* Lymphocyte hormone receptors // Annu Rev. Immunol.– 1987.– 5.– Palo Alto, Calif.– P. 621–629.

120. *Marmont A. M., Van Bekkum D. W.* Stem cell transplantation for severe autoimmune diseases: New proposals but still unanswered questions // Bone marrow transplant.– 1995.– 16.– P. 497–512.

121. *Marmont A. M., Tyndall A., Gratwohl A., Vischer T.* Hematopoietic precursor stem cell transplantation for autoimmune diseases // Lancet.– 1995.– 345.– P. 978–989.

122. *Martin R., McFarland H. F, McFarlin D. E.* Immunological aspects of demyelinating diseases // Annu Rev. Immunol.– 1990.– 8.– P. 579–621.

123. *Mendel I., Kerlero de Rosbo N., Ben-Nun A.* A myelin oligodendrocent glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H–2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells // Eur. J. Immunol.– 1995.– 25.– P. 1951–1959.

124. *Micallef I. N., Chhanabhai M., Gascoyne R. D. et al.* Lymphoproliferative disorders following allogeneic bone marrow transplantation: the Vancouver experience // Bone marrow transplantation.– 1998.– 22, № 10.– P. 981–987.

125. *Molina A., Popplewell L., Kashyap A., Nademanee A.* Hematopoietic stem cell transplantation in the new millenium: report from City of Hope National Medical Center // Clin. Transpl.– 2000.– 1, № 4.– P. 317–342.

126. *Musso M., Porreto F., Crescimanno A. et al.* Intense immunosuppressive therapy followed by autologous peripheral blood selected progenitor cell reinfusion for severe autoimmune disease // Am. J. Hematol.– 2001.– 66, № 2.– P. 75–79.

127. *Norcross M. A.* A synaptic basis for T lymphocyte activation // Ann. Immunol.– 1984.– 135, № 2.– P. 113–114.

128. *O'Reilly R. J.* Clinical trials of hematopoietic cell transplantations: current needs and future strategies // American soiety for blood and marrow transplantation.– 2000.– P. 79–89.

129. *Pecanha L. M. T., Snapper C. M., Lees A. et al.* IL–10 inhibits T cell–independent but not T cell–dependent resposes in vitro // J. Immunol.– 1993.– 150, № 8.– P. 3215–3223.



Матеріал, захищений авторським правом

130. *Piccini M., Romagnani S.* Regulation of fetal allograft survival by hormone–controlled Th1– and Th2–type cytokines // Immunol. Res.– 1996.– 15.– P. 141–150.
131. *Powell M. B., Mittchell D., Lederman J. et al.* Lymphotoxin and tumor necrosis factor – a production by myelin basic protein specific T cell clones correlate with encephalitogenicity // Int. Immunol.– 1990.– 2.– P. 539–547.
132. *Schmidt–Wolf I. G. H., Dejbakhsh–Jones S.* T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow // Blood.– 1992.– 80, № 12.– P. 3242–3250.
133. *Schwyzer M., Fontana A.* Partial purification and biochemical characterization of a T cell suppressor factor produced by human glioblastoma cells // J. Immunol.– 1985.– 134, № 2.– P. 1003–1009.
134. *Sedgwick D., Schwender S., Imrich H. et al.* Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1991.– 88.– C. 7438–7442.
135. *Segal D. M., Dwyer B. K., Shevach E. M.* An interleukin (IL)–10\IL–12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune // J. Exp. Med.– 1998.– 187, № 4.– P. 537–546.
136. *Small T. N., Papadopoulos E. B., Boulad F. et al.* Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T–cell–depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions // Blood.– 1998.– 93, № 2.– P. 467–480.
137. *Temple S.* The development of neural stem cells // Nature.– 2001.– 414, № 1.– P. 112–117.
138. *Taniguchi H., Kondo R., Tei I. et al.* Enrichment and characterization of hepatic stem cells the murine fetal liver // The Transplantation Society Meeting, 1998, Montreal, Canada.– P. 57.
139. *Torry D., Ahn H., Barnes E., Torry R.* Placenta growth factor: patential role in pregnancy // Amer. J. Reprod. Immunol.– 1999.– 41, № 1.– P. 79–85.
140. *Tyndall A.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune disease with special reference to rheumatoid artrhritis // J. Rheumatol. Suppl.– 2001.– 64.– P. 5–7.
141. *Tyndall A., Passweg J., Gratwohl A.* Haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune diseases 2000 // Ann. Rheum. Dis.– 2001.– 60, № 7.– P. 702–707.
142. *Van Bekkum D. W.* Immune ablation and stem–cell therapy in autoimmune disease: Experimental basis for autologous stem–cell transplatation // Artrhritis Res.– 2000.– 2.– P. 281–284.
143. *Varela F. J., Coutinho A.* Second generation immune networks // Immunol. Today.– 1991.– 12, № 5.– P. 159–166.
144. *Waldmann T. A.* The interleukin–2 receptor // Ibid.– P. 159–163.
145. *Warren E. D., Greenberg P. D., Riddell S. R.* Cytotoxic T–lymphocyte–defined human minor histocompatibility antigens with a restricted tissue distribution // Blood.– 1998.– 70.– P. 2197–2207.
146. *Yang Y. G, Dey B. R., Sergio J. J. et al.* Donor–derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft–versus–host disease by interleukin 12 // J. Clin. Invest.– 1998.– 102, № 12.– P. 2126–2135.
147. *Zamvil S. S., Steinman L.* The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis // Annu Rev. Immunol.– 1990.– 8.– P. 579–621.

Поступила 17.12.2001

Accepted in 17.12.2001



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-08.832.9

UDC 616-08.832.9

# Клиническое применение ритмической гипотермии

В. Г. БАБИЙЧУК, О. В. ЕРШОВА, Г. В. МАЛЫШЕВА, А. В. КОЗЛОВ, И. И. ЛОМАКИН, В. С. МАРЧЕНКО

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

# Clinical Application of Rhythmic Hypothermia

V. G. BABIJCHUK, O. V. ERSHOVA, G. V. MALYSHEVA, A. V. KOZLOV, I. I. LOMAKIN, V. S. MARCHENKO

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

Представлены результаты лечебного применения ритмических холодовых воздействий в комплексной терапии больных с частными проявлениями психосоматических расстройств (артериальной гипертензией, нарушениями менструального цикла, нейротрофическими поражениями тканей полости рта).

Подано результати лікувального застосування ритмічних холодових дій у комплексній терапії хворих з частковими проявами психосоматичних розладів (артеріальною гіпертензією, порушеннями менструального циклу, нейротрофічними ураженнями порожнини рота).

The results of a therapeutic application of rhythmic cold effects in a complex therapy of the patients with manifestations of psychosomatic dysfunctions (arterial hypertension, menstrual cycle impairments, neurotrophic damages of oral cavity) have been presented.

Применение лечебной гипотермии в клинической практике позволило получить стойкие положительные терапевтические эффекты. За последние годы значительно возрос круг патологических состояний, при которых используется один из наиболее обеспеченных аппаратурой и доступных методов лечебной гипотермии — краниоцеребральная гипотермия (КЦГ). Расширились показания к ее применению в неврологической, психиатрической, наркологической, гинекологической клиниках, в практике реанимационной и анестезиологической помощи, сократилось число противопоказаний.

Высокая эффективность поверхностных и средней глубины режимов КЦГ обусловлена возможностью влияния на характер регуляторных гомеостатических процессов, проявляющихся в изменении направленности вегетативных реакций. Очевидно, именно поэтому наиболее стойкий положительный терапевтический эффект отмечен в тех случаях, когда вегетовисцеральные нарушения явились ведущим звеном патогенетического процесса. Безусловно, степень активности вегетативных реакций при развитии патологии отражала и происходящие перестройки функциональных систем организма. Максимальный эффект гипотермии достигался при купировании пароксизмальных проявлений напряжения функциональных регуляторных систем организма в возрастающей стойкой симпатической направленности вегетативных реакций. Применение лечебной гипотермии способствовало редукции сложных симптомокомплексов, в структуру которых входили психоэмоциональные, соматовегетативные, интеллектуально-мнестические нарушения. В структуру таких синдромокомплек-

Application of therapeutic hypothermia in clinical practice allowed to obtain stable positive therapeutic effects. Within the recent years the list of pathological states has significantly augmented, when craniocerebral hypothermia (CCH), that is one of the apparatus-provided and accessible methods of a therapeutic hypothermia, has been used. Indications to its application in neurological, psychiatric, narcology, gynecology clinics, in the practice of resuscitation and anaesthetic assistance get wider, and the number of contraindications has decreased.

High efficiency of surficial CCH regimens and ones of an average depth is stipulated by the possibility to affect the character of regulatory homeostatic processes, manifesting in the change and direction of vegetative responses. Obviously, namely due to this fact the most stable positive therapeutic effect was noted in the cases, when vegetovisceral impairments were the leading link in a pathological process. There is no doubt that an activity extent of vegetative responses during the pathology development also reflected the rearrangements occurred in the organism functional systems. The maximum hypothermia effect was achieved when cupping paroxysmal manifestations of the tension of an organism's functional regulatory systems in increasing stable sympathetic direction of vegetative reactions. Application of therapeutic hypothermia promoted to the reduction of complete sympathetic complexes, which comprised in their structure psychoemotional, somatovegetative and intellectually mnestic injuries. Arterial hypertension due to a high sympathetic tension has been also the structure of such syndrome-complexes. However an experience of CCH application [1] revealed instable hy-



Матеріал, захищений авторським правом

сов вследствие высокой симпатикотонии входила и артериальная гипертензия. Однако опыт использования КЦГ [1] выявил неустойчивый эффект гипотермии в тех случаях, когда патологический симптомокомплекс не сопровождается направленным смещением вегетативной регуляции с преобладанием симпатического или парасимпатического звена. На начальных этапах умеренной КЦГ резко возрастает секреция нейромедиаторов, изменяется обратный захват, что сопровождается повышением артериального давления (АД), активацией симпатического тонуса. Вместе с тем КЦГ используется в терапии заболеваний, в структуру которых входит симптом артериальной гипертензии как проявление симпатоадреналового синдрома (последствия черепно-мозговых травм, депрессии, алкогольные делирии и т.д.) [2]. В данных случаях тенденция к нормализации артериального давления отмечалась лишь при редукции основного ведущего патологического синдрома. При этом особенности медикаментозного обеспечения КЦГ проявляются в частичном угнетении центров терморегуляции с сохранением компенсаторных реакций организма на холодовое воздействие, заключающееся прежде всего в активации нейромедиаторных систем, в основном гипоталамических структур, и сохранении неизменной деятельности дыхательной и сердечно-сосудистой систем. Продолжительность гипотермии определялась появлением компенсированной гомеостатической реакции на действие холодового фактора, заключающейся в нарастании брадикардии, повышении АД на фоне прекращения снижения температуры тела и мозга. Как показали экспериментальные и клинические исследования, в основе данной реакции лежат изменения процессов проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для основной группы нейромедиаторов (адреналина, норадреналина, серотонина, ацетилхолина), что вызывает изменения в соотношениях элементов центральной и периферической регуляции основных функциональных систем организма, одновременно способствуя переходу центральных нейромедиаторных структур мозга на иной (по сравнению с устойчивым патологическим циклом) уровень функционирования [3]. Это клинически отражается в тенденции смещения вегетативных реакций в направлении вегетативной эйтонии с компенсированной активностью симпатической составляющей, обеспечивающей адекватность гомеостатических реакций. Можно утверждать, что достигаемая в результате гипотермии активация нейрометаболической функции ГЭБ является определяющим фактором в достижении положительного терапевтического эффекта лечебной гипотермии.

Следует ожидать, что направленная контролированная экзогенная провокация изменения проницаемости ГЭБ для нейромедиаторов в условиях, не сопровождающихся стрессовыми реакциями регуляторных механизмов даст возможность моди-

pothermia effect in the cases, when pathological symptom complex was not accompanied by a directed shift of vegetative regulation with the prevailing of sympathetic or parasympathetic link. At initial stages of moderate CCH the secretion of neuromediators sharply increases, a reverse capture changes, that is accompanied by an arterial pressure rise (AP), activation of sympathetic tonus. In addition, CCH is used in the therapy of diseases, comprising the symptom of arterial hypertension as the manifestation of sympathetic-epinephrine syndrome (consequences of craniocerebral traumas, depression, delirium tremens etc.) [21]. In these cases the tendency to normalization of arterial pressure was noted only when reducing the basic leading pathological syndrome. Thereat peculiarities of the CCH medication providing are manifested in a partial depression of the thermoregulation centers with keeping the compensatory responses of an organism to a cold effect, consisting, first of all, in the activation of neuromediatory systems, mainly, hypothalamic structures and maintenance of invariable activity of respiratory and cardiovascular systems. Hypothermia duration was determined by the appearance of a compensated homeostatic response to a cold factor effect, consisting in a bradycardia intensification, AP increase on the background of stopping the reduction of an organism and brain temperature. Experimental and clinical investigations showed that the changes in BBB permeability processes for the basic neuromediator group (epinephrine, norepinephrine, serotonin, acetylcholine) were at the base of given response, that caused the changes in the ratios of elements of central and peripheric regulation of the main functional systems in an organism, simultaneously promoting to the transition of central neuromediatory brain structures to another level of functioning (comparing to a stable pathological cycle) [3]. Clinically this fact is reflected in the tendency to shift vegetative responses to the direction of vegetative eutension with a compensated activity of a sympathetic component, providing adequate homeostatic responses. It might be stated, that achieved in the result of hypothermia activation of the BBB neurometabolic function is the determining factor when reaching a positive therapeutic effect of therapeutic hypothermia.

It should be suspected that directed controlled exogenous provocation of the change of BBB permeability for neuromediators under the conditions, not accompanied by stress responses of regulatory mechanisms would provide the possibility to modify the state of functional systems (nervous, cardiovascular, endocrinic), initially involved into being formed pathological state. In this case probability of the development of paradoxal uncontrolled responses can be decreased or even excluded.

For a clinical realization of given situation, from our point of view the method of rhythmic cold effects (RCE) could be used. Coincidence of the BBB resonance band and "operating" rate of thermoreceptors



Матеріал, захищений авторським правом

фицировать состояние функциональных систем (нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной), изначально вовлеченных в сформировавшееся патологическое состояние. В этом случае может уменьшаться или даже исключаться вероятность развития парадоксальных неуправляемых реакций.

Для клинической реализации данного положения, на наш взгляд, может быть использован метод РХВ. Совпадение резонансной полосы ГЭБ и "рабочей" частоты терморецепторов [3] предполагает возможность широкой межсистемной трансляции информационного содержания температурного патерна в функциональные механизмы ЦНС с формированием компенсаторных, регуляторных адаптивных реакций.

Экспериментально показано, что в отличие от КЦГ, метод РХВ в режиме 0,1–0,2 Гц, не приводящий к изменению температуры тела более чем на 1–2 град, вызывает фазовую динамику изменений проницаемости ГЭБ, начиная с первых минут воздействия (рис. 1, 2). Эти процессы сопровождаются перепадами мощности спектра биоэлектрической активности мозга, синхронными колебаниями вегетативного тонуса с полными симпато-парасимпатическими переключениями, что приводит к изменению общего уровня активности саморегулирующихся систем организма [5]. Метод РХВ предполагает исключение предварительной нейровегетативной блокады и медикаментозного угнетения терморегуляторных реакций.

Нами проведен начальный этап клинического применения ритмической гипотермии с использованием модифицированного "Флюидокраниотерма" промышленного производства. РХВ проводили при лечении больных с различными периферическими проявлениями гипоталамического нейроэндокринного синдрома (артериальная гипертензия, нарушения менструального цикла, нейротрофические поражения тканей полости рта и т.п.).

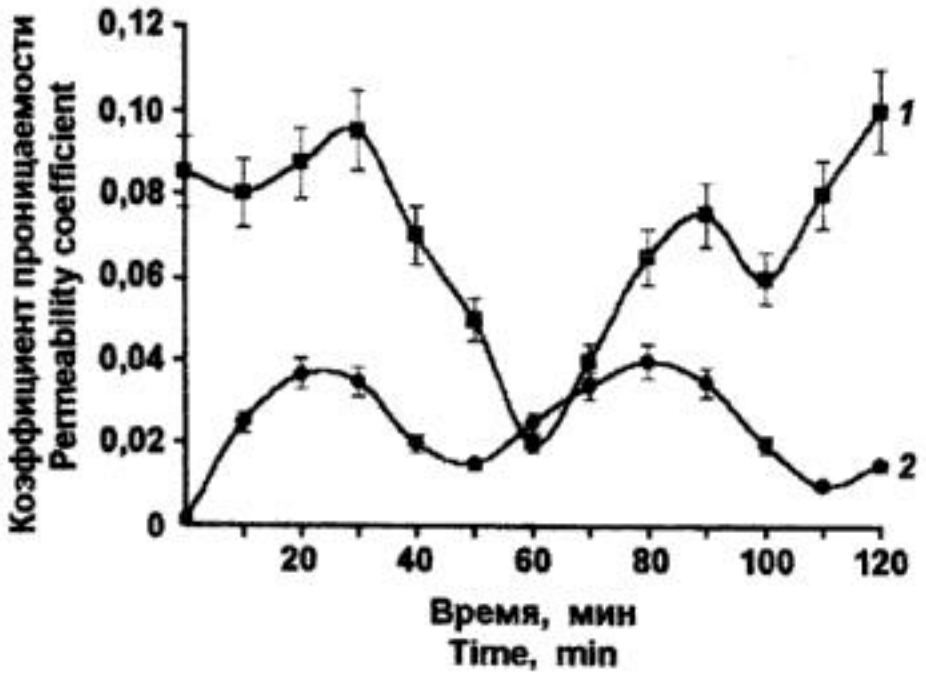



**Рис. 1.** Проницаемость ГЭБ для серотонина (СТ) и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) при ритмической гипотермии: *1* – ГАМК; *2* – СТ.

**Fig. 1.** BBB permeability for serotonin (ST) and gamma-aminobutyric acid (GABA) during rhythmic hypothermia: *1* – GABA; *2* – ST.

[3] supposes the possibility of a wide intersystemic translation of an informative composition of the temperature pattern into the CNS functional mechanisms with the formation of compensatory, regulatory adaptive responses.

It was demonstrated experimentally, that in contrast to CCH the method of RCE in 0.1–0.2 Hz regimen, not resulting in an organism temperature change by 1–2 degrees, caused a phase dynamics in the change of BBB permeability, starting from the first minutes of the effect (Fig. 1, 2). These processes are accompanied by the power differentials of the spectrum of brain bioelectric activity, synchronous variations of vegetative tonus with entire sympathetic-parasympathetic switchings, that results in the change of the general activity level of self-regulated systems in an organism [5]. The method of RCE supposes the excluding of preliminary neurovegetative blockade and medication suppression of thermoregulatory responses.

We had accomplished an initial stage of the clinical application of rhythmic hypothermia using modified industrial "Fluidocraniometer". RCEs were done when treating the patients with various peripheric manifestations of hypothalamic neuroendocrinic syndrome (arterial hypertension, menstrual cycle impairments, neurotrophic damages of oral cavity tissues etc.).

Among the patients, treated by the method of therapeutic hypothermia, 3 groups were noted. The first group of patients consisted of eight reproductive age persons with stable high AP indices (not less than 170–180/90–110 mm of merc.col.). Anamnesis of the disease made from 3 and more years with frequent courses of medicinal therapy. Carried-out investigation noted the tendency to uni-directed character of the shifts in a functional state of vegetative regulation to sympatheticotension (Table).

As 20–30 min pre-medication is the RCE starting 0.0005 per os Phenosepamum was given to the patients (the procedure duration is 45–50 min). Brain

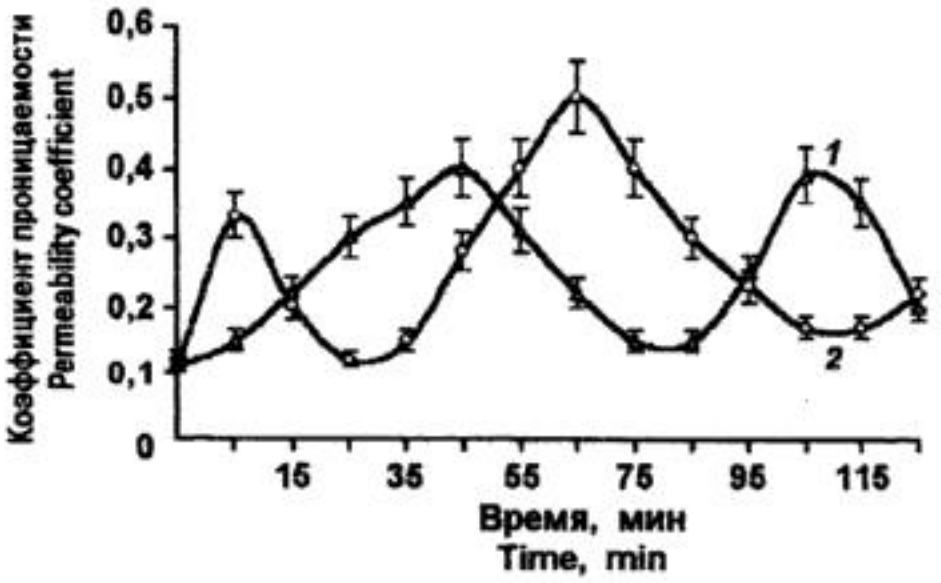



**Рис. 2.** Проницаемость ГЭБ для ацетилхолина (АХ) и норадреналина (НА) при ритмической гипотермии: *1* – АХ; *2* – НА.

**Fig. 2.** BBB permeability for acetylcholine (AC) and norepinephrine (NE) under rhythmic hypothermia: *1* – AC; *2* – NE.



Матеріал, захищений авторським правом

Из больных, которые проходили курс лечения методом лечебной гипотермии, выделили 3 группы. В группу 1 входили больные (8 чел.) продуктивного возраста со стабильно высоким АД (не менее 170–180/90–110 мм рт.ст.). Анамнез заболевания от 3-х и более лет, неоднократные курсы медикаментозной терапии. Проведенное обследование выявило тенденцию к однонаправленному характеру сдвигов функционального состояния вегетативной регуляции в сторону симпатикотонии (таблица).

**Показатели активности вегетативной нервной системы у больных группы 1**

| Показатели | До РХВ | После РХВ |
|---|---|---|
| Тревога, страх | + | – |
| Цефалгии | + 8 больных | + 2 больных |
| АД, мм рт.ст. | 170–180/90–110 | 130–140/80–90 |
| Пульс, удар./мин | 100 ± 8 | 80 ± 6 |
| Дермографизм | Белый, розовый | – |
| Глазосердечный рефлекс | +10 ± 2 | –6 ± 4 |
| Синокаротидный рефлекс | 0 ± 2 | –6 ± 2 |
| Индекс Кердо | +19 ± 4 | +2 ± 0,8 |
| Полиурия | Тенденция к полиурии | Отсутствует |

В качестве премедикации больные за 20–30 мин до начала РХВ получали феназепам 0,0005 per os (продолжительность процедуры 45–50 мин). Температура мозга снижалась на 1–1,5 °С. Во время процедуры достигалось снижение АД на 30–40 мм рт.ст. на фоне нормализации частоты сердечных сокращений (от 96–100 до 72–78 удар./мин).Холодовое воздействие заканчивалось, когда повторные измерения АД и пульса на протяжении 15–20 мин фиксировали их стабильность на фоне прекращения снижения температуры. При контрольных измерениях АД в течение последующих 3–7 сут определялась устойчивая стабилизация АД в границах возрастных норм на фоне функционального преобладания симпатических вегетативных реакций. Последующие 4 месяца больные не отмечали ухудшения состояния. Практически как по реакции на РХВ, так и по отдаленным результатам данная группа больных не отличается от больных, в лечении которых использовалась КЦГ [2].

Отдельно выделена группа 2 из 6 больных (женщины 38–45 лет) с относительно резистентной формой артериальной гипертензии в структуре вегетососудистой дистонии со склонностью к периодическим внезапным и резким подъемам АД по типу гипертонического криза. Больные практически не могли отказаться от постоянного приема гипотензивных средств, которые больше позволяли избежать кризы, чем добиться стойкой нормотонии. Постоянная или периодическая напряженность, невозможность активно реализовать целый ряд личностных претензий и необходимость непрестанно контролировать свое поведение в соответствии с требованиями социальной среды стали для них источником развития конфликтных ситуаций, сопровождающихся развитием вегетовисцераль-

**Activity indices of the vegetative nerve system in the 1st group of patients**

| Indices | Before RCE | After RCE |
|---|---|---|
| Fear, fobia | + | – |
| Cephalgia | + 8 patients | + 2 patients |
| AP, mm of merc.col. | 170–180/90–110 | 130–140/80–90 |
| Pulse, beats/min | 100 ± 8 | 80 ± 6 |
| Dermographism | White, rose | – |
| Eye-cardiac reflex | +10 ± 2 | –6 ± 4 |
| Sinocarotid reflex | 0 ± 2 | –6 ± 2 |
| Cerdo index | +19 ± 4 | +2 ± 0.8 |
| Polyuria | Tendency to polyuria | Absent |

temperature decreased by 1–1.5 °C. During the procedure the AP decrease by 30–40 mm of merc.col. was achieved on the background of normalization of the cardiac pulses rate (from 96–100 down to 72–78 beats/min). A cold effect was finished when repeated AP and pulse measurements within 15–20 min fixed their stability on the background of stopping the temperature decrease. During the control AP measurements within the following 3–7 days its constant stabilization within the limits of age groups on the background of a functional prevailing of sympathetic vegetative responses was noted. Within the following 4 months the patients did not note the aggravation of their state. Practically both on the response on RCE and distant results the given group of patients does not differ from ones treated with CCH [2].

Group 2 was completed and consisted of 6 patients (38–45 years' women) with relatively resistant form of arterial hypertension in the structure of vegetovascular dystonia with the tendency to periodic sudden and sharp rise of AP on the type of hypertension crisis. Patients practically could not refuse the usage of hypotensive preparations, which predominantly allowed avoiding the crisis, by this reaching a stable normothermia. Constant or periodic tenseness, the impossibility of an active realizing the series of personal claims and necessity of incessant control of the behavior according to the requirements of social environment became for them the source of conflict situations development, accompanied by the development of vegetative visceral paroxysms (sudden pulse acceleration with the manifested hypertension response, stable cephalgia, with a permanent delirious idea of a death threat). Developed within several years dominating in the patients' consciousness notions compelled to rush about in-patient polyclinics and clinics without any success. At the same time these patients are characterized by low self-appraisal and ability to a "productive behavior". Ineffectiveness when achieving the necessary level and quality of subjectively estimated health state has reflected in a chronic course of the diseases, in particular, neurotrophic injuries of the tissues in oral cavity. If at initial stages it is considered



Матеріал, захищений авторським правом

ных пароксизмов (внезапным ускорением пульса с выраженной гипертензивной реакцией, стойкой цефалгией, с постоянной бредоподобной идеей угрожающей им смерти). Развившиеся на протяжении нескольких лет доминирующие в сознании больных представления заставили их безуспешно метаться по стационарам и поликлиникам. В то же время этих больных отличают низкая степень "самоодобрения" и способность к "продуктивному" поведению. Безуспешность в достижении желаемого уровня и качества субъективно оцениваемого состояния здоровья находят свое отражение в хроническом течении заболеваний, в частности, нейротрофических поражениях тканей полости рта. Если на начальных этапах это принималось как снижение требований к личной гигиене, в дальнейшем больные долго находились на лечении у стоматологов с постоянно обостряющимися явлениями гингивита и глоссалгий. Практически все больные жаловались на периодические неприятные ощущения, чувство жжения и пощипывания в языке, боль при попадании на него острой пищи. Больные выискивали возможные, по их мнению, аллергические факторы. Для купирования явлений гингивита использовались как лекарственные средства, так и различные нетрадиционные способы лечения. Однако при осмотре выявляются гиперемия и отек десен, явления кровоточивости, зубные отложения. При исследовании на фоне первичной симпатикотонической направленности вегетативных реакций отмечается компенсирующий компонент парасимпатики, иногда переходящий в реакцию гиперкомпенсации, объективно проявляющуюся во внезапных приступах головокружения, обморочных состояниях со снижением АД на фоне нарастающей тахикардии. Учитывая весь комплекс клинических проявлений заболевания у данной группы больных, можно отметить решающую роль нервной системы, а именно дисфункцию гипоталамических структур в результате хронического стресса. У 2-х больных в анамнезе в условиях стационарного лечения проводилась КЦГ, эффект которой больные оценивают как кратковременный и "малозаметный".

Всем больным группы 2 были проведены РХВ. В качестве премедикации использовался оксибутират натрия 20%-й (10,0 мл) и феназепам 0,0005 per os. Продолжительность сеанса гипотермии до 80 мин, температура головного мозга снижалась на 1,2–1,4 °С. После первого сеанса РХВ отмечалось кратковременное (до 2-х суток) снижение АД, аффективной напряженности, сохранялся неустойчивый вегетативный тонус. Повторный сеанс РХВ проводился спустя 21–28 сут. За этот период больные не отмечали гипертонических и вегетовисцеральных пароксизмов, продолжали прием лекарственных препаратов, хотя дозы их были уменьшены до минимальных терапевтических. Также утратили свой ранее пароксизмальный

as the worsening of requirements to a personal hygiene, in future the patients were treated for a long time in stomatological clinics in the occasion of the aggravation of gingivitis and glossalgia symptoms. Practically all the patients noted periodical haptodysphoria, burning and tingling in a tongue, pain when eating a spicy food. Patients were trying to find possible, on their point of view, allergic factors. For cupping the gingivitis symptoms both medicinal preparations and various non traditional treatment methods were used. However during the examination a gingival hyperemia and oedema, stomatorrhagia phenomena, teeth deposits were revealed. When studying vegetative responses on the background of an initial sympathicotonia tendency a compensating parasympathetic component has been noted, sometimes changing for a hypercompensation response, objectively manifesting in sudden vertigo attacks, syncope states with the AP reduction on the background of an increasing tachycardia. Taking into consideration the whole complex of the disease clinical manifestations in the given patients' group a decisive role of nerve system, namely dysfunction of hypothalamic structures in the result of chronic stress, should be noted. Two patients have in their history CCH under the conditions of a hospital treatment, which was characterised by the patients as a short-term and slight effect.

RCEs were accomplished to all the patients of the group 2. Sodium hydroxybutyrate (20% – 10.0 ml) and Phenasepamum (0.0005 per os) were used as a premedication. Duration of a hypothermia session made up to 80 min, and the brain temperature decreased by 1.2–1.4 °C. After the first session of RCE a short-time (to 2 days) AP reduction, as well as the decrease of an affective tenseness were observed, unstable vegetative tonus was kept. Repeated RCE session was done in 21–28 days. Within this period the patients did not observe hypertension and vegetovisceral paroxysms, continued the treatment with medicines, however the doses were reduced down to the minimum therapeutic ones. Also psychoemotional responses lost their earlier paroxysmal character. After the repeated RCE sessions the tendency to the AP stabilisation was at the boundary of 140/90–80 mm of merc.col. Catamnesis made from 1 to 4 months. Part of the patients was kept from taking the medicines. Patients have noted the disappearance of the discomfort in mouth. Within 1.5–2 months after RCE together with stomatological assistance the symptoms of glossalgia and gingival hemorrhages have disappeared. The character of gustatory responses had changed. Positive dynamics in the result of a complex therapy confirms the necessity to correct the central



Матеріал, захищений авторським правом

характер психоэмоциональные реакции. После повторных сеансов РХВ тенденция к стабилизации АД была на рубеже 140/90–80 мм рт.ст. Катамнез от 1 до 4-х месяцев. Часть больных воздерживалась от приема лекарственных средств. Больные отмечали исчезновение неприятных ощущений во рту. На протяжении 1,5–2 мес после РХВ при стоматологической помощи исчезли явления глоссалгий, кровотечений из десен. Изменился характер вкусовых реакций. Положительная динамика в результате комплексной терапии подтверждает необходимость коррекции центрального звена в развитии постстрессовых заболеваний тканей полости рта.

Отдельную группу 3 составили больные (6 женщин 26–36 лет) с патологическим симптомокомплексом, диагностируемым как нейроэндокринный или гипоталамический синдром. Полиморфная симптоматика, указывающая на участие гипоталамических структур, включала вегетативно-сосудистые и висцеровегетативные кризы, кардиалгии, пароксизмы "упадка сил" или внутренней дрожи, дисменореи. В анамнезе присутствуют психоэмоциональные травмы, снижается общий жизненный тонус вследствие социальных и бытовых стрессов. У 2-х больных развитие заболевания связывалось с абортами, у 1 больной – с прерыванием беременности в позднем сроке. Больные лечились в терапевтических и неврологических стационарах по поводу соматовегетативных проявлений заболевания, относясь равнодушно к нарушениям менструального цикла. У 2-х больных они выражались в задержке менструации до 32–36 дней, нерегулярности, а также по типу олигоменореи. У других пациенток цикл сохранялся, но менструации были обильные вплоть до меноррагий с кровомазаньем в межменструальный период, также отмечались болезненные ощущения с массой вегетативных включений. При анализе вегетативного статуса определялись взаимокомпенсирующие отношения между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной системы. Повторяющиеся вегетовисцеральные кризы проходили по смешанному типу: явления артериальной гипертензии сопровождались нарастающими мигренозными кризами. Периодически проявлялась склонность к гипотоническим реактивным состояниям.

Экспериментальные исследования [4] показали принципиальную возможность коррекции гипоталамических нарушений циклических процессов репродуктивной системы с помощью РХВ. Указанной группе больных проведены повторные сеансы РХВ с интервалом 10–14 сут. В результате лечения пациентки отмечали сглаживание болевого синдрома, исчезновение меноррагий. У 2-х больных олигоменореей уменьшились сроки задержки менструаций, появились ранее утраченные ощущения течения менструации, удлинение ее до 3–4 сут (через 2 цикла после последнего РХВ). Если до начала терапии индекс ЛГ/ФСГ был больше 2,

link in the development of post-stress diseases of the oral cavity tissues.

A separate group 3 was completed of the patients (26–36 years' women) with pathological symptomocomplex, diagnosed as neuroendocrinic or hypothalamic syndrome. Polymorphous symptoms, testifying to the participation of hypothalamic structures included vegetovascular and viscerovegetative crises, cardialgia, paroxysms, "collapses" or internal trembling, dysmenorrhea. In the history psychoemotional traumas are present, general vital tonus is worsening due to social and every-day stresses. In 2 patients the disease development was related to abortions, in 1 women – to the late term abortions. Patients were treated at therapeutic and neurological clinics in the occasion of somatovegetative manifestations of the disease, not paying attention to the menstrual cycle impairments. In 2 patients these dysfunctions were manifested in ischomenia up to 32–36 days, irregularity, as well as on olygomenorrhea type. In other patients the cycle was regular, but with hypomenorrhea up to menorrhagia with blood soiling between menstruations and painful with the series of vegetative switchings. During the analysis of vegetative status intercompensating relationships between sympathetic and parasympathetic compartments of a vegetative system were noted. Repeated vegetovisceral crises occurred on a combined type: symptoms of arterial hypertension were accompanied by increasing migrainous crises. From time to time the tendency to hypotonic reactive state was manifested.

Experimental investigations [4] showed the principal possibility to correct hypothalamic impairments of cyclic processes in reproductive system by means of RCE. In the mentioned group of patients the repeated sessions of RCE with 10–14 days' interval were done. In the result of treatment the patients noted smoothing of a painful syndrome, menorrhagia disappearance. In 2 patients with oligomenorrhea the terms of ischomenia reduced, and disappeared earlier senses of the menstruation course, its prolongation up to 3–4 days have appeared (in 2 cycle after the recent RCE). If before the therapy starting the LH/FSH index is higher than 2, in 2 cycles it is $1.8 \pm 0.8$. During the process of RCE the AP practically did not change after its stabilization at the level of $120 \pm 10/80 \pm 5$ mm of merc.col. in $15 \pm 5$ min after the hypothermia starting, systole number decreased by 10-15 pulse beats on an initial one and maintained in such a regimen up to the end of procedure with the duration of $55 \pm 10$ min. After RCE the psychoemotional state has also improved.

The data obtained were substantiated to state an expediency of further investigation and usage of RCE when treating neuroendocrine impairments of a men-



Матеріал, захищений авторським правом

спустя 2 цикла – 1,8 ± 0,8. В процессе РХВ практически не изменялось АД после его стабилизации на уровне 120 ± 10/80 ± 5 мм рт.ст. спустя 15 ± 5 мин от начала гипотермии, число сердечных сокращений уменьшалось на 10–15 ударов от исходного и удерживалось в таком режиме до конца процедуры продолжительностью 55 ± 10 мин. После РХВ улучшился также психоэмоциональный фон.

Полученные данные позволяют обоснованно утверждать целесообразность дальнейшего изучения и использования РХВ при нейроэндокринных нарушениях менструального цикла. Анализируя первый опыт клинического применения РХВ, можно выявить и различия в реакциях на охлаждение, возможно, специфичных для больных с индивидуальными особенностями вегетативной регуляции.

Таким образом, РХВ можно рассматривать как новый перспективный этап в развитии лечебной гипотермии.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Бабийчук Г. А., Шифман М. И.* Нейрохимические процессы в центральной нервной системе при гипотермии.– Киев: Наук. думка, 1984.– 153 с.
2. *Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Ломакин И. И., Белостоцкий А. В.* Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга.– Киев: Наук. думка, 1992.– 207 с.
3. *Бабийчук Г. А., Марченко В. С., Марченко Л. Н., Полищук Л. В.* К концепции экзистоэнцефалической системы охлажденного мозга. Часть 2. Биоритмы холодового стресса // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 21–27.
4. *Ершова О. Е., Грищенко В. И., Ломакин И. И.* Механизмы действия триггерной гипотермии в терапии "психосоматического бесплодия" // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 3.– С. 80–81.
5. *Марченко В. С., Полищук Л. В., Бабийчук В. Г.* Влияние ритмического охлаждения на проницаемость гематоэнцефалического барьера для экзогенного норадреналина // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 1.– С. 36–41.


Поступила 02.04.2002

strual cycle. Analysing the first experience of the RCE clinical application, it also could be revealed the differences in responses to cooling, that, obviously, are specific for the patients with individual peculiarities in a vegetative regulation.

Thus RCEs could be considered as a new perspective stage in the development of medicinal hypothermia.

## REFERENCES


1. *Babijchuk G. A., Shifman M. I.* Neurochemical processes in central nerve system during hypothermia.– Kiev: Nauk. Dumka, 1984.– 153 p.
2. *Babijchuk G. A., Marchenko V. S., Lomakin I. I., Belostotsky A. V.* Neurophysiological processes in a cooled brain.– Kiev: Nauk. Dumka, 1992.– 207 p.
3. *Babijchuk G. A., Marchenko V. S., Polyschuk L. V.* To the conception of existoencephalic system in a cooled brain. Part 2. Biorhythms of a cold stress // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 3.– P. 21–27.
4. *Ershova O. E., Grischenko V. I., Lomakin I. I.* Mechanisms of the effect of trigger hypothermia when treating "psychosomatic infertility" // Problems of Cryobiology.– 2001.– № 3.– P. 80–81.
5. *Marchenko V. S., Polyschuk L. V., Babijchuk V. G.* Effect of rhythmic cooling on BBB permeability for exogenic norepinephrine // Problems of Cryobiology.– 2000.– № 1.– P. 36–41.


Accepted in 02.04.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 616-008.64

UDC 57.043: 616-008.64

# Влияние трансплантаций криоконсервированных клеток эмбриональной печени на метаболические показатели больных с ретинальными ангиопатиями

Ю. А. ДЕМИН

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

# Effect of Transplantation of Cryopreserved Cells of Embryonic Liver on Metabolic Indces of Patinets with Retinal Angiopathies

Yu. A. DEMIN

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

Изучали воздействие криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП) на метаболические показатели у больных сахарным диабетом с непролиферативной формой ретинопатии. На протяжении 3-х лет в динамике исследовали основные метаболические показатели: уровень гликемии, липидный спектр крови, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), а также активность основных антиоксидантных (АО) ферментов — каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в крови. Показана высокая эффективность введения ККЭП в нормализации метаболизма: препарат оказывал гипогликемическое и гиполипидемическое действие, а также проявлял АО свойства. Достигнутая нормализация метаболизма сохранялась у больных с диабетической ретинопатией на протяжении 3-х лет после трансплантации.

Вивчали вплив кріоконсервованих клітин ембріональної печінки (ККЕП) на метаболічні показники у хворих на цукровий діабет з непроліферативною формою ретинопатії. Протягом 3-х років в динаміці досліджували основні метаболічні показники: рівень глікемії, ліпідний спектр крові, вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) — дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіда (МДА), а також активність основних антиоксидантних (АО) ферментів — каталази і суперокиддисмутази (СОД) у крові. Показана висока ефективність введення ККЕП у нормалізації метаболізму: препарат виявляв гіпоглікемічну та гіполіпідемічну дію, а також АО властивості. Досягнута нормалізація метаболізму зберігалась у хворих з діабетичною ретинопатією протягом 3-х років після трансплантації.

The effect of cryopreserved cells of embryonic liver (CCEL) on metabolic indices in patients with Diabetes mellitus with non-proliferative form of retinopathy was studied. During 3 years in dynamics main metabolic indices: level of glycemia, lipid spectrum of blood, content of products of lipid peroxidation (LPO) — diene conjugates (DC) and malone dialdehyde (MDA), as well as the activity of basic antioxidative (AO) enzymes — catalase and superoxide dismutase (SOD) in blood. High efficiency of CCEL introduction in metabolism normalisation was shown: the preparation caused hypoglycemic and hypolipidemic effect, as well as manifested AO properties. Metabolism normalisation has kept in the patients with diabetic retinopathy within 3 years after transplantation.

Профилактика и лечение сосудистых осложнений диабета – одна из важнейших проблем современной клинической диабетологии. Наиболее ранним сосудистым проявлением при диабете чаще всего является диабетическая ретинопатия (ДР), которая приводит к инвалидизации и слепоте. Несмотря на все разнообразие методов, используемых для лечения ДР, общепризнано, что основой ее профилактики и лечения является оптимальная компенсация сахарного диабета [9].

В настоящее время в диабетологии все чаще используется клеточная трансплантация. В основном разрабатывается направление по пересадке островковых клеток [11, 12], однако их применение сопряжено с определенными трудностями [10, 12].

С нашей точки зрения, достаточно приемлемой альтернативой могут служить КЭП. Они содержат основные ферменты углеводного и липидного обменов, большое количество биологически активных веществ, обладают низкими антигенными свойствами,

Prophylaxis and treatment of vascular complications of diabetes is one of the most important problems of modern clinical diabetology. The earliest vascular manifestation at diabetes more often is diabetic retinopathy (DR), which results in invalid state and blindness. In spite of all the variety of methods used for DR treatment it is of common knowledge that the base of its preventing and treatment is optimal compensation of Diabetes mellitus [9].

Nowadays cellular transplantation has been used in diabetology more and more often. Mainly the direction on transplantation of islet cells is under development, however their application is connected to certain difficulties [11, 12].

From our point of view, the cells of embryonic liver (CEL) may serve as an alternative. They contain basic enzymes of carbohydrate and lipid exchange, a big number of biologically active substances, do not possess antigen properties, so they engraft well and have long-term functional activity [3].



Матеріал, захищений авторським правом

поэтому хорошо приживаются и имеют продолжительную функциональную активность [3].

Ранее нами было показано, что трансплантации ККЭП больным с ДР не только улучшали показатели органа зрения, но и положительно влияли на их общее соматическое состояние, что явилось, как можно предположить, результатом воздействия на основные метаболические нарушения в организме [2].

Были также проведены экспериментальные исследования по изучению воздействия трансплантаций ККЭП на углеводный, липидный и проантиоксидантный метаболизм у крыс с аллоксановым диабетом, у которых были выявлены позитивные метаболические эффекты данного способа лечения [3, 4]. Исходя из вышесказанного, цель настоящей работы – изучение влияния ККЭП на основные метаболические показатели больных диабетической ретинопатией. Больные сахарным диабетом с непролиферативной формой ретинопатии (112 чел.) были разделены на 2 группы: основную и контрольную. В контрольной группе (56 чел.) больные получали только стандартный комплекс лечения ДР. В основной группе (56 чел.) больным с ДР на фоне стандартного лечения применяли трансплантации ККЭП по методу, предложенному ИПКиК НАН Украины.

Исследования проводили на протяжении 3-х лет после первой трансплантации ККЭП. У больных с ДР в динамике лечения исследовали основные метаболические показатели: уровень гликемии, липидный спектр крови, содержание основных продуктов ПОЛ: ДК и МДА, а также активность основных АО ферментов – каталазы и СОД.

Уровень тощаковой глюкозы определяли при помощи стандартных наборов фирмы "Lachema", Чехия, содержание показателей ПОЛ (ДК и МДА), а также активность АО ферментов каталазы и СОД в эритроцитах – методами, описанными в [7, 8]. Уровень общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) определяли ферментативным методом с помощью стандартных диагностикумов фирмы "Dia System Int", Германия. Холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) определяли после осаждения липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП) гепарин-марганцевым реактивом [7]. Холестерин ЛПНП, ЛПОНП и $K_{атер}$ рассчитывали по формулам [6, 7]. Статистическую обработку проводили, используя пакет программ Excel.

Динамика метаболических показателей в контрольной группе больных с ДР в процессе традиционного лечения приведена в табл. 1.

Из представленных в табл. 1 данных видно, что метаболические показатели больных с ДР свидетельствовали о стойких и глубоких нарушениях обмена веществ. Средние показатели уровня глюкозы в крови натощак подтверждали наличие умеренной гипергликемии, т.е. полной компенсации проводимое стандартное сахароснижающее лече-

Earlier we have shown that transplantation of CELC to patients with DR not only improved the indices of vision organ but also positively affected their general somatic state, that was as it can be supposed the result of the effect on main metabolic disorders in an organism [2].

There were also experiments on studying the effect of CELC transplantations on carbohydrate, lipid and proantioxidant metabolism in rats with alloxan diabetes in which positive metabolic effects of this treatment way were found [3, 4]. Proceeding from all mentioned above the aim of this work was to investigate CELC effect on main metabolic indices of patients with diabetic retinopathy.

Patients with Diabetes mellitus with non-proliferative form of retinopathy (112 persons) were divided into 2 groups: main and control. In the control group (56 persons) the patients received only standard complex of DR treatment. In the main group (56 persons) the patients with DR on the background of standard treatment the CELC transplantation on the method proposed by the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine was applied.

Investigations were carried-out during 3 years after the first transplantation of CELC. In the patients with DR in the dynamics of treatment we studied the main metabolic indices: glycemia level, lipid spectrum of blood, content of basic products lipid peroxidation (LPO) – DC and MDA, as well as the activity of main AO enzymes – catalase and SOD.

The level of glucose taken on empty stomach was examined with the "Lachema" standard sets (Czechia), content of LPO indices (DC and MDA) as well as the activity of AO enzymes: catalase and SOD in erythrocytes were made by the described methods [7, 8]. The level of total cholesterol (TCh) and the one for triglycerides (TG) were found by enzymatic method using standard diagnosticums of "Dia System Int" (Germany). Cholesterol of lipoproteins of high density (LHD) was determined after sedimentation of lipoproteins of low and very low density (LLD and LVLD) with heparin-magnesium reagent [7]. Cholesterol of LLD and LVLD as well as $C_{ater}$ were counted according to the formulae [6, 7]. Statistical processing was performed using the Excel software.

Dynamics of metabolic indices in the control group with DR in the process of traditional treatment is presented in Table 1.

As the data presented in the Table 1 show, that metabolic indices of the patients with DR testified to a stable and deep disorders in metabolism. Average indices of the level of glucose in blood on empty stomach confirmed the presence of moderate hyperglycemia, i.e. complete compensation was not provided by conducted standard sugar-reducing treatment. In the majority of patients (higher than 80%) the presence of hyperlipidemies predominantly of IV and IIa types, characteristic for Diabetes mellitus, was



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 1** **Table 1**

**Динамика метаболических показателей у больных с ДР**

**Dynamics of metabolic indices in patients with DR**

| Метаболические показатели<br>Metabolic indices | Исходный уровень<br>Initial level | 1 мес<br>1 month<br>$n = 56$ | 6 мес<br>6 months<br>$n = 22$ | 12 мес<br>12 months<br>$n = 21$ | 3 года<br>3 years<br>$n = 12$ | Норма<br>Norm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Глюкоза, ммоль/л<br>Glucose, mM/l | 7,4 ± 0,32 | 7,3 ± 0,28 | 6,8 ± 0,35 | 6,45 ± 0,29<br>$p < 0,05$ | 6,5 ± 0,21<br>$p < 0,05$ | 3,3–6,5 |
| ОХ, ммоль/л<br>TCh, mM/l | 7,25 ± 0,27 | 7,19 ± 0,84 | 6,95 ± 0,48 | 6,78 ± 0,35 | 6,72 ± 0,41 | 3,5–6,5 |
| ТГ, ммоль/л<br>TG, mM/l | 3,72 ± 0,35 | 3,65 ± 0,23 | 2,89 ± 0,34 | 2,54 ± 0,19<br>$p < 0,01$ | 2,35 ± 0,21<br>$p < 0,01$ | 0,55–2,3 |
| ЛПВП, ммоль/л<br>LHD, mM/l | 0,88 ± 0,14 | 0,95 ± 0,16 | 1,18 ± 0,14 | 1,07 ± 0,12 | 0,98 ± 0,10 | 0,9–2,1 |
| ЛПНП, ммоль/л<br>LLD, mM/l | 4,93 ± 0,29 | 4,72 ± 0,47 | 4,55 ± 0,48 | 4,59 ± 0,38 | 4,53 ± 0,41 | 2,0–4,0 |
| ЛПОНП, ммоль/л<br>LVLD, mM/l | 1,56 ± 0,11 | 1,55 ± 0,08 | 1,21 ± 0,07 | 1,14 ± 0,04<br>$p < 0,001$ | 1,03 ± 0,02<br>$p < 0,001$ | 0,25–1,05 |
| $K_{атер}$, усл. ед.<br>$C_{ater}$, rel. units | 7,26 ± 0,42 | 6,47 ± 0,47 | 4,85 ± 0,45<br>$p < 0,05$ | 5,31 ± 0,36<br>$p < 0,05$ | 5,82 ± 0,22<br>$p < 0,01$ | < 3,5 |
| ДК эритроцитов, ммоль/л<br>DC of erythrocytes, mM/l | 5,78 ± 0,47 | 6,15 ± 0,34 | 5,67 ± 0,35 | 5,52 ± 0,28 | 5,44 ± 0,31 | 3,92 ± 0,34 |
| МДА эритроцитов, мкмоль/л<br>MDA of erythrocytes, μM/l | 14,47 ± 1,3 | 15,08 ± 1,1 | 13,67 ± 1,2 | 11,77 ± 1,3 | 11,6 ± 1,1 | 9,74 ± 0,67 |
| Каталаза, усл. ед./л<br>Catalase, rel. units/l | 2,75 ± 0,23 | 2,78 ± 0,43 | 3,86 ± 0,27<br>$p < 0,01$ | 3,65 ± 0,29<br>$p < 0,05$ | 3,48 ± 0,23<br>$p < 0,05$ | 3,58 ± 0,21 |
| СОД, усл. ед./л<br>SOD, rel. units/l | 2,56 ± 0,19 | 2,94 ± 0,29 | 3,78 ± 0,38<br>$p < 0,01$ | 3,76 ± 0,35<br>$p < 0,01$ | 3,58 ± 0,40<br>$p < 0,05$ | 5.06 ± 0,34 |

**Примечание.** p — различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня.

**Note.** p — differences are statistically true in respect of the initial level indices.

ние не обеспечивало. У большинства пациентов (свыше 80%) зафиксировано наличие гиперлипидемий преимущественно IV и IIa типа, характерных для сахарного диабета. Примерно у 30% пациентов отмечена дислипопротеинемия в виде гипоальфахолестеринемии, почти у всех обследованных больных уровень антиатерогенной липопротеиновой фракции ЛПВП находился на нижних границах клинической и возрастной нормы. Вследствие этого значения $K_{атер}$, отражающего соотношение атерогенных (ЛПНП и ЛПОНП) и антиатерогенных (ЛПВП) фракций липопротеинов, превышали рекомендуемые значения более, чем в 2 раза, что при наличии сердечно-сосудистой патологии является плохим прогностическим признаком и свидетельствует о высоком риске развития атеросклеротических поражений сосудов.

Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах, повышенный примерно в 1,5 раза, демонстрировал наличие синдрома пероксидации, при этом активность основных АО ферментов тканей (каталазы и СОД) была снижена в 1,5–2 раза.

Через 1 мес после начала стандартного лечебного курса диабетической ретинопатии заметных изменений метаболизма не происходило. Через 6 мес наметились положительные тенденции в виде некоторого снижения (на 10–20%, $p > 0,05$) уровней глюкозы, общего холестерина, триглицеридов и атерогенных липопротеинов (ЛПНП и ЛПОНП) на фоне умеренного подъема уровня антиатероген-

fixed. Approximately in 30% of patients dislipoptotelnemia as hypoalphacholesterolnemia was noted, almost in all examined patients the level of antiatherogenic lipoprotein fraction of LHD was within low limits of clinical and age norm. As a consequence of this the values $C_{ater}$, reflecting the ratio of aterogenic (LLD and LVLD) and antiaterogenic (LHD) fractions of lipoproteins, exceeded the recommended values more than twice, that at the presence of cardiovascular pathology is bad prognostic sign and testifies to a high risk of the development of atherosclerotic damages of vessels.

The level of LPO products in erythrocytes, increased approximately in 1.5 times, demonstrated the presence of peroxidation syndrome, in this case the activity of main AO enzymes of tissues (catalase and SOD) was reduced in 1.5–2 times.

In 1 month after starting the standard therapeutic course of diabetic retinopathy of significant changes in metabolism did not occur. In 6 months there were noted positive tendency as a some decrease (10–20%, $p > 0.05$) of the levels of glucose, total cholesterol, triglycerides and aterogenic lipoproteins (LLD and LVLD) on the background of moderate rise in the level of antiaterogenic fraction of LVLD. In the result of this statistically true reduced the value $C_{ater}$, remaining in this case higher than the norm. The level of LPO products in erythrocytes (DC and MDA) practically did not change, that is was increased, but in this case there was a certain compensatory rise in



Матеріал, захищений авторським правом

ной фракции ЛПВП. В результате этого достоверно снижалась величина $K_{атер}$, оставаясь при этом выше нормы. Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах (ДК и МДА) практически не изменялся, т.е. был повышенным, однако при этом отмечался некоторый компенсаторный подъем активности АО ферментов: достоверно повышалась активность каталазы и СОД (примерно на 40–45%), причем уровень активности каталазы достигал нормальных значений.

Через год после начала лечения можно было зафиксировать ряд более существенных позитивных сдвигов в состоянии метаболизма у обследованных больных. Уровень глюкозы в крови был ниже исходного и приближался к верхним границам нормы; достоверно относительно исходного снижались уровни триглицеридов и их носителей ЛПОНП. $K_{атер}$ сохранялся на уровне ниже исходного, однако нормальных значений не достигал. Уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах оставался умеренно повышенным, активность каталазы была нормальной, активность СОД несколько ниже нормы, однако достоверно выше исходных значений.

Достигнутые положительные сдвиги метаболизма были достаточно стабильными и через 3 года после начала стандартного курса лечения. Вышеописанная картина сохранялась примерно в том же виде: показатели глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, атерогенных липопротеинов находились на верхних границах нормы; уровень антиатерогенной фракции ЛПВП — на нижних. В результате этого атерогенная ситуация хотя и несколько смягчалась по сравнению с исходной, однако полной нормализации липидограммы не происходило, о чем свидетельствовал уровень $K_{атер}$ (находился на уровне примерно в полтора раза выше рекомендуемого). Уровень продуктов ПОЛ оставался умеренно повышенным; полной нормализации достигала только активность каталазы, уровень активности более чувствительного АО фермента СОД сохранялся сниженным до конца наблюдений. Таким образом, стандартный курс лечения диабетической ретинопатии в определенной степени улучшал состояние метаболизма у больных, до допустимых границ снижался уровень гликемии, несколько улучшались показатели липидограммы, хотя полной нормализации липидного обмена не наступало, о чем свидетельствовали повышенные значения $K_{атер}$. Наличие умеренного уровня пероксидации компенсировалось некоторым подъемом активности АО ферментов, главным образом каталазы.

Результаты трансплантации ККЭП при лечении ДР приведены в табл. 2.

Из представленных данных видно, что уже через 1 мес после первой трансплантации криопрепарата в основной группе пациентов были зафиксированы метаболические сдвиги, указывающие на резкую активизацию обмена веществ. Уровень

the activity of AO enzymes: statistically true increased the activity of catalase and SOD (about 40–45%) and the level of catalase activity reached normal values.

In a year after beginning the treatment one can fix some more significant positive shifts in the state of metabolism in observed patients. The level of glucose in blood was lower than initial one and approached to higher limits of the norm; in respect of initial one the levels of triglycerides and their carriers of LVLD decreased. $C_{ater}$ was kept at the level lower than initial, however it did not achieved normal ones. The level of LPO products in erythrocytes remained moderately increased, catalase activity was normal, SOD activity was slightly lower than the norm, however statistically true higher than initial values.

Achieved positive shifts of metabolism were quite stable even in 3 years after the beginning of standard course of treatment. Described above picture was kept approximately at the same way: the indices of glucose, total cholesterol, triglycerides aterogenic lipoproteins were at upper limits of the norm; the level of antiaterogenic fraction of LHD was at lower ones. In the result of this aterogenic situation although slightly improved in comparison with initial one, but a complete normalisation of lipidogrammes did not occur, that was by the level of $C_{ater}$ (it was at the level about in 1.5 times higher than recommended). The level of LPO products remained moderately increased; only activity of catalase achieved a complete normalisation, the level of activity of more sensitive AO enzyme SOD was kept reduced up to the end of observations. Thus standard course of treatment of diabetic retinopathy in a certain extent improved the state of metabolism in patients, down to admissible limits the level of glycemia decreased, the indices of lipidogrammes slightly improved, though a complete normalisation of lipid exchange did not start, that was confirmed by increased values of $C_{ater}$. The presence of moderate level of peroxidation was compensated by a rise in the activity of AO enzymes mainly catalase.

Results of application of CELC application when treating DR were given in Table 2.

The presented data show, that even in 1 month after the first transplantation of cryopreparation in the main groups metabolic shifts, pointing to a sharp activation of metabolism, were fixed. The level of glucose in blood was not practically changed; on this background the tendency to an increase in lipid fractions (TCh and TG) was noted, as well as the carriers of TG (LVLD) . The most considerable change of lipidogrammes in this period was abrupt increase in of the level of LHD aterogenic fraction more than twice ($p < 0.001$). In this case because the level of aterogenic fractions increased by 12–15% and the one of LHD antiaterogenic fraction more than twice the values of $C_{ater}$ reduced practically down to normal ones, i.e. the cryopreparation introduction in early terms obviously activated the synthesis of lipids, including cholesterol,



Матеріал, захищений авторським правом

**Таблица 2** **Table 2**

**Воздействие трансплантаций ККЭП на метаболические показатели больных с диабетической ретинопатией**

**Effect if CELC transplantations on metabolic indices of patients with diabetic retinopathy**

| Метаболические показатели<br>Metabolic indices | Исходный уровень<br>Initial level | 1 мес<br>1 month<br>$n = 56$ | 6 мес<br>6 months<br>$n = 22$ | 12 мес<br>12 months<br>$n = 21$ | 3 года<br>3 years<br>$n = 12$ | Норма<br>Norm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Глюкоза, ммоль/л<br>Glucose, mM/l | 7,4 ± 0,32 | 7,7 ± 0,57 | 6,2 ± 0,33<br>$p_1 < 0,05$ | 5,47 ± 0,25<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,01$ | 5,7 ± 0,26<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,001$ | 3,3–6,5 |
| ОХ, ммоль/л<br>TCh, mM/l | 7,25 ± 0,27 | 8,15 ± 0,73 | 6,64 ± 0,31 | 5,45 ± 0,29<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,01$ | 5,56 ± 0,32<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,05$ | 3,5–6,5 |
| ТГ, ммоль/л<br>TG, mM/l | 3,72 ± 0,35 | 4,22 ± 0,46 | 2,65 ± 0,24<br>$p_1 < 0,05$ | 1,95 ± 0,13<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,05$ | 1,72 ± 0,15<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,01$ | 0,55–2,3 |
| ЛПВП, ммоль/л<br>LHD, mM/l | 0,88 ± 0,14 | 1,95 ± 0,25<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | 1,47 ± 0,21<br>$p_1 < 0,05$ | 1,56 ± 0,17<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,05$ | 1,44 ± 0,18<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,05$ | 0,9–2,1 |
| ЛПНП, ммоль/л<br>LLD, mM/l | 4,93 ± 0,29 | 4,31 ± 0,48 | 3,85 ± 0,35 | 3,36 ± 0,32<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,05$ | 3,38 ± 0,28<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,05$ | 2,0–4,0 |
| ЛПОНП, ммоль/л<br>LVLD, mM/l | 1,56 ± 0,11 | 1,86 ± 0,14 | 1,19 ± 0,09<br>$p_1 < 0,05$ | 0,77 ± 0,07<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,01$ | 0,75 ± 0,05<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | 0,25–1,05 |
| $K_{атер}$, усл. ед.<br>$C_{ater}$, rel. units | 7,26 ± 0,42 | 3,20 ± 0,56<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | 3,53 ± 0,43<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,05$ | 2,63 ± 0,34<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | 2,94 ± 0,19<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | < 3,5 |
| ДК эритроцитов, ммоль/л<br>DC of erythrocytes, mM/l | 5,78 ± 0,47 | 7,65 ± 0,65<br>$p_1 < 0,05$ | 4,94 ± 0,54 | 4,32 ± 0,37<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,01$ | 3,89 ± 0,34<br>$p_1 < 0,01$<br>$p_2 < 0,001$ | 3,92 ± 0,34 |
| МДА эритроцитов, мкмоль/л<br>MDA of erythrocytes, μM/l | 14,47 ± 1,3 | 16,78 ± 1,7 | 12,56 ± 1,2 | 10,59 ± 1,1<br>$p_1 < 0,05$ | 8,67 ± 0,84<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,05$ | 9,74 ± 0,67 |
| Каталаза, усл. ед./л<br>Catalase, rel. units/l | 2,75 ± 0,23 | 5,65 ± 0,56<br>$p_1 < 0,001$ | 5,94 ± 0,47<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ | 4,43 ± 0,45<br>$p_1 < 0,01$ | 3,86 ± 0,44<br>$p_1 < 0,05$ | 3,58 ± 0,21 |
| СОД, усл. ед./л<br>SOD, rel. units/l | 2,56 ± 0,19 | 4,76 ± 0,57<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,01$ | 4,97 ± 0,35<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,05$ | 5,05 ± 0,38<br>$p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,01$ | 5,12 ± 0,44<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,01$ | 5,06 ± 0,34 |

**Примечания.** $p_1$ — различия достоверны по отношению к показателям исходного уровня; $p_2$ — различия достоверны по отношению к показателям контрольной группы.

**Notes.** $p_1$ — differences are statistically true in respect of the initial level indices; *pdub*2 — differences are statistically true in respect of indices of the control group.

глюкозы в крови практически не изменялся; на этом фоне отмечалась тенденция к повышению уровня липидных фракций (ОХ и ТГ), а также носителей ТГ (ЛПОНП). Самым заметным изменением липидограммы в этот период было резкое повышение уровня антиатерогенной фракции ЛПВП более, чем в 2 раза ($p < 0,001$). При этом, поскольку уровень атерогенных фракций повышался на 12–15%, а уровень антиатерогенной фракции ЛПВП более, чем в 2 раза, значения $K_{атер}$ снижались практически до нормальных, т.е. введение криопрепарата в ранние сроки, очевидно, активизировало синтез липидов, в том числе холестерина, в организме. Однако этот процесс компенсировался резким усилением обратного транспорта холестерина (из сосудов и периферических тканей в печень) путем повышения уровня фракции ЛПВП у больных с ДР. На фоне активизации липидного метаболизма через 1 мес после трансфузии криопрепарата отмечалась также тенденция к активации процессов свободнорадикального окисления в

in an organism. However this process was compensated by a sharp strengthening of reverse transport of cholesterol (out of vessels and peripheric tissues into liver) by means of increasing the level of LHD fraction in patients with DR. On the background of activation of lipid metabolism in 1 month after transfusion of cryopreparation there was noted the tendency to activation of the processes of free-radical oxidation in tissues – an increase in the level of DC and MDA in erythrocytes (by 15–30%) and in greater extent the amount of intermediate LPO products (DC) increased. This strengthening of peroxidation was compensated by a sharp rise in the activity of AO enzymes of catalase and SOD almost twice.

Basic differences in studied indices in the main and control groups in this term of investigation (1 month after transplantation) consisted in a sharp increase in the level of LHD in main group in comparison with the control (almost twice) in the result of this $C_{ater}$ reduced twice in those treated with CELC as well as



Матеріал, захищений авторським правом

тканях - повышение уровня ДК и МДА в эритроцитах (на 15-30%), причем в большей степени увеличивалось количество промежуточных продуктов ПОЛ (ДК). Это усиление пероксидации компенсировалось резким повышением активности АО ферментов каталазы и СОД почти в 2 раза.

Главные различия изучаемых показателей в основной и контрольной группах в этот срок исследования (1 мес после трансплантации) заключались в резком повышении уровня ЛПВП в основной группе по сравнению с контрольной (почти в 2 раза), в результате чего в 2 раза снижался $K_{атер}$ у принимавших лечение ККЭП больных, а также в достоверном повышении активности АО ферментов — СОД и каталазы в 1,6 и 2 раза соответственно.

Таким образом, в ранний период после 1-й трансплантации ККЭП у больных с ДР происходила ненаправленная активация метаболизма по сравнению с исходным уровнем и показателями в контрольной группе. Однако усиление нежелательных метаболических сдвигов (повышение уровня липидов и ПОЛ) компенсировалось гиперактивацией защитных механизмов — усилением АО защиты и механизмов обратного транспорта холестерина.

Через 6 мес после введения криопрепарата были отмечены уже более выраженные, однозначно положительные сдвиги метаболизма у больных основной группы. Уровень глюкозы крови достоверно снижался относительно исходных показателей (на 17%) и достигал верхних пределов нормы. снижался уровень ТГ (почти на 30%), их носителей ЛПОНП и фракции ЛПВП. Отмечалась тенденция к снижению ОХ и ЛПНП. В целом соотношение атерогенных и антиатерогенных липидных фракций было достаточно благоприятным и значения $K_{атер}$ были ниже исходных.

Уровень продуктов ПОЛ демонстрировал четкую тенденцию к снижению и через полгода после первой трансплантации ККЭП, а активность АО ферментов даже несколько повышалась относительно значений, зафиксированных через 1 мес, и оставалась вдвое повышенной относительно исходных показателей.

Различия изучаемых показателей в основной и контрольной группах и в этот срок (6 мес после трансплантации) заключались, как и в предыдущий период исследования, в достоверном превышении уровня ЛПВП в основной группе по сравнению с контрольной (на 25%), в результате чего был достоверно ниже и $K_{атер}$ у проходивших курс лечения ККЭП больных. Уровень активности АО ферментов в основной группе был выше по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

В целом в данный период наблюдений зафиксирована четкая тенденция к нормализации метаболизма у обследуемых пациентов основной группы, более выраженная, чем в контрольной группе.

in a sharp increase of the activity of AO enzymes: SOD and catalase in 1.6 and 2 times, correspondingly.

Thus during an early period after the 1st transplantation of the CEL cryopreparation in the patients with DR non-directed activation of metabolism in comparison with initial level and indices in the control group took place. However the strengthening of unfavourable metabolic shifts (an increase in the level of lipids and LPO) was compensated by hyperactivation of protective mechanisms — the strengthening of AO protection and mechanisms of reverse transport of cholesterol.

In 6 months after the introduction of cryopreparation we noted more manifested, clearly positive shifts in metabolism in patients of main group. The level of glucose in blood was statistically true reduced in respect of initial indices (by 17%) and reached upper limits of the norm, TG level reduced (almost by 30%), their carriers of LVLD and fractions of LHD. There was a tendency to the reduction of TCh and LLD. IN a whole the ratio of aterogenic and antiaterogenic lipid fractions was quite favourable and the values of $C_{ater}$ were lower than initial ones.

The level of the products of LPO demonstrated a distinct tendency to the decrease even in a year after the first transfusion of cryopreparation and the activity of AO enzymes even slightly increased in respect of the values, fixed in 1 month and remained twice increased in respect of initial values.

The differences of studied indices in main and control groups and in this term (6 months after transplantation) consisted, as well as in previous period of investigation, in statistically true increase in the level of LHD in the main group in comparison with the control (by 25%) in the result of this the $C_{ater}$ in the patients treated with CELC was statistically true lower. The level of activity of AO enzymes in the main group was statistically true higher in comparison with analogous indices in the control group.

In a whole within this period of observations a distinct tendency to the normalisation of metabolism in examined patients of main group was found, more manifested than in the control group.

In 12 months after the first transplantation of CELC in patients of main group the picture of practically complete normalisation of studied metabolic indices was revealed. The levels of basic pathogenetically valuable metabolites (glucose, TCh, TG) were completely within the norm limits; content of LPO products approached upper norm limits. Activity of AO enzymes under study slightly reduced in respect of previous observation terms, but remained higher than initial values. When comparing with the data of the control group we found a presence of statistically true positive differences in practically all studied indices of metabolism.



Матеріал, захищений авторським правом

Через 12 мес после первой трансплантации ККЭП у больных основной группы была зафиксирована картина практически полной нормализации изучаемых метаболических показателей. Уровни основных патогенетически значимых метаболитов (глюкоза, ОХ, ТГ) находились полностью в пределах нормы; содержание продуктов ПОЛ приближалось к верхним границам нормы. Активность изучаемых АО ферментов несколько снижалась относительно предыдущих сроков наблюдения, однако оставалась выше исходных значений. Сравнение с данными в контрольной группе показало наличие достоверных позитивных различий практически всех изучавшихся показателей метаболизма.

Через 3 года после начала наблюдений и полного курса трансплантаций ККЭП стабильная нормализация метаболизма в основной группе у больных с ДР сохранялась. Значения всех изучавшихся показателей достоверно отличались от исходного уровня и аналогичных показателей контрольной группы и находились полностью в пределах нормы.

Таким образом, трансплантации ККЭП у больных с диабетической ретинопатией, некомпенсированной гипергликемией, гиперлипидемиями и выраженным синдромом пероксидации приводили к полной нормализации патогенетически значимых показателей метаболизма (уровень гликемии, липидная формула крови, основные продукты ПОЛ и АО ферменты).

В ранний период после первой трансплантации ККЭП у больных с ДР происходила ненаправленная активация метаболизма по сравнению с исходным уровнем и показателями в контрольной группе. Однако усиление нежелательных метаболических сдвигов (повышение уровня липидов и ПОЛ) компенсировалось гиперактивацией защитных механизмов — усилением АО защиты и механизмов обратного транспорта холестерина. Стабильные положительные сдвиги всех изучаемых показателей фиксировали через 6 мес после первой трансплантации, у всех больных основной группы сохранялась стабильная нормализация метаболизма.

Обобщая полученные данные о трансплантации ККЭП при лечении ретинальных ангиопатий, можно выделить в качестве основных гипогликемическое действие, гиполипидемическое действие и АО свойства. Подобные эффекты достигаются на ранних этапах лечения, очевидно, за счет содержащихся в ККЭП ферментов, гормоноподобных факторов и других биологически активных веществ. Однако в отдаленные сроки после трансплантации (через 3 года) в организме должны продолжать работать уже собственные метаболические механизмы, очевидно, "включенные" действием ККЭП. Эта длительность и стабильность достигнутых положительных метаболических изменений являются, по нашему мнению, одними из наиболее ценных

In 3 years after starting the observations and a complete course of CEL transplantation a stable normalisation of metabolism in the main group in patients with DR was kept. The values of all studied indices were statistically and true different from initial level and analogous indices of the control group and were completely within the norm.

Thus CELC transplantation in the patients with DR, non-compensated hyperglycemia, hyperlipidemias and manifested syndrome of peroxidation resulted in a complete normalisation of pathogenetically valuable indices of metabolism (glycemia level, lipid blood formula, main products of LPO and AO enzymes).

In early period after the first transplantation of CELC in the patients with DR there was non-directed activation of metabolism when comparing with an initial level and indices in the control group. However the strengthening of unfavourable metabolic shifts (increase in lipid and LPO) was compensated by hyperactivation of protective mechanisms: strengthening of AO protection and the mechanisms of reverse transport of cholesterol. Stable positive shifts of all studied parameters were found in 6 months after the first transplantation, in all patients of main group a stable normalisation of metabolism was preserved.

Summarising the obtained data on metabolic effects of CELC transplantation when treating retinal angiopathies one can underline the main ones hypoglycemic effect, hypolipidemic one and AO properties. Similar effects are achieved at early stages of treatment obviously owing to containing in the CEL enzymes, hormone-like factors and other biologically active substances. However in distant terms after transplantation (in 3 years) in an organism own metabolic mechanism should continue working, probably "triggered" by CELC effect. This duration and stability of achieved positive metabolic changes are from our point of view one of the most valuable property of this treatment method for retinal angiopathies.

## REFERENCES


1. *Grischenko V. I., Snurnikov A. S., Demin Yu. A., Petrenko O. Yu.* Procurement, cryopreservation and clinical application of human embryonic and fetal in ophthalmologic clinics // Methodical recommendations.– Kharkov, 2000.– 15 p.
2. *Demin Yu. A., Petrenko A. Yu. Treatment of vascular pathology of vision organ by transplantation of cryopreserved cells // International Medical Journal.– 2001.– 7, № 2.– P. 94–96.*
3. *Demin Yu. A., Popov M. M., Romanova O.* Peculiarities of immune response of the recipient to cryopreserved transplant of fetal tissues // Klinichna farmatsiya.– 2001.– № 4.– P. 29–32.
4. *Demin Yu. A.* Pathogenetic correction of metabolic impairments by the injection of cryopreserved embryonic liver cells (on the models of experimental diabetes and atherosierosis). Report 1. Effect of transfusion of cryopreserved embryonic liver cells on the state of pro- and antioxidative homeostasis





Матеріал, захищений авторським правом

свойств данного метода лечения ретинальных ангиопатий.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Грищенко В. І., Снурніков О. С., Дьомін Ю. А., Петренко О. Ю.* Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування ембріональних та фетальних клітин людини в офтальмологічній клініці: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 15 с.
2. *Демин Ю. А., Петренко А. Ю.* Лечение сосудистой патологии органа зрения трансплантацией криоконсервированных клеток // Международ. мед. журн.– 2001.– 7, № 2.– С. 94–96.
3. *Дьомін Ю. А., Попов М. М., Романова О.* Особливості імунної реакції реципієнта на кріоконсервований трансплантат фетальних клітин // Клінічна фармація.– 2001.– № 4.– С. 29–32.
4. *Демин Ю. А.* Патогенетическая коррекция метаболических нарушений введением криоконсервированных КЭП (на моделях экспериментального диабета и атеросклероза). Сообщение 1. Влияние трансфузии криоконсервированных КЭП на состояние про- и антиоксидантного гомеостаза и липидный профиль крови при аллоксановом диабете // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 94–101.
5. *Демин Ю. А.* Патогенетическая коррекция метаболических нарушений введением криоконсервированных КЭП (на моделях экспериментального диабета и атеросклероза). Сообщение 2. Характеристика метаболических нарушений на модели экспериментального антиоксидант-дефицитного атеросклероза и их коррекция криоконсервированными КЭП // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 3.– С. 99–104.
6. *Климов А. Н., Никульчева Н. Г.* Обмен липидов и липопротеинов и его нарушения.– СПб, 1999.– 503 с.
7. *Лабораторное* изменение липидов, липопротеинов и аполипротеинов / Под ред. Н. Рифаи, Г. Варника.– М.: Фармус Принт, 1997.– 429 с.
8. *Медицинские лабораторные технологии: Справочник / Под ред. А. И. Карпищенко.– СПб.: Интермедика.– 1999.– С. 13–100.*
9. *Нестеров А. П.* Диабетические поражения органов зрения // Пробл. эндокринологии.– 1997.– 43, № 3.– С. 16–20.
10. *Farkas G., Lengyel Z., Rossivall L. et al.* Albuminuria after fetal pancreatic islet transplantation : a 10-year follow-up // Nephrol. Dial. Transplant.– 1998.– 13, № 11.– P. 2899–2904.
11. *Groth C. G., Tibell A., Wennberg L.* Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects // J. Mol. Med.– 1999.– 77,№ 1.– P. 153–161.
12. *Hayek A., Beattie G. M.* Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1997.– 82, № 8.– P. 2471–2475.


Поступила 26.02.2002


and lipid profile of blood during alloxan diabetes // Problems of cryobiology.– 2000.– № 2.– P. 94–101.

5. *Demin Yu. A.* Pathogenetic correction of metabolic impairments by the injection of cryopreserved embryonic liver cells (on the models of experimental diabetes and atherosclerosis). Report 2. Characteristics of metabolic impairments on the model of experimental antioxidant-deficient atherosclerosis and their correction by cryopreserved embryonic liver cells // Problems of cryobiology.– 2000.– № 3.– P. 99–104.
6. *Klimov A. N., Nikulcheva N. G.* Exchange of lipids and lipoproteins and its disorders.– SPb., 1999.– 503 p.
7. *Laboratory* change of lipids, lipoproteins and apolyproteins / Ed. by N. Rifai, G. Varnika.– M: Farmus Print, 1997.– 429 p.
8. *Medical* laboratory technologies. Ref. Book / Ed. by A. I. Karpischenko.– SPb.: Intermedika, 1999.– P. 13–100.
9. *Nesterov A. P.* Diabetic damage of vision organs // Problems of endocrinology.– 1997.– 43, № 3.– P. 16–20.
10. *Farkas G., Lengyel Z., Rossivall L. et al.* Albuminuria after fetal pancreatic islet transplantation : a 10-year follow-up // Nephrol. Dial. Transplant.– 1998.– 13, № 11.– P. 2899–2904.
11. *Groth C. G., Tibell A., Wennberg L.* Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects // J. Mol. Med.– 1999.– 77,№ 1.– P. 153–161.
12. *Hayek A., Beattie G. M.* Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1997.– 82, № 8.– P. 2471–2475.


Accepted in 26.02.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616-7: 615.832.9: 618

UDC 616-7: 615.832.9: 618

# Низкотемпературные и другие немедикаментозные методы лечения и аппаратура, применяемые в гинекологической практике

В. И. ГРИЩЕНКО, А. С. СНУРНИКОВ

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

В. В. ЕРЕМЕНКО, Б. Н. МУРИНЕЦ-МАРКЕВИЧ

*Физико-технический институт низких температур им. Б. И. Веркина НАН Украины, г. Харьков*

О. А. ГРИШИНА, В. В. ЛАЗУРЕНКО

*Харьковский государственный медицинский университет*

О. В. ГРИЩЕНКО

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

# Low Temperature and Other Non-medicinal Treatment Methods and Apparatuses, Applied in Gynaecological Practice

V. I. GRISCHENKO, A. S. SNURNIKOV

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

V. V. EREMENKO, B. N. MURINETZ-MARKEVICH

*B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

O. A. GRISHINA, V. V. LAZURENKO

*Kharkov State Medical University*

O. V. GRISCHENKO

*Kharkov Medical Academy of Post Diploma Education*

Описаны немедикаментозные методы лечения и аппаратура, применяемые в гинекологической практике.

Описано немедикаментозні методи лікування та апаратура, які використовуються в гінекологічній практиці.

Non-medicinal treatment methods and apparatuses used in gynaecological practice have been described.

Применение в последние десятилетия большого количества медицинских препаратов в гинекологической практике обусловило рост аллергий на лекарственные вещества, их побочные действия и осложнения, развитие толерантности к ним, патоморфоз заболеваний. В этой связи весьма актуальными и перспективными являются дальнейшая разработка и внедрение новых способов лечения, которые бы позволяли избегать или максимально сокращать применение лекарственной терапии.

С 1970 года во ФТИНТе на основании медико-технических требований, разработанных кафедрой акушерства и гинекологии ХГМУ, создавалась аппаратура для лечения многих гинекологических заболеваний методами криохирургии, гипотермии и

Within the recent decades the application of a variety of medicinal preparations in gynaecological practice stipulated the growth of allergies to medicinal preparations, their side effects and complications, development of a tolerance to allergies, pathomorphosis of diseases. In this connection the further elaboration and introduction of new treatment ways, which would allow to avoid or maximally reduce an application of medicinal therapy is quite actual and perspective question.

Since 1970 at the Institute of Low Temperature Physics and Engineering basing on medical and technical requirements, elaborated at the Chair of Obstetrics and Gynecology of Kharkov State Medical University the devices for treatment of many gynecological dis-



Матеріал, захищений авторським правом

УФ облучения крови, которые рекомендованы Минздравом СССР и Украины к клиническому применению и в настоящее время внедрены во многих клиниках Украины и СНГ [1–4].

## 1. Криохирургия

Криохирургический метод применяется для лечения патологических изменений на шейке матки, эрозий (эрозированных эктропиомов, лейкоплакий, эндометриоидных очагов, полипов), остроконечных кондилом вульвы, дисфункциональных маточных кровотечений, фибромиом матки.

Криовоздействие имеет преимущества перед диатермокоагуляцией, так как низкие температуры влияют на клетки разных тканевых элементов длительно и дифференцированно. Процесс криовоздействия заключается в замораживании патологического очага, который через 10–12 дней отторгается организмом естественным путем. Криовоздействие протекает безболезненно, без рецидивов, в дальнейшем не развиваются рубцовые изменения. Регенерация тканей происходит быстрее, чем после диатермоэлектрокоагуляции.

Разработанные ФТИНТом аппараты используют различные хладагенты и принципы охлаждения. Некоторые из них подробно описаны в [3], принцип работы других приведен в настоящей работе.

Для остановки послеродовых атонических кровотечений разработан аппарат АКА-1 [5], внешний вид которого изображен на рис. 1. Аппарат содержит набор криозондов грушевидной формы. Теплый стерильный криозонд вводится в матку. Под высоким давлением закись азота подается в криозонд, во внутренней полости которого за счет эффекта Джоуля–Томсона происходит его охлаждение до температуры –40 °С. Температура охлаждающей поверхности контролируется термопарой, соединенной с милливольтметром, отградуированным в градусах Цельсия. После криовоздействия наконечник отогревается естественным путем за счет кровотока прилегающих тканей.

Анализ отдаленных результатов после криовоздействия показал, что применение низких температур не вызывает отрицательных явлений, рецидивов, функциональных изменений в матке, поскольку у женщин в последующем сохраняются нормальный овариально-менструальный цикл и возможность наступления беременности.

Более совершенным инструментом является автономный криохирургический аппарат КАС-01-М [5], в качестве хладагента в нем используется жидкий азот. Достоинство такого аппарата в значительно меньшем расходе азота для замораживания одинакового объема ткани, так как отсутствуют затраты азота на охлаждение шланга. Криозонд КАС-01-М состоит из двух легкоразъемных узлов – сильфонного устройства с клапаном подачи и малогабаритного резервуара для жидкого азота. Внешний вид криозонда КАС-01-М изображен на рис. 2.

eases by the methods of cryosurgery, hypothermia and UV blood irradiation, approved for clinical application by the Ministry of Health Care of the USSR and Ukraine have been elaborated and introduced into many clinics in the Union of Independent States and Ukraine [1, 4].

## 1. Cryosurgery

Cryosurgical method is applied for the treatment of pathological changes in cervix uteri, erosions (erosive ectropiomas, leukoplakia, endometriosis, polyps), pointed condyloma in vulva, dysfunctional uterine bleedings, uterine fibromyomas.

Cryoeffect has certain advantages over diathermocoagulation, because low temperatures affect the cells of various tissue elements during long periods and this effect is differential. The process of cryoeffect consists in the freezing of a pathological focus, rejected in 10–12 days. Cryoeffect is not painful procedure, no recurrences are noted, in future cicatrical changes do not develop. Tissue regeneration occurs rapidly comparing to diathermocoagulation.

Institute of Low Temperature and Engineering has elaborated the devices with various coolants and cooling principles. Some of them are described in details

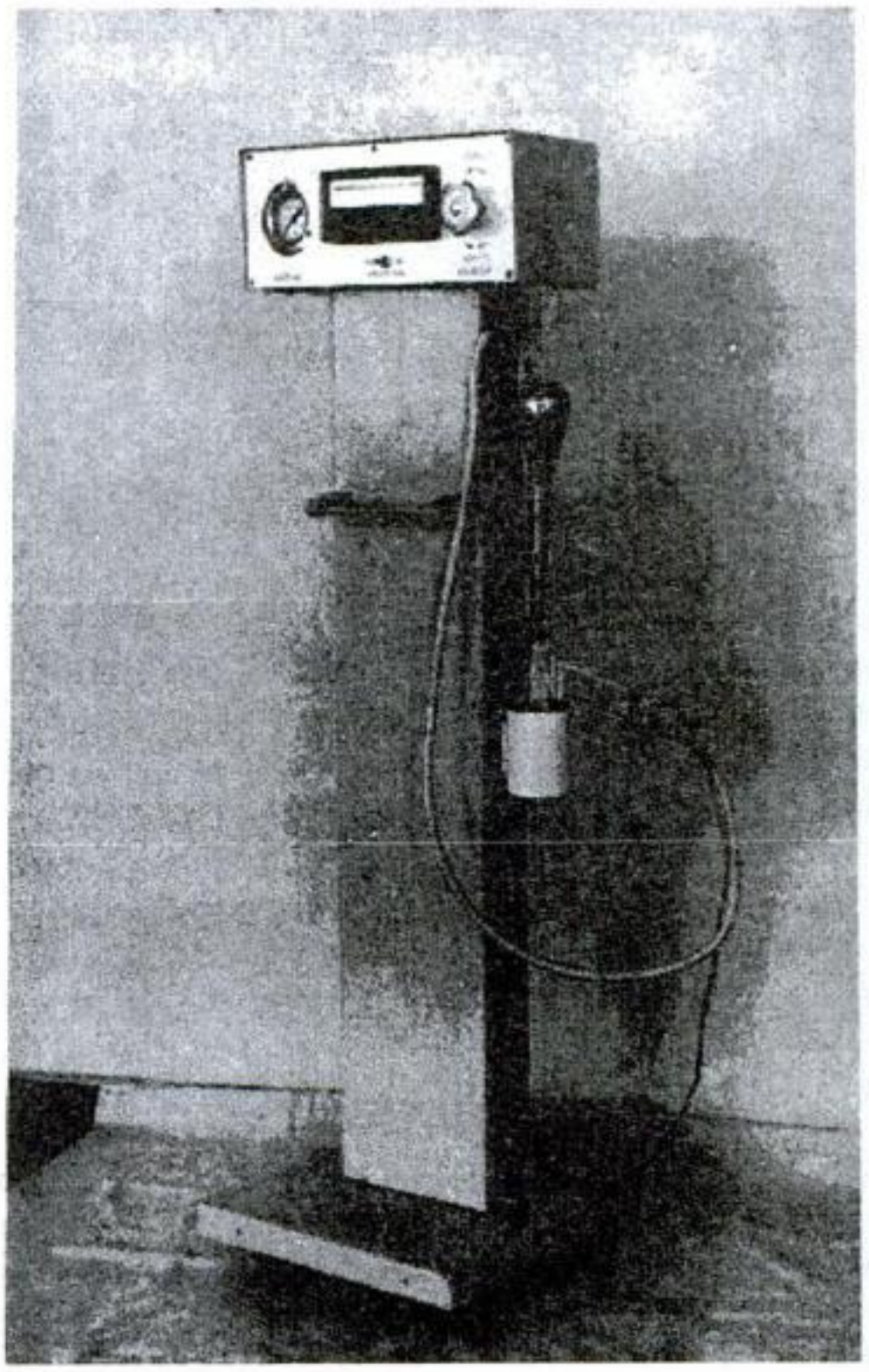


**Рис. 1.** Криохирургический аппарат АКА-1.

**Fig. 1.** AKA-1 Cryosurgical Apparatus.



Матеріал, захищений авторським правом

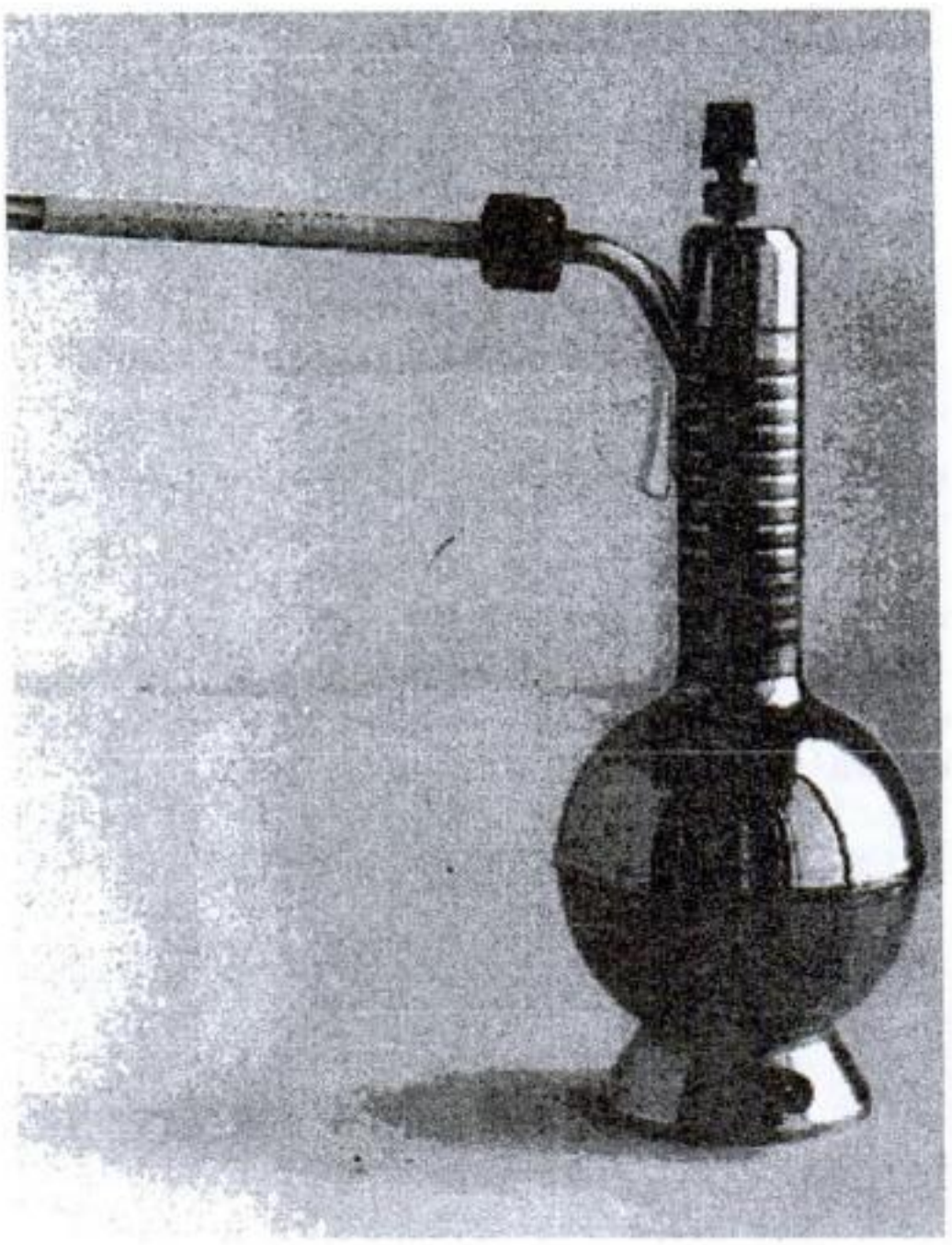


**Рис. 2.** Автономный криохирургический аппарат КАС-01-М.

**Fig. 2.** KAC-01-M Autonomous Cryosurgical Apparatus.

С 1970 года прошли курс лечения около 12 000 больных с патологическими изменениями на шейке матки. Полное выздоровление в течение 7 недель отмечалось в 89,1% случаев. Более длительная эпителизация наблюдалась у больных с большой площадью поражения, гипертрофированной и деформированной шейкой матки.

Сроки эпителизации в основном зависят от величины зоны некроза. У 8,9% больных имело место неполное заживление. Это в некоторой степени объясняется тем, что лечение большинства больных проводилось на начальных этапах исследования, когда еще экспозиция криовоздействия окончательно не была отработана и зона крионекроза у этой части больных была недостаточной, не учитывались конфигурация шейки матки, наличие на ней деформаций, не было дифференцированного подхода к хладагенту, не учитывалась флора влагалищного содержимого. В 2% случаев лечение было недостаточно эффективным, поэтому проведена повторная криообработка (после санации влагалища) с хорошим результатом.

Наблюдались 615 больных с полипами шейки матки. Полипы удалялись хирургическим путем с последующими фракционным выскабливанием матки и криообработкой цервикального канала. В 0,2% случаев имелись патологические изменения. Наблюдались 850 больных с остроконечными кондиломами вульвы. У 89% после однократной криообработки получен хороший эффект, остальным больным с обширными кондиломатозными разрас-

[3], the functioning principles of others is given in the present work.

To stop postnatal atonic bleedings the AKA-1 apparatus, demonstrated in Fig. 1, has been elaborated [5]. Apparatus comprises the set of pear-shaped cryoprobes. The method for the device application is as follows. Warm sterile cryoprobe is introduced into a cervix uteri. Under a high pressure a nitrous oxide is supplied to cryoprobe, in internal cavity of which due to the effect of Joule–Thompson is cooled down to –40 °C. Temperature of a cooling surface, controlled by thermocouple connected to millivoltmeter, calibrated with Calcium degrees. After cryoeffect the tip is naturally warmed due to a blood flow in adjacent tissues.

Analysis of distant results after a cryoeffect demonstrated, that the application of low temperatures did not cause negative symptomes, recurrences, functional changes in a cervix, since normal ovarial-menstrual cycle and the pregnancy possibility in women in labors is kept.

Autonomic cryosurgical apparatus (KAC-01-M) [5] is more perfect instrument, using liquid nitrogen as a coolant. Advantage of such an instrument consists in the fact that significantly less quantity of nitrogen is used for freezing the same volume of tissue, because nitrogen expedintures for cooling the hose are absent (Fig. 2). KAC-01-M cryoprobe consists of two easily disassembled joints, bellows device with a feeding valve and small-scale reservoir for liquid nitrogen. KAC-01-M cryoprobe is given in Fig. 2.

Since 1970 about 12 000 patients with pathological changes in cervix uteri have been treated. A complete recovery within 7 weeks was noted in 89.1% of cases. More prolonged epithelization was observed in the patients with larger area of damage, hypertrophied and deformed cervix uteri.

Terms of epithelization depend, mainly, on the necrosis zone. In 8.9% incomplete epithelization occurred. In a certain extent this was explained by the fact that treatment of the majority of patients was accomplished at initial stages of investigation, when the cryoeffect exposure has not been completely accomplished and necrosis zone in this part of patients was insufficient, but configuration of the cervix uteri, vaginal flora on the presence of deformations in it was not considered, no differential approach to a coolant was noted. In 2% of cases the treatment was not quite efficient, so the secondary cryotreatment was done (after vaginal sanation) and showed a good result.

We observed 615 patients with cervix uteri polyps. Polyps were surgically removed with following fractional curettage of uterus and cervical. In 0.2% of cases pathological changes were noted. There were observed 850 patients with vaginal pointed condylomas. In 89% of patients a good effect was achieved after a single cryotreatment, for other patients with extensive condylomatous spreadings a single cryotreatment was not



Матеріал, захищений авторським правом

таниями одного криовмешательства оказалось недостаточно, поэтому проведена повторная криообработка с хорошим результатом.

Криообработка полости матки с дисфункциональными климактерическими маточными кровотечениями произведена у 4525 больных. Восстановление менструального цикла без кровотечения наблюдалось чаще у больных детородного возраста.

Криохирургический метод обладает высокой степенью эффективности для больных с дисфункциональными маточными кровотечениями, безуспешно лечившихся консервативными методами. Прекращение кровотечений выражается в продолжительной аменореи, иногда с последующей нормализацией менструального цикла.

Криохирургические вмешательства часто позволяют сохранить женщине матку, сокращают время лечения, ликвидируют необходимость многократных посещений больной женской консультации, частых направлений в стационар для выскабливания полости матки. Размеры матки, увеличенные за счет фибромиомы, после криовоздействия уменьшались.

## 2. Гипотермия

Кафедрой акушерства и гинекологии ХГМУ проведен большой объем научно-исследовательских работ по изучению влияния локальной гипотермии (влагалищной, ректальной, гипогастральной области) на сократительную функцию матки, для стимуляции родовой деятельности, лечения гипотонических послеродовых и дисфункциональных маточных кровотечений, при терминальных состояниях и некоторых других показаниях.

***Влияние влагалищной гипотермии на сократительную функцию матки***. Материалы экспериментов свидетельствуют о том, что холодовые раздражители усиливают сократительную функцию матки, причем эффект можно получить при воздействии не только на матку, но и на влагалище.

На основании сопоставления наступивших функциональных изменений в состоянии миометрия и структурных сдвигов в области гипоталамуса, можно сделать заключение, что увеличение размеров нейросекреторных клеток и появление вакуолей в их цитоплазме являются отражением усиленной нейросекреторной активности. По-видимому, в данных условиях нейросекреторное вещество выводится (является субстанцией — носителем окситоцина) из клеток паравентрикулярного ядра.

Следовательно, в реализации стимулирующего действия холодового раздражения матки, влагалища на сократительную функцию миометрия принимает определенное участие нейрогуморальный механизм с включением соответствующих центров гипоталамуса и, очевидно, поступлением в кровоток окситоцина, к которому очень чувствительны мышечные элементы матки.

sufficient, therefore the second time treatment was done with good result.

Cryotreatment of uterus cavity in 4525 patients with dysfunctional climacteric uterus bleedings was accomplished. Recovery of a menstrual cycle without bleeding was noted in child-birth age patients.

Cryosurgical method is highly efficient when treating the patients with dysfunctional uterine bleedings, treated without any success by means of conservative methods. Stopping of bleeding is manifested in long-term amenorrhea with following normalization of a menstrual cycle.

Cryosurgical operations often allow to save an uterus, reduce the treatment term, cancel the necessity of multiple visits of patients to women consultation, frequent indications to enter in-patient clinic for curettage of an uterine cavity. Uterus sizes, its augmentation due to fibromyoma, reduced after cryoeffect.

## 2. Hypothermia

The Chair of Obstetrics and Gynaecology of Kharkov State Medical University has carried-out a great volume of research investigations on the studying the effect of local hypothermia (vaginal, rectal, hypogastral area) on a contractile function with the aim of stimulation the labors' activity, treatment of hypotensive, postnatal and dysfunctional bleedings, at terminal states and some other indications.

***The effect of vaginal hypothermia on uterus contractile function.*** The data of experiments testify that cold irritants potentiate the uterine contractile function, and the effect can be obtained affecting both uterus and vagina. Basing on the comparison of the functional changes achieved, in the state of myometrium and structural shifts in hypothalamus area, it should be concluded that an increase of the sizes of neurosecretory cells and vacuole appearance in their cytoplasm is the reflection of an increased neurosecretory activity. Obviously, under given conditions neurosecretory substance is removed out of the cells of paraventricular nucleus.

Therefore, a neurohumoral mechanism with the inclusion of corresponding hypothalamus centers certainly participates in the realization of a stimulating effect of a cold irritant in an uterine, vagina on a myometrium contractile function and, obviously, by oxytocin supply into blood flow, to those uterine muscular elements are very susceptible.

***Application of a vaginal hypothermia for labors' activity stimulation***. Insufficiency of fetus explusion forces is one of the frequent and dangerous types of obstetrical pathology. According to current notions [4] a neurohumoral regulation of labors' activity is provided by the following levels:

higher departments of central nerve system (predominantly brain cortex, that shows a regulating effect on lower ones);



Матеріал, захищений авторським правом

***Применение влагалищной гипотермии для стимуляции родовой деятельности.*** Недостаточность изгоняющих сил в родах относится к наиболее частым и опасным видам акушерской патологии. По современным представлениям [4] нейрогуморальную регуляцию родовой деятельности обеспечивают:

высшие отделы центральной нервной системы (преимущественно кора головного мозга), оказывающие регулирующее влияние на нижележащие отделы;

подкорковые образования (гипоталамус, структуры лимбической системы);

гипофиз;

яичники и другие железы внутренней секреции, воздействующие на аморфную функцию матки;

матка (эффектор).

Все эти уровни активизируются в конечном итоге на основе рефлекторных реакций и прежде всего под влиянием раздражений, поступающих из области половой сферы, в результате постепенно складывающихся еще при беременности сложных взаимоотношений между организмом матери и плода.

Чтобы усилить недостаточно интенсивную родовую деятельность, во ФТИНТе был разработан аппарат для гипотермии (рис. 3), конструкционная схема которого представлена на рис. 4. В состав

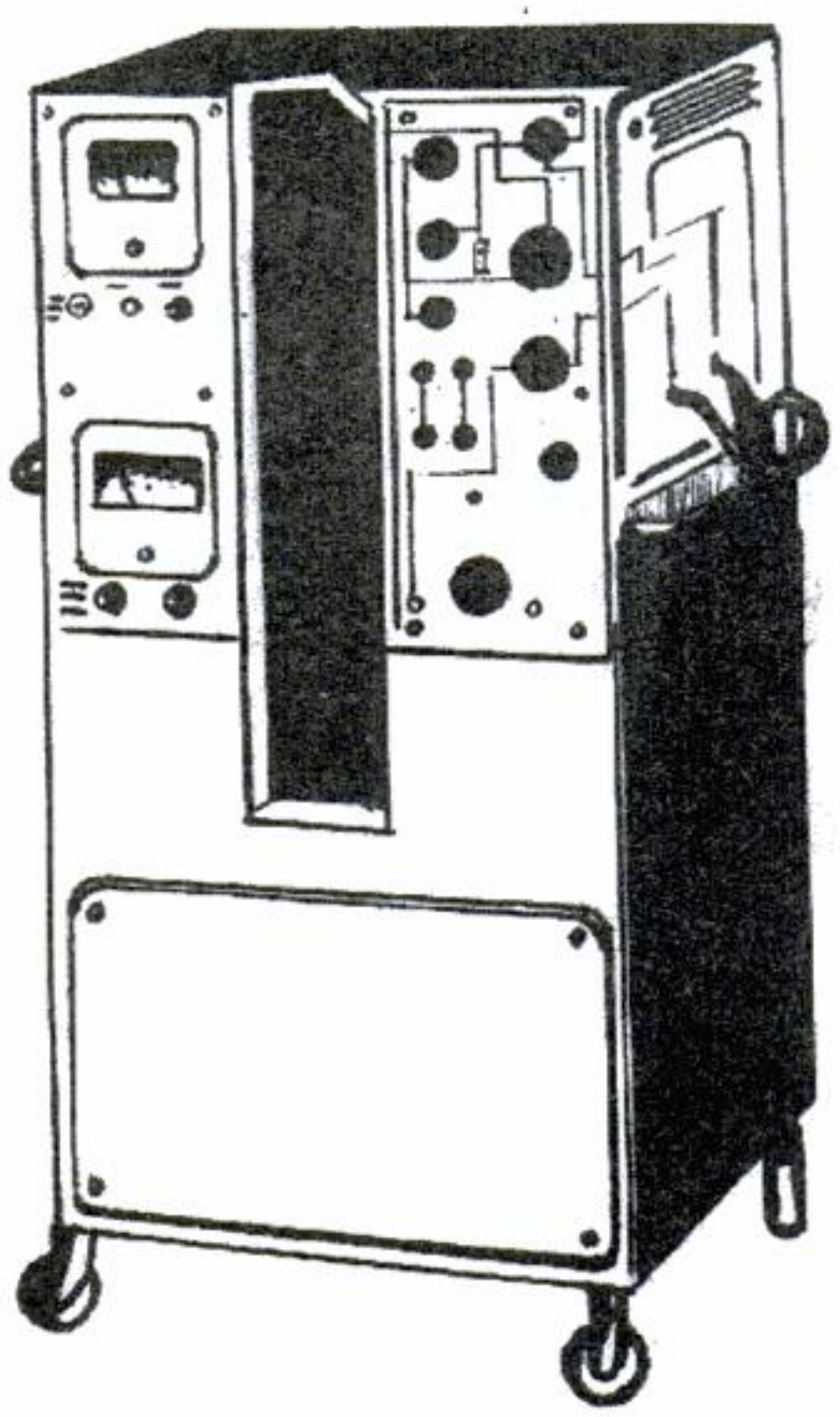


**Рис. 3.** Внешний вид аппарата для гипотермии.

**Fig. 3**. Apparatus for Hypothermia.

subcortex formations (hypothalamus, structures of limbal system);

hypophysis;

ovari and other endocrine glands, affecting an amorphous uteri function;

uterus (affector).

All these levels are finally activated basing on the reflectory reaction and, first of all, under the effect of irritations, coming from a sexual sphere due to the complex relationships developed between the mother's organism and a fetus.

To amplify insufficiently intensified labors' activity apparatus for hypothermia (Fig. 3) was developed at the Institute of Low Temperature Physics and Engineering, scheme of which is presented in Fig. 4. The apparatus consists of the reservoir for fluid, cooled by two built in refrigerating freon aggregates. Their compressors are located at the bottom of apparatus. The upper cap of the device is made of acrylic plastic, the regulators, changing an extent of a fluid cooling, are built-in into this cap, and there is an opening for thermometers, controlling a fluid temperature. On a bottom panel of the apparatus some taps were brought-out, one of those, connected to the tube of a fluid influx to a vessel, allowed to fill the system with a fluid, another one - to connect the vessel to an aggregate through a pump, pumping a cooling liquid out of a vessel and providing its return to the main reservoir. Cooling aggregates and a pump are fed by an alternating current.

Thus, a fluid outflux out of a vessel is provided by a pump, influx into a vessel of new portions of cold fluid occurs by means of a gravity feed, because the whole apparatus (reservoir with liquid) is located higher than the level of a patient's body even in the case when she is in labors' bed.

As a coolant, introduced into vagina, rubber vessels with a wire frame, covered with chlorvinyl membrane was used (Fig. 5, *a*). Inside the vessel through a rubber cap two glass tubes were introduced, through one of them (longer one) a cooled liquid was supplied, by another one its outflux occurred. For investigation of

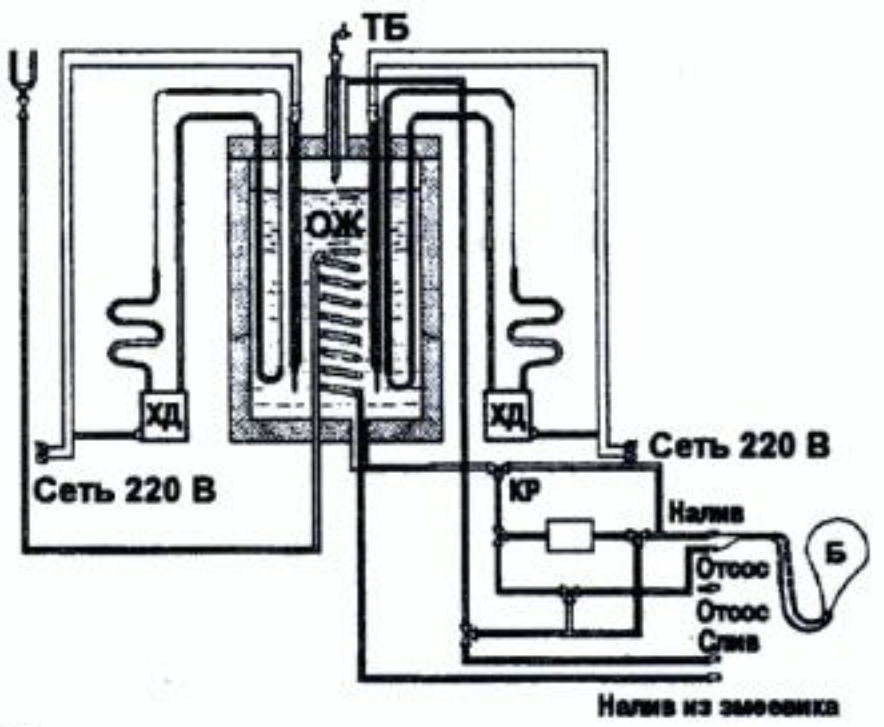



**Рис. 4.** Схема аппарата для гипотермии.

**Fig. 4**. Scheme of the Apparatus for Hypothermia.



Матеріал, захищений авторським правом

аппарата входит резервуар для жидкости (ОЖ), которая охлаждается двумя вмонтированными холодильными фреоновыми агрегатами (ХД). Их компрессоры сосредоточены в нижней части аппарата. Верхняя крышка прибора сделана из оргстекла, в нее вмонтированы регуляторы, изменяющие степень охлаждения жидкости, и имеется отверстие для термометров (ТБ), контролирующих температуру жидкости. На боковой панели аппарата выведено несколько кранов, один из них (КР), соединяющийся с трубкой притока жидкости к баллону (Б), позволяет заполнить систему жидкостью, а другой – подключить баллон к агрегату через насос, откачивающий охлаждающую жидкость из баллона и обеспечивающий возврат ее в основной резервуар. Холодильные агрегаты и насос питаются переменным током из электросети с напряжением 127–220 В.

Таким образом, отток жидкости из баллона обеспечивается насосом, приток в баллон новых порций холодной жидкости происходит самотеком, так как весь аппарат (резервуар с жидкостью) находится выше уровня тела больной даже тогда, когда она лежит на родильной кровати.

В качестве охладителя, вводимого во влагалище, использовались резиновые баллоны с каркасом из проволоки, покрытой хлорвиниловой оболочкой (рис. 5, *а*). В полость баллона через резиновую пробку были введены две стеклянные трубки, по одной из них (более длинной) поступала охлажденная жидкость, по другой происходил ее отток. Для изучения терморецепции влагалища и шейки матки мы применяли стеклянные и металлические баллоны тоже с двумя трубками по типу охладителя, предложенного А. А. Логиновым и Х. М. Рза-Кулиевой (1960). Баллоны с достаточно жесткими стенками, во-первых, позволяли на большей площади получить контакт слизистой оболочки влагалища с охлаждающим агентом, ибо в противном случае, например при промывании вагины охлажденной жидкостью, стенки органа соприкоснулись бы друг с другом, и охлаждение по площади воздействия было бы весьма незначительным. Во-вторых, использование баллона, а не непосредственного поступления жидкости в вагину давало возможность путем предварительной стерилизации этой части прибора проводить гипотермию без нарушения элементарных правил асептики и антисептики.

Внутривлагалищную гипотермию применяли у 29 рожениц со слабостью родовых сил. Большинство из них (13) были в возрасте старше 30 лет; 9 женщин – первородящие, остальные 20 – повторнородящие. У 18 рожениц в анамнезе отмечены аборты – у 6 первородящих и у 12 повторнородящих. У 23 женщин, помимо слабости родовой деятельности, имели место и другие виды акушерской патологии. У одной больной был ранний (рвота), у 6 – поздний (нефропатия средней тя-

the vaginal and cervix uteri thermoreception, glass and metal vessels, comprised 2 tubes, like in the cooler, proposed by A. A. Loginov and Kh. M. Rza-Kulieva (1960), were applied. Vessels with quite rigid walls, allowed, first of all, to achieve the contact of vaginal mucous membrane with a coolant in a large area, or, for example, when washing-out vagina with a cooled liquid, the walls of organ could touch each other, and cooling on the area of effect would be quite insignificant. Then, usage of a vessel instead of a direct liquid supply into vagina gave an opportunity by means of preliminary sterilization of this part of device to carry-out hypothermia with keeping all the rules of aceptics and anticeptics.

Intravaginal hypothermia was applied in 29 women in birth with a weak labors' activity. The major of them (13) were aged older than 30 years; for 9 women these were the first labors, for other 20 patients these were the 2nd labors. In 18 women in labor the abortions were noted in the anamnesis: 6 in the patients with the first labors and 12 in women with the 2nd labors. In 23 patients besides a weak labors' activity other types of obstetrical pathology were observed. One women had early toxicosis (vomiting), 6 patients have noted a late toxicosis (nephropathy of an average severity). There were 8 women with overmature pregnancy, 3 ones with premature labors, in 2 patients anatomically narrow pelvis of the 1st grade of narrowing was revealed, in two patients mitral valvular disease at compensation stage was revealed, one woman had an abundance of water, in other 6 patients only a weak labors' activity was noted. In all 29 women in labor with intravaginal hypothermia labors had successfully finished.

***Application of local hypothermia of anterior abdominal wall for correcting a contractile function of uterus during labours***. In order to study the effect mechanisms of cooling factors on uterus contractile function, to determine a possible application of local

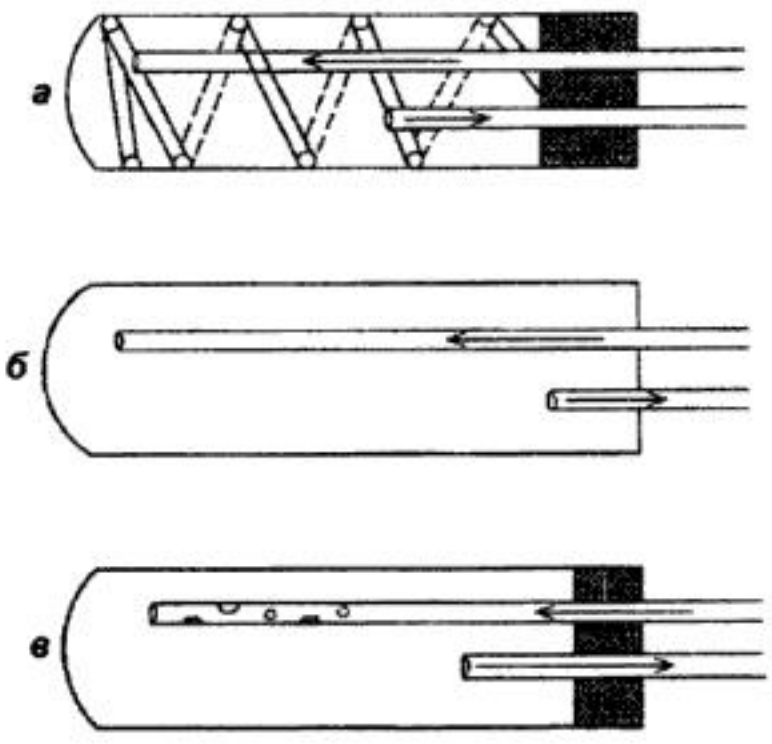



**Рис. 5.** Внутривлагалищные охладители: *а* – резиновый на каркасе; *б* – стеклянный; *в* – металлический.

**Fig. 5**. Intravaginal coolers: *а* – rubber with a frame; *б* – glass; *в* – metal.



Матеріал, захищений авторським правом

жести) токсикоз. Восемь женщин были с переношенной и трое — с недоношенной беременностями, у двух диагностиро-ван анатомически узкий таз I-й степени сужения, у двух — митральный порок сердца в стадии компенсации и у одной роженицы — многоводие; у остальных 6 отмечена только слабость родовых сил. У всех 29 рожениц с внутривлагалищной гипотермией роды закончились благополучно.

***Применение локальной гипотермии передней брюшной стенки для коррекции сократительной деятельности матки в родах***. Для изучения механизмов действия факторов охлаждения на сократительную деятельность матки, определения возможного применения локальной гипотермии передней брюшной стенки (ЛГПБС) для нормализации родовой деятельности при ее аномалиях, а также сравнения данного способа с традиционными методами лечения аномалий родовой деятельности (АРД) проведено экспериментальное исследование 34 беременных крольчих и обследовано 293 беременных и рожениц в сроке 38–42 недели с наиболее распространенными видами АРД (первичная и вторичная слабость, дискоординация родовой деятельности). Изучались функциональное состояние центральной и вегетативной нервной систем, центральной и маточной гемодинамики, гуморального и клеточного звеньев иммунитета, содержание ряда гормонов и биологически активных веществ, проводилось морфогистологическое исследование плаценты, опеределение уровня α- и β-адренорецепторов.

Для проведения ЛГПБС использовали сконструированный в ИПКиК аппарат управляемой гипотермии, предназначенный для изменения, контроля и поддержания заданной температуры при проведении различных видов локальной гипотермии в больничных условиях со специальным аппликатором, который прикладывался к передней брюшной стенке роженицы и оказывал охлаждающее действие в заданном режиме.

В результате проведенных исследований определена оптимальная температура охлаждающей жидкости в контуре (10–15 °С)и экспозиция проведения ЛГПБС (30–60 мин). Выявлено, что ЛГПБС обладает утеротоническим эффектом. Механизм действия заключается в нервнорефлекторном и нейрогуморальном влиянии ЛГПБС на сократительную функцию матки. Патогенетическое лечение АРД с использованием факторов охлаждения заключается в нормализации деятельности центральной нервной системы; вегетативного тонуса, реактивности, обеспечения; улучшении кровеснабжения матки; нормализации содержания гормонов и биологически активных веществ, показателей иммунитета и соотношения α- и β-адренорецепторов в различных отделах матки.

Для лечения слабости родовой деятельности применяли ЛГПБС в течение 30–60 мин при тем-

hypothermia of anterior abdominal wall (LHAAW) for normalising labor activity at its abnormalities, as well as to compare this way with traditional methods for treating abnormalities of labor activity (ALA), we carried-out an experimental study in 34 pregnant female rats and investigated 293 pregnant women and those in labors the term of 38–42 weeks with the most spread ALA types (primary and secondary uterine inertia, dyscoordination of labor activity). We studied functional state of central and vegetative nervous system, central and uterine hemodynamics, humoral and cellular links of immunity, content of some hormones and biologically active substances, we carried-out a morphohisological study of placenta, determination of a- and b-adrenoreceptors.

For LHAAW performance we used the designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine apparatus of a directed hypothermia, designated for measuring, controlling and maintenance of the given temperature when conducting different kinds of local hypothermia under clinical conditions with a special applicator, applied to the anterior abdominal wall of a woman in labors and caused a cooling effect in the established regimen.

As a result of the investigations conducted we determined an optimal temperature of cooling liquid in the circuit (10–15 °C) and the exposure of LHAAW performance (30–60 min). It was revealed that LHAAW had an uterotonic effect. Effect mechanism consists in neuroreflex and neurohumoral LHAAW effects on an uterine contractile function. Pathogenetic treatment of ALA by using the cooling factors consists in normalising the activity of central nervous system; vegetative tonus, reactivity, providing; improvement of uterus blood supply, normalisation of hormone content and biologically active substances, immunity indices and α- and β-adrenoreceptors ratio in different uterine compartments.

For treating uterine inertia we used LHAAW for 30–60 min under the temperature of cooling liquid of 10–12 °C. Dyscoordination treatment of labor activity consisted in conducting of LHAAW performance during 20–40 min under the temperature of cooling liquid of 14 °C at the background of an intravenous introduction by drops of partusisten. The preparation of a pregnant woman's organism to labors consisted in LHAAW performance within 30–90 min under the temperature of cooling liquid of 10–12 °C.

It should be noted, that the factors of cooling do not cause a negative effect on mother's and fetus' state, that is confirmed by the indices of cardiotocography and the state of a newborn child, as well as by a decrease in labor traumatism. In addition, LHAAW possesses an analgetic effect, that is confirmed by clinical data and opoioid content in blood of women in labor. Cooling factors cause less pathomorphological disorders in placenta, than when applying oxytocin.



Матеріал, захищений авторським правом

пературе охлаждающей жидкости 10–12 °С. Лечение дискоординации родовой деятельности заключалось в проведении сеанса ЛГПБС в течение 20–40 мин при температуре охлаждающей жидкости 14 °С на фоне внутривенного капельного введения партусистена. Подготовка организма беременной к родам заключалась в проведении ЛГПБС в течение 30–90 мин при температуре охлаждающей жидкости 10–12 °С.

Следует отметить, что факторы охлаждения не оказывают отрицательного влияния на состояние матери и плода, что подтверждается показателями кардиотокографии и состоянием новорожденного, а также снижением родового травматизма. Кроме того, ЛГПБС обладает обезболивающим эффектом, что подтверждается клиническими данными и содержанием опиоидов в крови роженицы. Факторы охлаждения вызывают меньше патоморфологических нарушений в плаценте, чем применение окситоцина.

Показаниями к проведению ЛГПБС являются первичная и вторичная слабость родовой деятельности, дискоординация родовой деятельности, отсутствие готовности организма беременной к родам.

Таким образом, факторы охлаждения, в частности ЛГПБС, способны коррегировать и предупреждать развитие АРД и являются эффективным методом терапии в сравнении с существующими медикаментозными способами.

Преимущества краниоцеребральной гипотермии очевидны: это минимальные потери тепла, охлаждение тела при существенном снижении температуры мозга. Последнее может оказать благоприятное влияние как на метаболические процессы, так и на кровообращение в черепной полости, на развитие отека мозговой ткани.

Для проведения краниоцеребральной гипотермии пользовались изготовленным во ФТИНТе шлемиком, состоящим из полиэтиленовых трубок диаметром 3 мм (рис. 6). По трубкам циркулировала охлажденная до 10–12 °С вода, поступавшая из аппарата для местной гипотермии, выполненного по той же схеме, что и прибор для проведения



**Рис. 6.** Шлемики для краниоцеребральной гипотермии.

**Fig. 6.** Small helmets for craniocerebral hypothermia.

The indications for LHAAW performance are as follows: primary and secondary uterine inertia, dyscoordination of labor activity, absence of an organism's readiness to labors.

Thus, the cooling factors, LHAAW in particular, are capable to correct and prevent the ALA development and are the efficient therapeutic methods in comparison with the existing medicamental ways.

The advantages of craniocerebral hypothermia are evident. This is a minimum heat loss, a body cooling under considerable decrease in brain temperature. The latter can cause a favourable effect on both the metabolic processes and blood circulation in cranio cavity, and the brain tissue oedema development.

In order to perform craniocerebral hypothermia we used the produced at the Institute of Low Temperature Physics and Engineering small helmet, consisted of 3 mm diameter's polyethylene tubes (Fig. 6). Water, cooled down to 10–12 °C, circulated through the tubes, entering from the apparatus for local hypothermia, designed according to the same scheme, that for the device, designated for intrauterine and intravaginal hypothermia performance. One began to cool the head after recovering a newborn child from the asphyxia according to the described above resurrection methods (without cold bath) in the cases, when these methods did not provide a stable recovery of the main vitally important function indices of respirative, blood circulation and central nervous systems. Sometimes we used craniocerebral hypothermia.

Taking into consideration the fact, that after complete recovery of a child from asphyxia there is the one of homeostatic reactions, it was necessary when beginning craniocerebal hypothermia to take measures for blocking undesirable neurovegetative reactions. With this aim we administrated the injections of small doses of aminazine, which gained a wide application at intracerebral traumas in newborn children. Aminazine causes not only a blocking effect on reticular formation of brain stem, but also anti-spasmodic, sedative ones and prevents the development of brain oedema. The preparation was intramuscularly indicated by 0.5 ml in 0.25% solution within each 4–8 hours. One began the hypothermia performance in 30 min after next forthcoming injection.

As a result of treating 25 children, 18 of them survived. Three children of 4, born in a very severe state, died. In one case the cause of death, besides of asphyxia and intracerebral haemorrhage, was the infection: viral enteritis and esophagitis. Two children died because of a massive haemorrhage into brain, accompanied in one child with aspiration pneumonia. Among 18 newborn children, which left the Maternity House, in two we noted the "immediate consequences", manifested in some rigidity of occipital muscles, slight flexion contracture in extremity muscles. In the similar group by the severity degree consisted of 20 children, treated by the same means, but without hypothermia, we obtained less favourable results:



Матеріал, захищений авторським правом

внутриматочной, внутривлагалищной гипотермии. К охлаждению головки приступали после выведения новорожденного из асфикции описанными выше методами оживления (без холодной ванночки) в тех случаях, когда эти методы не давали достаточно стабильного восстановления основных жизненно важных показателей функций систем дыхания, кровообращения, центральной нервной системы. Иногда использовали краниоцеребральную гипотермию при явлениях гипоксии новорожденных.

Учитывая, что после полного выведения ребенка из асфиксии у него восстанавливаются гомеостатические реакции, необходимо было, приступая к краниоцеребральной гипотермии, принять меры по блокированию нежелательных нейровегетативных реакций. С этой целью назначались инъекции небольших доз аминазина, который нашел широкое применение при внутричерепных травмах у новорожденных. Аминазин не только оказывает блокирующее влияние на ретикулярную формацию мозгового ствола, но и действует противосудорожно, седативно, препятствует развитию отека мозга. Назначали препарат внутримышечно по 0,5 мл в 0,25%-м растворе каждые 4–8 ч. Проведение гипотермии начинали через 30 мин после очередной инъекции.

В результате лечения 25 детей выжили 18 . Три ребенка из 4-х, родившихся в особенно тяжелом состоянии, умерли. В одном случае причиной смерти, помимо асфикции и внутричерепного кровоизлияния, послужила инфекция — вирусный энтерит и эзофагит. Двое детей умерли от массивных кровоизлияний в мозг, сопровождавшихся у одного ребенка аспирационной пневмонией. Из 18 выписанных новорожденных у 2-х отмечались "ближайшие последствия", выражавшиеся в некоторой ригидности затылочных мышц, небольшой сгибательной контрактуре мышц конечностей. В аналогичной по степени тяжести контрольной группе из 20 детей, лечившихся теми же средствами, но без гипотермии, получены менее благоприятные результаты: умерли 5 новорожденных, при выписке состояние нельзя было квалифицировать как удовлетворительное у 4-х детей.

Таким образом, у доношенных детей, выведенных из асфикции, при расстройствах мозгового кровообращения, внутримышечной травме применение краниоцеребральной гипотермии с использованием современной техники под контролем квалифицированного персонала можно считать целесообразным.

### 3. Лечение воспалительных заболеваний с помощью аутокрови, облученной УФ лучами

Воспалительные заболевания внутренних половых органов женщины — наболее распространенные гинекологические заболевания. Возникший в органах половой системы воспалительный очаг не остается изолированным, в патологический процесс вовлекается весь организм, нарушается функция гипоталамо-гипофизной системы, всех желез внутренней секреции (яичников, коры надпочечников, щитовидной железы и др.), наступают патологические изменения обменных процессов.

5 newborn children died, it was impossible to grade the state of 4 children as a satisfactory one when leaving the Maternity House.

Thus, in mature children, recovered from asphyxia, at the disorders of brain circulation, intramuscular trauma the application of craniocerebral hypothermia using modern technics under the control of qualified personnel can be considered as an expedient one.

### 3. Treatment of inflammatory diseases using the UV-irradiated autoblood

Inflammatory diseases of internal women genital organs are the most spread gynaecological diseases. The focus of inflammation, appeared in organs of genital system, does not remain to be isolated, all organism is involved into pathological process, there is a disorder in hypothalamo-hypophysial system function, in all endocrine glands (ovary, adrenal cortex, thyroid gland etc.), the pathological changes in metabolic processes occur.

The possibilities of medicinal therapy are limited: somatic contraindications, age factor, non-efficiency of treatment etc. Therefore the interest for non-medicamental methods of effect on a whole organism for strengthening its protective immunologic reactions, normalising metabolic processes, functions of central and vegetative nervous system, are quite justified.

The Chair of Obstetrics and Gynaecology of Kharkov State Medical University together with the Institute of Low Temperature Physics and Engineering have developed the apparatus for blood irradiation, which constructive scheme is presented in the Fig. 7. Technical specifications of the apparatus are as follows: power consumption is not higher, than 5 W; predominating wave length of UV radiation is 254 nm; voltage of power supply is 220 V. Blood for irradiation was taken in respect of 1 ml per 1 kg of body mass and is irradiated for 3 min (by the methods of Weissner, 1973).

Taking into consideration small dimensions and low weight of the apparatus a blood irradiation can be carried-out both in the room for manipulations and directly at a patient's bed. This procedure can be accomplished by secondary medical staff, acquainted with general requirements of electro-safety, as well as asepsis and antisepsis.

Reinfusions of UV irradiated blood are carried-out daily or in a day, depending on the disease severity. At its severe proceeding they are daily conducted up to the improvement of general state, then in a day up to complete recovery. Number of procedures for a course varies from 5 to 10, depending on the treatment efficiency, which indices can be as follows: normalisation of patients' general state, disappearance of anatomic changes and painfulness in the uterine appendages area, as well as the indices of laboratory and other easily available methods of examination, testifying to the regress of inflammatory process [6, 7].



Матеріал, захищений авторським правом

Возможности лекарственной терапии ограничены: соматические противопоказания, возрастной фактор, неэффективность лечения и т.д. Поэтому вполне оправдан интерес к немедикаментозным методам воздействия на целостный организм для усиления его защитных иммунологических реакций, нормализации обменных процессов, функций центральной и вегетативной нервной систем.

Кафедрой акушерства и гинекологии ХГМУ совместно с ФТИНТом разработан аппарат для ультрафиолетового облучения крови, конструктивная схема которого представлена на рис. 7. Техническая характеристика аппарата: потребляемая мощность — не более 5 Вт; преобладающая длина волны УФ излучения — 254 нм; напряжение электропитания — 220 В. Кровь для облучения берется из расчета: 1 мл на 1 кг массы тела и облучается в течение 3 мин (по методике Weissner, 1973).

Учитывая малые габариты и небольшой вес аппарата, облучение крови можно проводить как в манипуляционной, так и непосредственно у постели больной. Данную процедуру может выполнять средний медицинский персонал, ознакомленный с общими требованиями электробезопасности и асептики-антисептики.

Реинфузии УФ облученной крови проводят ежедневно или через день в зависимости от тяжести заболевания. При тяжелом его течении — ежедневно, до улучшения общего состояния, затем через день до полного выздоровления. Количество процедур на курс — от 5 до 10, в зависимости от эффективности лечения, показателями эффективности которого могут быть: нормализация общего состояния больных, исчезновение анатомических изменений в области придатков матки и болезненности, а также показатели лабораторных и других легко доступных методов обследования, свидетельствующих о регрессе воспалительного процесса [6, 7].

Было обследовано 174 женщины. Из общего числа больных 63 женщины с острым первичным сальпингоофоритом и 111 — с обострением хронического сальпингоофорита. Всем больным при поступлении в стационар назначалась общепринятая противовоспалительная терапия, включающая антибиотики, дезинтоксикационные средства, введение десенсибилизирующих и стимулирующих препаратов, рассасывающая терапия, физиотерапевтические процедуры, применение симптоматических и противовоспалительных средств.

У 96 больных основной клинической группы (32 с острым сальпингоофоритом и 64 с обострением хронического сальпингоофорита) в общий комплекс терапии было включено применение крови, облученной УФ лучами.

У 78 больных контрольной клинической группы после проведенного курса лечения показатели клеточного иммунитета в основном повысились статистически несущественно и остались достоверно ниже, чем у больных основной клинической группы. Полной нормализации лейкоцитарных ферментов и содержания гликогена не наступало, в результате чего

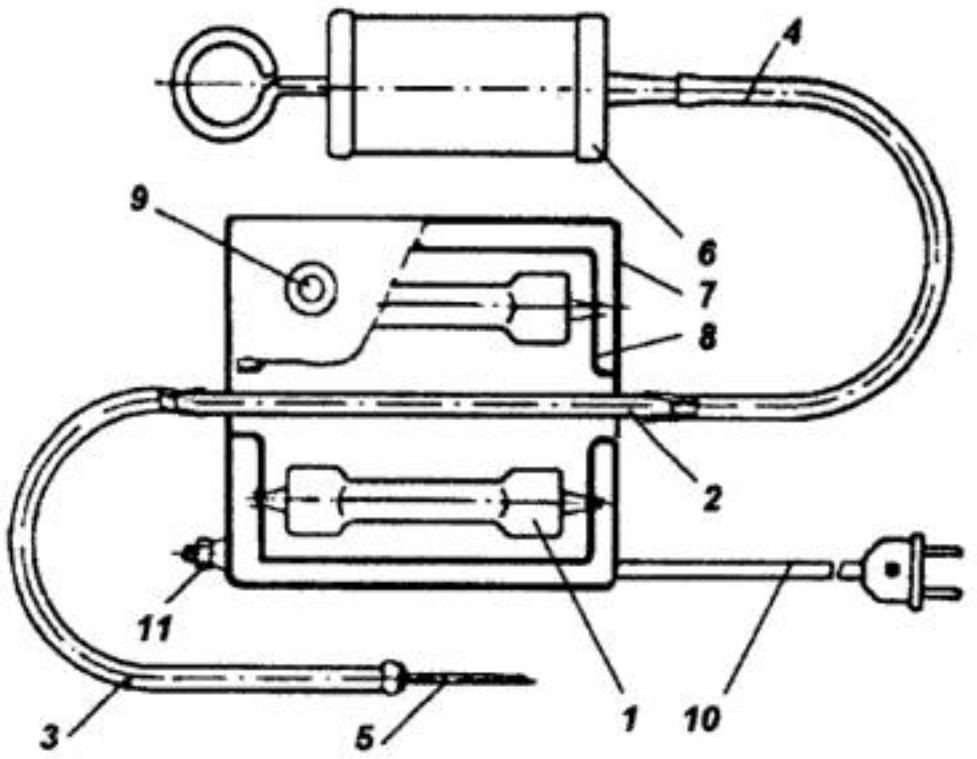



**Рис. 7.** Аппарат для УФ облучения крови: *1* — излучатель; *2* — кювета; *3, 4* — трубопроводы; *5* — игла инъекционная; *6* — шприц; *7* — корпус; *8* — отражатель; *9* — световод; *10* — кабель сетевой; *11* — клемма заземления.

**Fig. 7.** Apparatus for blood ultraviolet irradiation: *1* — radiator; *2* — cuvette; *3, 4* — pipe-lines; *5* — syringe needle; *6* — syringe; *7* — body (case); *8* — reflector; *9* — light-emitting diode; *10* — line-operated cable; *11* — earthing terminal.

We have examined 174 women. Among total number of patients 63 women had an acute primary salpingo-oophoritis and 111 with the aggravation of chronic salpingo-oophoritis. When entering the hospital all patients received a generally used antiinflammatory therapy, including antibiotics, detoxication means, introduction of desensitizing and stimulating preparations, resolving therapy, physiotherapeutic procedures, application of symptomatic and antiinflammatory means.

In 96 patients of the principal clinical group (32 with acute salpingo-oophoritis and 64 with chronic salpingo-oophoritis aggravation) one included UV irradiated blood into the total therapeutic complex.

In 78 patients of the control clinical group after conducting the treatment course the indices of cellular immunity for the most part increased statistically insignificantly and remained statistically and truly higher, than in the patients of the main clinical group. There was no normalisation of leukocytic enzymes and glycogen content, as the result of which the activity of alkaline phosphatase and glycogen content in leukocytes of this group's patients remained statistically and significantly higher and peroxidase activity lower, when comparing with the main clinical group. Only 26 women (33.3%) of the control group were discharged from the hospital in a healthy state, the anatomic changes in uterine appendages area remained in 52 women (66.7%). Disease relapses in this group of patients were noted in 40 women (51.3%).

There was the reduction of staying period of the main clinical group of patients in the hospital by 5.3 days in average, in comparison with the patients of the control group. After the treatment in the main group of patients there was an increase in natural resistance of an organism up to the level of healthy



Матеріал, захищений авторським правом

активность щелочной фосфатазы и содержание гликогена в лейкоцитах больных этой группы остались статистически достоверно выше, а активность пероксидазы – ниже, чем в основной клинической группе. Из стационара только 26 женщин (33,3%) контрольной группы были выписаны здоровыми, у 52 (66,7%) остались анатомические изменения в области придатков матки. Рецидивы заболевания в этой группе больных были отмечены у 40 женщин (51,3%).

Уменьшилось время пребывания основной клинической группы больных в стационаре в среднем на 5,3 дня по сравнению с больными контрольной группы. После проведения лечения в основной группе больных естественная резистентность организма повысилась до уровня здоровых женщин. Одновременно у этих больных произошла полная нормализация лейкоцитарных ферментов и содержания гликогена. Наряду с этим у больных основной группы после окончания курса лечения нормализовалось общее состояние и почти полностью исчезли анатомические изменения в области придатков матки. Из стационара 83 женщины (86,4%) были выписаны с диагнозом "здорова" и только 13 (13,6%) с незначительно выраженными остаточными явлениями сальпингоофорита. Рецидивы заболевания в течение 2-х лет после выписки в основной группе были зарегистрированы лишь у 10 женщин (10,4%).

Таким образом, аутокровь, облученная УФ лучами, оказывая благоприятное влияние на иммунологическую реактивность организма и внутриклеточный обмен веществ, в общем комплексе противовоспалительной терапии способствует более быстрому и полному выздоровлению.

Аутокровь, облученная УФ лучами, может быть рекомендована в общем комплексе терапии острого первичного и обострения хронического сальпингоофорита. При наличии соответствующего аппарата для облучения крови, процедура эта является довольно простой и может быть использована в любом акушерско-гинекологическом стационаре.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Веркин Б. И., Грищенко В. И., Муринец-Маркевич Б. Н. и др.* Аппарат для криохирургии в гинекологии // Мед. техника.– 1977.– № 1.– С. 30–32.
2. *Веркин Б. И., Грищенко В. И., Муринец-Маркевич Б. Н. и др.* Криогенная техника в гинекологической практике // Мед. техника.– 1978.– № 2.– С. 28–32.
3. *Грищенко В. И., Гришина О. А., Снурников А. С., Муринец-Маркевич Б. Н.* Методы локального низкотемпературного воздействия // Пробл. криобиологии.– 2001.– № 2.– С. 92–100.
4. *Грищенко В. И.* Гипотермия и криохирургия в акушерстве и гинекологии.– М.: Медицина, 1974.– 280 с.
5. *Грищенко В. И., Муринец-Маркевич Б. Н., Носов М. Е. и др.* Акушерский криогенный аппарат // Мед. техника.– 1983.– № 1.– С. 56–58.
6. *Грищенко В. И., Резников В. А.* Функциональная активность Т-лимфоцитов у больных с воспалительным процессом гениталий при комплексном лечении с применением физиотерапевтических методов // Немедикаментозные методы лечения в клинической медицине: Тез. докл. обл. конф.– Харьков, 1982.– С. 200–202.
7. *Грищенко В. И., Резников В. А.* Применение аутокрови, облученной УФ лучами, для лечения воспалительных заболеваний наружных половых органов // Акушерство и гинекология.– 1983.– № 9.– С. 82–84.


Поступила 09.04.2002

women. Simultaneously a complete normalisation of leukocytic enzymes and glycogen content occurred in these patients. Along with that, there was the normalisation of general state in main group's patients after treatment course finishing and quite complete disappearance of anatomic changes in uterine appendages. One discharged from the hospital 83 women (86.4%) with the diagnosis "healthy" and only 13 (13.6%) with slightly manifested residual phenomena of salpingo-oophoritis. Disease relapses within 2 years after discharge were recorded only in 10 women (10.4%) in the main group.

Thus, UV irradiated autoblood, causing a favourable effect on an organism's immunological reactivity and intracellular metabolism, in a total complex of antiinflammatory therapy, contributes to more complete recovery.

UV irradiated autoblood can be recommended in a total complex of therapy of acute primary and aggravated chronic salpingo-oophoritis.

When you have the corresponding apparatus for blood irradiation, this procedure is quite simple and can be used in any obstetrical and gynaecological hospital.

## REFERENCES


1. *Verkin B. I., Grischenko V. I., Murinets-Markevich B. N. et al.* Apparatus for cryosurgery and gynaecology // Meditsinskaya tekhnika.– 1977.– № 1.– P. 30–32.
2. *Verkin B. I., Grischenko V. I., Murinets-Markevich B. N. et al.* Cryogenic technics in gynaecological practice // Meditsinskaya tekhnika.– 1978.– № 2.– P. 28–32.
3. *Grischenko V. I., Grishina O. A., Snurnikov A. S., Murinets-Markevich B. N.* Methods of local low temperature effect // Problems of Cryobiology.– 2001.– № 2.– P. 92–100.
4. *Grischenko V. I.* Hypothermia and cryosurgery in obstetrics and gynaecology.– M.: Meditsina, 1974.– 280 p.
5. *Grischenko V. I., Murinets-Markevich B. N., Nosov M. E. et al.* Obstetrical cryogenic apparatus // Meditsinskaya tekhnika.– 1983.– № 1.– P. 56–58.
6. *Grischenko V. I., Reznikov V. A.* Functional activity of T-lymphocytes in patients with inflammatory process of genitals at a combined treatment with applying physiotherapeutic methods // Non-medicamentous methods of treatment in clinical medicine: Proc. of reports of Regional Conference.– Kharkov, 1982.– P. 200–202.
7. *Grischenko V. I., Reznikov V. A.* Application of UV-irradiated blood for treating inflammatory diseases of external genitals // Akusherstvo i ginekologiya.– 1983.– № 9.– P. 82–84.


Accepted in 09.04.2002



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 612: 57.085: 612.1+612.111

# Влияние гипертонических сред и барбитуратов на транспорт анионов в эритроцитах человека

Н. В. БОНДАРЕНКО, В. В. РАМАЗАНОВ

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



UDC 612: 57.085: 612.1+612.111

# Effect of Hypertonic Media and Barbiturates on Transport of Anions in Erythrocytes

N. V. BONDARENKO, V. V. RAMAZANOV

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

Мембрана эритроцитов характеризуется наличием мощной системы анионного транспорта. Основа этой системы – белок полосы 3, который участвует в поддержании кислотно-щелочного равновесия и является основным структурным белком, соединяющим плазматическую мембрану и цитоскелет [1].

Экспериментально активность канала анионного транспорта может быть изменена рядом ингибиторов: спиртами, анестетиками, специфическими ингибиторами (например, дипиридамолом). Влияние анестетиков проявляется в их взаимодействии с анулярными фосфолипидами микроокружения канала: их переход из состояния геля в состояние жидкого кристалла способствует переходу канала в неактивное состояние [3]. Ингибирование транспортных процессов дипиридамолом происходит при его связывании непосредственно с белком полосы 3 [4].

Цель данной работы – анализ совместного влияния неспецифических ингибиторов анионного транспорта (барбитала и фенобарбитала) и специфического ингибитора (дипиридамола) в изотонической и гипертонической средах. В работе были использованы эритроциты донорской крови группы II. Эритроциты получали путем 4-кратного центрифугирования в растворе, содержащем 90 мМ KCl, 45 мМ NaCl, 44 мМ сахарозы, 2 мМ глюкозы, 10 мМ триса ($pH = 7,8$) с последующим их отмыванием физиологическим раствором ($pH$ полученных эритроцитов 6,9–7,1). Осадок клеток (50 мкл) комбинировали с 2 мл среды измерения, анестетиками и дипиридамолом в термостатируемой ячейке ($t = 37$ °C) с $pH$ электродом. В качестве экспериментальных сред использовали растворы 120 мМ $Na_2SO_4$; 0,5 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$; 0,86 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$. Изменения $pH$ суспензии эритроцитов фиксировались самописцем.

Membrane of erythrocytes is characterised by the presence of powerful system of anion transport. The base of this system is band 3 protein, participating in maintaining acid-alkaline balance and is main structural protein, connecting plasmatic membrane and cytoskeleton [1].

Experimentally the activity of channel of anion transport can be changed by some inhibitors: alcohols, anaesthetics, specific inhibitors (e.g. dipyridamole). The effect of anaesthetics manifests in their interaction with anular phospholipids of channel microenvironment: their transition from the state of gel to the one of liquid crystal contributes to the channel transition into inactive state [3]. Inhibiting of transport processes by dipyridamole occurs during its binding directly with band 3 protein [4].

The aim of given work is the analysis of joint effect of non-specific inhibitors of anion transport (barbital and phenobarbital) and specific inhibitor (dipyridamole) in isotonic and hypertonic media. In the work we used erythrocytes of the II group of donor's blood. Erythrocytes were obtained by 4-fold centrifugation in the solution, containing 90 mM KCl, 45 mM NaCl, 44 mM sucrose, 2 mM glucose, 10 mM tris ($pH = 7.8$) with following their washing-out of physiological solution ($pH$ of obtained erythrocytes 6.9–7.1). Cell sediment (50 μl) was combined with 2 ml of measurement medium, anaesthetics and dipyridamole in thermostating well ($t = 37$ °C) with $pH$ electrode. Experimental media were the solutions as follows: 120 mM $Na_2SO_4$; 0.5 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$; 0.86 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$. $pH$ changes of erythrocyte suspension were fixed with the recorder.

Exchange of intracellular chloride to extracellular sulfate in non-buffered medium is consequently accompanied by the phases of oxidation and alkalisation, i.e. proton transport into a cell and out of it [2]. The



Матеріал, захищений авторським правом

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в незабуференной среде сопровождается последовательно фазами закисления и защелачивания, т.е. транспортом протонов в клетку и из клетки [2]. Скорость входа и выхода протонов характеризует степень активности канала анионного транспорта.

Как следует из полученных результатов (табл. 1 и 2), наличие анестетиков в среде измерения ингибирует транспорт протонов как в клетку, так и из клетки. Более существенно ингибирование выражено для транспорта протонов из клеток (табл. 1). При этом ингибирование фенобарбиталом больше по сравнению с ингибированием барбиталом, внесенном в тех же концентрациях.

Сочетание в среде измерения анестетиков и дипиридамола существенно повышает уровень ингибирования транспортных процессов. При этом наибольшее увеличение ингибирования (в 2,9 раза) наблюдается в 120 мМ $Na_2SO_4$ для транспорта протонов из клетки (табл. 1). Увеличение ингибирования не зависит от того, какой анестетик (барбитал или фенобарбитал) сочетался с дипиридамолом.

Таким образом, сочетанное использование анестетиков и специфического ингиби-

**Таблица 1**

**Процент ингибирования дипиридамолом транспорта протонов из клетки в изотонической и гипертонической средах в присутствии анестетиков (барбитала и фенобарбитала)**

| Среда измерения | Ингибитор | Контроль | Барбитал $2,4 \cdot 10^{-3}$ М | Фенобарбитал $2,4 \cdot 10^{-3}$ М |
|---|---|---|---|---|
| 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 38 | 54 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 26 | 72 | 77,5 |
| 0,5 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 57 | 63 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 64 | 85 | 90 |
| 0,86 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 51 | 63 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 74 | 87 | 88 |

**Таблица 2**

**Процент ингибирования дипиридамолом транспорта протонов в клетку в изотической и гипертонических средах и в присутствии анестетиков (барбитала и фенобарбитала)**

| Среда измерения | Ингибитор | Контроль | Барбитал $2,4 \cdot 10^{-3}$ М | Фенобарбитал $2,4 \cdot 10^{-3}$ М |
|---|---|---|---|---|
| 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 22 | 42 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 57,7 | 78 | 79 |
| 0,5 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 44 | 59 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 72 | 84,5 | 90 |
| 0,86 М сахарозы + 120 мМ $Na_2SO_4$ | Контроль | — | 32,3 | 45 |
| | Дипиридамол $3 \cdot 10^{-4}$ М | 76,5 | 83 | 88 |

**Table 1**

**Percentage of inhibiting of proton transport dipyridamole out of a cell in isotonic and hypertonic media and in the presence of anaesthetics (barbital and phenobarbital)**

| Measurement medium | Inhibitor | Control | Barbital $2.4 \cdot 10^{-3}$ M | Phenobarbital $2,4 \cdot 10^{-3}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 38 | 54 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 26 | 72 | 77.5 |
| 0.5 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 57 | 63 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 64 | 85 | 90 |
| 0.86 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 51 | 63 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 74 | 87 | 88 |

**Table 2**

**Percentage of inhibiting of proton transport into a cell in isotonic and hypertonic media and in the presence of anaesthetics (barbital and phenobarbital)**

| Measurement medium | Inhibitor | Control | Barbital $2.4 \cdot 10^{-3}$ M | Phenobarbital $2,4 \cdot 10^{-3}$ M |
|---|---|---|---|---|
| 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 22 | 42 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 57.7 | 78 | 79 |
| 0.5 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 44 | 59 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 72 | 84.5 | 90 |
| 0.86 M sucrose + 120 mM $Na_2SO_4$ | Control | — | 32.3 | 45 |
| | Dipyridamole $3 \cdot 10^{-4}$ M | 76.5 | 83 | 88 |

rate of entering and releasing of protons characterises the degree of activity of anion transport channel.

As the obtained results show (Table 1 and 2) the presence of anaesthetics in the measurement medium inhibits the proton transport both into a cell and out of it. Inhibiting was more manifested for the transport of protons out of cells (Table 1). In this case inhibiting by phenobarbital is higher when comparing with the one with barbital, introduced under the same concentration.

Combination in the measurement medium of anaesthetics and dipyridamole considerably increases the level of inhibiting the transport processes. In this case the highest increase in inhibition (in 2.9 times) is observed in 120 mM $Na_2SO_4$ for the transport of protons out of cells (Table 1). An increase in inhibition does not depend on the type of anaesthetic (barbital or phenobarbital) was combined with dipyridamole.

Thus a combined usage of anaesthetics and specific inhibitor of anion transport testifies to their additive action. This points to that barbiturates, when interacting with an-



Матеріал, захищений авторським правом

тора анионного транспорта свидетельствует об их аддитивном действии. Это указывает на то, что барбитураты, взаимодействуя с анионным каналом, не изменяют блокирующей силы дипиридамола.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Брин В. Б., Вартанян И. А., Данияров С. Б. и др.* Основы физиологии человека: Учеб. для высших учебных заведений / Под ред. Б. И. Ткаченко.– СПб., 1994.– Т. 1.– 567 с.
2. *Рамазанов В. В., Лупилова Н. А., Тодрин А. Ф., Бондаренко Т. П.* Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии.– 1999.– № 4.– С. 34–41.
3. *Lee A. G.* Interaction between phospholipids and barbiturates // Biochim. Biophys. Acta.– 1976.– 455.– P. 102–108.
4. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent assosiation of dipyridamole with a stilbene disulfonate site on the band 3 protein // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979(2).– P. 193–207.


ionic channel, do not change a blocking strength of dipyridamole.

## REFERENCES


1. *Brin V. B., Vartanyan I. A., Daniyarov S. B. et al.* Bases of human physiology: Manual for higher / Ed. by B. I. Tkachenko.– SPb., 1994.– V. 1.– 567 p.
2. *Ramazanov V. V., Lupilova N. A., Todrin A. F., Bondarenko T. P.* Osmotic modification of proton transport in erythrocytes in sulfate medium // Problems of Cryobiology.– 1999.– № 4.– P. 34–41.
3. *Lee A. G.* Interaction between phospholipids and barbiturates // Biochim. Biophys. Acta.– 1976.– 455.– P. 102–108.
4. *Legrum B., Passow H.* Inhibition of inorganic anion transport across the human red blood cell membrane by chloride-dependent assosiation of dipyridamole with a stilbene disulfonate site on the band 3 protein // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979(2).– P. 193–207.



УДК 612.592: 547.42: 611.013: 612.111.11

UDC 612.592: 547.42: 611.013: 612.111.11


# Влияние низких температур, глицерина и 1,2-пропандиола на термоденатурацию фетального гемоглобина


Е. В. ОНИЩЕНКО, Н. Н. ТИМЧЕНКО

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


# Effect of Low Temperatures, Glycerol and 1,2-Propane Diol on Thermodenaturation Of Fetal Hemoglobin


E. V. ONISCHENKO, N. N. TIMCHENKO

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


Интерес исследователей к проблеме криоконсервирования кордовой крови связан с тем, что использование ее элементов открывает новые терапевтические возможности. Известно, что по некоторым биофизическим характеристикам (по динамической структуре цитоплазмы, характеристикам мембраносвязанных белков и т.п.) эритроциты из кордовой крови отличаются от эритроцитов взрослого донора. Одной из причин наблюдаемых отличий является высокое содержание в эритроцитах кордовой крови фетального гемоглобина (HbF), первичаня структура которого отличается от структуры гемоглобина А (HbA), присутствующего в клетках взрослых доноров. Термодинамические характеристики HbF практически не изучены, но можно ожидать, что они будут отличаться от таковых для гемоглобина А. Известно, что температура денатурации HbF ниже, чем HbA, однако не известны термодинамические параметры этого перехода. Отсутствуют данные о влиянии на этот белок замораживания, криопротекторов, что, несомненно, может представить интерес при разработке метода хранения самого белка или содержащих его клеток.

The interest of investigators to the problem of cord blood cryopreservation is related to the fact, that the usage of its elements opens new therapeutic possibilities. It is known that on some biophysical characteristics (dynamic structure of cytoplasm, characteristics of membrane-bound proteins etc.) the erythrocytes of cord blood differ from those of an adult donor. One of the causes of observed differences is a high content in cord blood erythrocytes of fetal haemoglobin (HbF), primary structure of which differs from that of haemoglobin A (HbA), being in the cells of adult donors. Thermodynamic characteristics of HbF are not practically studied, but one can expect that they will differ from those for haemoglobin A. It is known that the temperature of denaturation of HbF is lower than in HbA, however thermodynamic parameters of this transition are unknown. There are no data on the effect on this protein of freezing, cryoprotectants, that obviously can be of some interest when developing the method of storage of the protein itself or containing it cells. In this connection the aim of this work was to investigate thermodynamic parameters of denaturation of the transition of fetal haemo-




Матеріал, захищений авторським правом

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение термодинамических параметров денатурации перехода фетального гемоглобина в растворах, содержащих 1,2-пропандиол и глицерин, до и после замораживания-отогрева.

Фетальный гемоглобин выделяли из отмытых физиологическим раствором эритроцитов кордовой крови. Гемоглобин А, находящийся в гемолизате, отделяли путем денатурации 1,14 М КОН и осаждали сульфатом аммония. Полученный раствор HbF подвергался очистке методом гель-фильтрации на сефадексе G-75. Исследование его структурных изменений проводили при помощи адиабатического сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4. Для этого снимали термограммы водных растворов фетального гемоглобина без добавок криопротекторов и добавками глицерина или 1,2-пропандиола до 30 масс. %. Из полученных термограмм находили температуру и теплоту денатурации HbA.

Показано, что однократное охлаждение раствора HbF до –196 °С и последующий нагрев смещают температурные максимумы денатурации HbF в сторону низких температур, а значения площадей под калориметрическими кривыми процесса денатурации уменьшаются. Эти факты указывают на то, что процесс охлаждения-нагрева приводит к некоторому снижению термостабильности молекул гемоглобина. Добавление к растворам гемоглобина 1,2-пропандиола и глицерина приводит к значительному росту энтальпии и изменению формы кривой денатурации, однако в присутствии 1,2-пропандиола на термограммах регистрируется небольшое снижение температуры денатурации, в то время как при добавлении глицерина существенных отличий в температурах денатурации HbF не регистрируется.

Полученные результаты объясняются изменением сольватной оболочки биополимеров. Благодаря наличию гидроксильных групп молекулы глицерина и 1,2-пропандиола способны занимать часть сольватной оболочки HbF с сопутствующим изменением структуры и энергетических параметров макромолекулы, поскольку структура макромолекулы в растворе, как известно, поддерживается растворителем в ближайшем ее окружении. Стабилизация происходит благодаря водородным связям между неэлектролитами и биополимерами, причем неэлектролиты действуют как заменители воды, хотя эффекты действия растворителя не обязательно являются монотонной функцией состава растворителя.

globin in the solutions, containing 1,2-propane diol and glycerol before and after freeze-thawing.

Feta l haemoglobin was isolated from cord blood erythrocytes washed-out in physiological solution. Haemoglobin A, being present in hemolysate was isolated by denaturation 1.14 M KOH and sedimentated by ammonium sulphate. The resulted solution of HbF was purified by the method of gel-filtration with Sephadex G-75. The study of its structural changes was performed by adiabatic scanning microcalorimeter DASM-4. With this aim thermogrammes of aqueous solutions of fetal haemoglobin were recorded without adding cryoprotectants and with adding of glycerol or 1,2-propane diol up to the mass %. From obtained thermogrammes the temperature and heat of denaturation of HbA were found.

It has been shown, that single cooling of HbF solution down to –196 °C and following heating shift the temperature maximums of HbF to the side of low temperatures and the values of areas under calorimetric curves of denaturation process reduce. These facts point, that the cooling-heating process results in some decrease in thermostability of haemoglobin molecules. Adding to the solutions of haemoglobin of 1,2- propane diol and glycerol results in a significant growth of enthalpy and change in the shape of denaturation curve, but in the presence of 1,2-propane diol on thermogrammes a slight reduction of denaturation temperature is recorded, meanwhile when adding glycerol no considerable differences in denaturation temperatures of HbF were registered.

Obtained results are explained by the change in solvate membrane of biopolymers. Due to the presence of hydroxyl groups the molecules of glycerol and 1,2-propane diol are capable of taking some part of HbF solvate membrane with following change in structure and energetic parameters of macromolecule, since the structure of macromolecule in the solution, as it is known, is supported by solvent in its closest environment. Stabilisation occurs due to hydrogen bonds between non-electrolytes and biopolymers, and in this case non-electrolytes act as water substitutes, though the solvent effects not necessarily are monotonous function of the solvent composition.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 616.089.843: 615.361.441.014.41: 57.085.1

UDC 616.089.843: 615.361.441.014.41: 57.085.1

# Влияние трансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы на содержание нуклеиновых кислот в печени кроликов

Н. А. ВОЛКОВА, Г. А. БОЖОК, Н. М. АЛАБЕДАЛЬКАРИМ, Т. П. БОНДАРЕНКО
*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

# Transplantation Effect of Thyroid Gland's Cryopreserved Organ Culture on the Content of Nucleic Acids in Rabbit's Liver

N. A. VOLKOVA, G. A. BOZHOK, N. M. ALABEDALKARIM, T. P. BONDARENKO
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Гормоны щитовидной железы регулируют процессы, происходяшие в клетках, включая белковый, углеводный и липидный обмен. Один из таких аспектов действия тиреоидных гормонов на клеточном уровне связан с регуляцией синтеза нуклеиновых кислот (НК) [1, 3], в частности трийодтиронин и тироксин ускоряют синтез ядерной, митохондриальной и цитоплазматической РНК в печени, почках, гипофизе и других органах и тканях. Однако вопрос о влиянии трансплантации щитовидной железы на содержание НК остается открытым. В связи с этим мы провели изучение влияния трансплантации органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят (ОКЩЖНП) на содержание НК в печени кроликов с экспериментальным гипотиреозом.

Гормональную недостаточность у кроликов моделировали тотальной тиреоидэктомией (ТЭ). На 21-е сутки после ТЭ животным была произведена ксенотрансплантация криоконсервированной и рекультивированной ОКЩЖНП [2]. Контролем служили ложнооперированные животные. На 120-е сутки после трансплантации животные были декапитированы с использованием эфирного наркоза, выделяли печень и определяли в ней содержание НК методом фракционирования по Шмидту и Тангаузеру с последующей спектрофотометрией [4]. Белок в образцах гомогената определяли по методу Бредфорда [5]. Результаты статистически обрабатывали с помощью $t$-критерия Стьюдента.

Полученные результаты (рисунок) свидетельствуют, что ТЭ приводила к снижению уровня НК на 48% ($p < 0{,}05$) относительно контрольной группы животных. При трансплантации нативной ОКЩЖНП отмечается достоверное снижение содержания НК в печени на 68% относительно контрольной группы животных ($p < 0{,}05$). У животных с трансплантацией размороженной ОКЩЖНП не наблюдалось отличий в содержании НК относительно животных, которым не была произведена

Thyroid gland's hormones regulate the processes, occurring in cells, including protein, carbohydrate and lipid metabolism, one of such aspects of thyroid hormones' effect at cellular level is related to the regulation of synthesis of nucleic acids (NA) [1, 3], in particular, triiodothyronine and thyroxin accelerate the synthesis of nucleic, mitochondrial and cytoplasmic RNA in liver, kidneys, hypophysis and other organs and tissues. However this question on the effect of thyroid gland's transplantation on NA content has remained open. In this connection we performed the investigation of the transplantation effect of newborn piglets' thyroid gland organ culture (NPTGOC) on NA content in rabbit's liver with experimental hypothyrosis.

Hormonal insufficiency in rabbits was modeled by means of total thyroidectomy (TE). To the 21st day after thyroidectomy the xenotransplantation of cryopreserved and recultured NPTGOC was performed to animals [2]. Pseudo-operated animals served as the control. To the 120th day after transplantation the animals were decapitated using the ether anesthesia, liver was isolated and the NA content was determined in it using the method of fractionating by Schmidt and Thannhauser with the following spectrophotometry [4]. Protein in homogenate samples was determined by Bredford method [5]. Results were statistically processed by means of Student's $t$-criterion.

The results obtained (Figure) testify to the fact, that TE resulted in a decrease in NA level by 48% ($p < 0.05$) in respect of the control group of animals. When transplanting native NPTGOC a statistical and significant NA reduction in liver by 68% in respect of the control group of animals ($p < 0.05$) was observed. In the animals with frozen-thawed NPTGOC transplantation no differences in NA content were observed in respect of animals without transplantation. However when transplanting recultured NPTGOC a considerable and true increase by 59% in RNA content ($p < 0.05$) in respect to TE animals was noted.

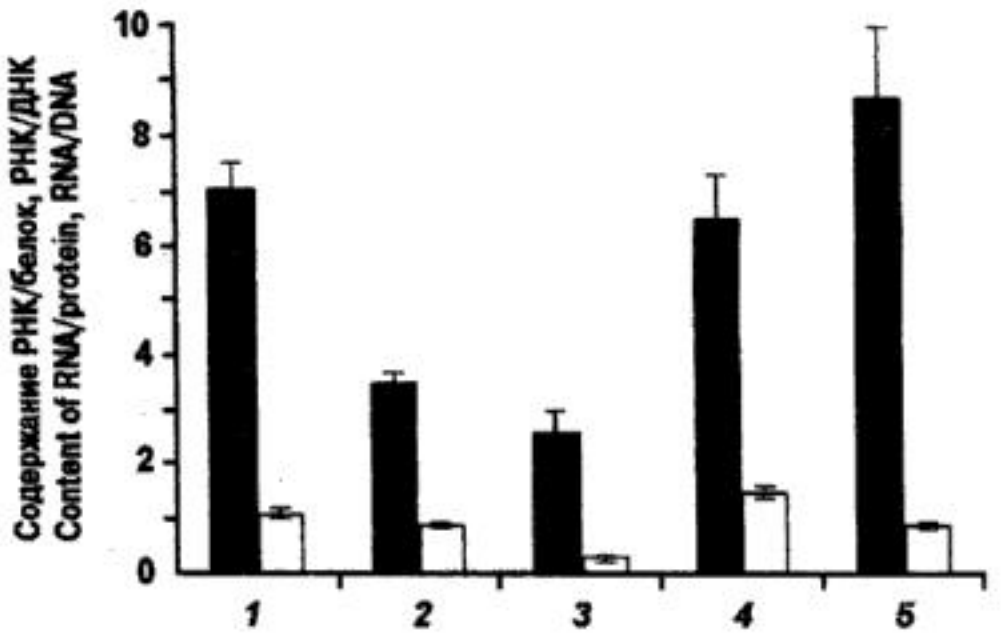


Матеріал, захищений авторським правом

трансплантация. Однако при трансплантации рекультивированной ОКЩЖНП отмечено достоверное увеличение на 59% в содержании РНК ($p < 0,05$) относительно ТЭ животных.

Исходя из данных [3, 6], центральным источником формирования пула Т3 в клетке служит Т4, при дейодировании которого и образуется в организме основной фонд трийодтиронинов. Процесс конверсии, осуществляемый в основном в печени и почках, возможно, и является основным звеном механизма оптимизации тиреоидного статуса организма. Как известно, из 250 белков, синтез которых выявлен в печени, по крайней мере, 19 контролируют Т3, подтверждением чему служит зависимость уровня соответствующих 19 мРНК от степени насыщения рецепторного аппарата гепатоцитов этим гормоном [1, 4].

Результаты исследований [2] свидетельствуют, что к 120-м суткам после трансплантации криоконсервированной ОКЩЖНП стабилизируется уровень тиреоидных гормонов в крови экспериментальных животных. Это, вероятно, связано с тем, что функционирование ОКЩЖНП нормализует процессы метаболизма в организме, которые были нарушены вследствие ТЭ, а именно запуск механизма дейодирования в периферических органах. Таким образом, трансплантация криоконсервированной ОКЩЖНП приводит к нормализации содержания НК в печени кроликов после тотальной ТЭ, что дает предпосылку для прогнозирования дальнейшего взаимодействия гормона с этими структурами ткани.




Содержание НК в печени кроликов на 120-е сутки после трансплантации ОКЩЖНП: *1* – контроль; *2* – тиреоидэктомия; *3* – нативная культура; *4* – размороженная культура; *5* – рекультивированная культура; ■ – РНК/белок; □ – РНК/ДНК.

NA content in rabbits' liver to the 120th day after NPTGOC transplantation: *1* – the control; *2* – thyroidectomy; *3* – native culture, *4* – frozen-thawed culture; *5* – recultured culture; ■ – RNA/protein; □ – RNA/DNA.

According to the data [3, 6] T4 serves the central source of pool T3 formation in a cell, at the deiodination of which the main fund of triiodothyronines is formed. The process of conversion, proceeding mainly in liver and kidneys is possibly principle link of the mechanism of an organism's thyroid status optimisation. As it is known among 250 proteins which synthesis was revealed in liver, at least 13 controlled T3, that was confirmed by the dependence of the level of corresponding 19 mRNA on saturation degree of hepatocytes' receptor apparatus by this hormone [1, 4].

The results of the investigations [2] testify to the fact, that to the 120th day after cryopreserved NPTGOC transplantation there is the stabilisation of thyroid hormone level in experimental animals' blood. This is probably related to the fact, that NPTGOC functioning normalises the metabolism processes in an organism, which were disordered due to TE, namely the triggering of deiodination mechanism in peripheral organs. Thus, the transplantation of cryopreserved NPTGOC results in normalising NA content in rabbits' liver after total TE, that gives the premise to forecast further hormone interaction with these tissue structures.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Баева Е. В.* Влияние трийодтиронина на синтез нуклеиновых кислот иммуноцитами в культуре клеток // Пробл. эндокринологии.– 1989.– № 1.– С. 79–83.
2. *Бондаренко Т. П., Волкова Н. А., Луговой С. В.* Уровень тиреоидных гормонов в плазме крови кроликов при ксенотрансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы неонатальных поросят // Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины: Тез. докл.– Харьков, 2001.– С. 41–42.
3. *Верещагина Г. В., Трапкова А. А.* Некоторые механизмы действия тиреоидных гормонов // Успехи совр. биол.– 1984.– 97, № 3.– С. 447–457.
4. *Мецлер Д.* Биохимия.– М.: Иностр. лит., 1980.– 407 с.
5. *Современные* методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича.– М.: Медицина, 1977.– С. 391.
6. *Туракулов Я. Х., Ташкоджаев Т. П., Артыкбаева Г. М.* Активность конверсии тироксина в трийодтиронин в печени и почках крыс // Пробл. эндокринологии.– 1991.– 37.– № 4.– С. 44–46.


## REFERENCES


1. *Bayeva E. V.* Triiodothyronine effect on nucleic acids' synthesis by immunocytes in cell culture // Problemy endokrinologii.– 1989.– № 1.– P. 79–83.
2. *Bondarenko T. P., Volkova N. A., Lugovoj S. V.* Level of thyroid hormones in rabbits' blood plasm at xenotransplantation of neonatal piglets' thyroid gland cryopreserved organ culture // Achievements and perspectives of cryobiology and cryomedicine development: Abstract of report.– Kharkov, 2001.– P. 41–42.
3. *Vereschagina G. V., Trapkova A. A.* Some mechanisms of thyroid hormones effect // Uspekhi sobremennoj biologii.– 1984.– 97, № 3.– P. 447–457.
4. *Metsler D.* Biochemistry.– M.: Inostrannaya literatura, 1980.– 407 p.
5. *Current* methods in biochemistry / Ed. by V. N. Orekhovich.– M.: Meditsina, 1977.– P. 391.
6. *Turakulov Ya. Kh., Tashkodzhayev T. P., Artykbayeva G. M.* Activity of thyroxin conversion into triiodothyronine in rats' liver and kidneys // Problemy endokrinologii.– 1991.– 37.– № 4.– P. 44–46.





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.352: 576.385: 612.111

UDC 577.352: 576.385: 612.111

# Влияние ингибиторов анионного канала на постгипертонический лизис эритроцитов

О. А. ОЛЕЙНИК, Ф. АБУ-АЛЬ АСАЛЬ, В. В. РАМАЗАНОВ

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

# Effect of Anionic Channel Inhibitors on Erythrocyte Posthypertonic Hemolysis

O. A. OLEYNIK, F. ABU-AL ASSAL, V. V. RAMAZANOV

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

При изучении *pH* зависимости гипотонического гемолиза клеток показано, что по мере снижения *pH* наблюдается повышение уровня повреждения эритроцитов [4]. В то же время постгипертонический лизис клеток не зависит от *pH* среды инкубации [1]. Полагают, что выявленная *pH* зависимость гипотонического гемолиза эритроцитов обусловлена особенностями функционирования анионного переносчика [2].

Цель работы – исследовать влияние ингибиторов анионного канала диизотиоцианостильбендисульфоната натрия (ДИДС) и дипиридамола на гипотонический и постгипертонический лизис эритроцитов человека при изменении *pH* среды инкубации.

В работе использовали эритроциты донорской консервированной крови группы II. Постгипертонический лизис осуществляли перенесением аликвот клеточной суспензии эритроцитов из 3 М раствора NaCl (10 с) в среду, содержащую 135 мМ NaCl и 30 мМ сахарозы, при разных значениях *pH* (5,8; 6,6; 7,4) на 5 мин. Гипотонический лизис эритроцитов регистрировали после 5-минутной инкубации клеток в среде, содержащей 67 ммоль/л NaCl при различных *pH*. Уровень гемолиза эритроцитов измеряли на спектрофотометре СФ-4А с проточной кюветой. Эритроцитарные белые тени получали из нативных (контрольных) эритроцитов и из клеток, которые подвергали действию гиперконцентрированного раствора NaCl (3 М). Степень поляризации флуоресценции дипиридамола измеряли на спектрофлуориметре HITACHI MPF-2A. Содержание белка в белых тенях эритроцитов определяли методом Лоури.

Полученные результаты показывают, что снижение *pH* среды сопровождается ростом уровня гипотонического (рис. 1, *а*), но не постгипертонического лизиса (рис. 1, *б*). Присутствие ингибиторов анионного канала ДИДС или дипиридамола в лизирующей среде вызывает редукцию *pH* зависимости гипотонического гемолиза.

Эритроциты, помещенные в гипотонические среды, набухают. В наших экспериментальных ус-

When studying the *pH*-dependence of cells' hypotonic hemolysis it is shown that an increase in erythrocytes damage is observed at *pH* decreasing[4]. At the same time, hypertonic lysis of cells does not depends on *pH* of incubation medium [1]. One assumes, that revealed *pH* dependence of erythrocytes' hypotonic hemolysis is caused by the peculiarities of anionic carrier functioning [2].

The aim of this work is to study the effect of anionic channel inhibitors, sodium diisothiocyanostilbenesulfonate (DIDS) and dipirydamole, on hypotonic and posthypertonic lysis of human erythrocytes at different *pH* of incubation medium.

Investigations were carried in erythrocytes of donor preserved blood (second group). Posthypertonic lysis was performed by transferring of erythrocytes suspension aliquots from 3 M NaCl solution (10 s) to the medium, containing 135 mM of NaCl and 30 mM of sucrose, at various *pH* values (5.8, 6.6, 7.4) for 5 min. Hypertonic lysis of erythrocytes was registered after 5 min incubation of cells in the medium, containing 6 mM/l of NaCl at various *pH*. Erythrocyte hemolysis value was measured with SF-4A spectrophotometer with flowing well. Erythrocyte white ghosts were obtained from native (control) erythrocytes and from cells, treated with hyperconcentrated NaCl solution (3 M). Extent of dipyridamole fluorescence polarisation was measured with HITACHI MPF-2A spectrofluorimeter. Protein content in erythrocyte white ghosts was measured with Louri method.

Obtained results show that increase of medium *pH* is accompanied by an increase of hypotonic lysis value, but not hypertonic one. Presence of anionic channel inhibitors, DIDS or pirydamole in lysis medium causes a reduction of *pH* dependence of hypotonic hemolysis.

Erythrocytes swell when being placed into hypotonic media. In our experimental conditions the cells are getting bigger both because of water entering into cells and of re-distribution of chlorine ions into erythrocytes. Since we have not changed the medium tonicity, and varied only *pH* values, it is possible to assume, that re-distribution of chlorine ions is the main reason in regulation of erythrocytes osmotic resistance [4, 5]. Contribution of chlorine anions' re-distribution to reaching a critical hemolytic volume becomes essential when decreasing the medium *pH*, when the ratio between intracellular and extracellular chlorine concentration exceeds 1 [2] and cells' osmotic fragility



Матеріал, захищений авторським правом

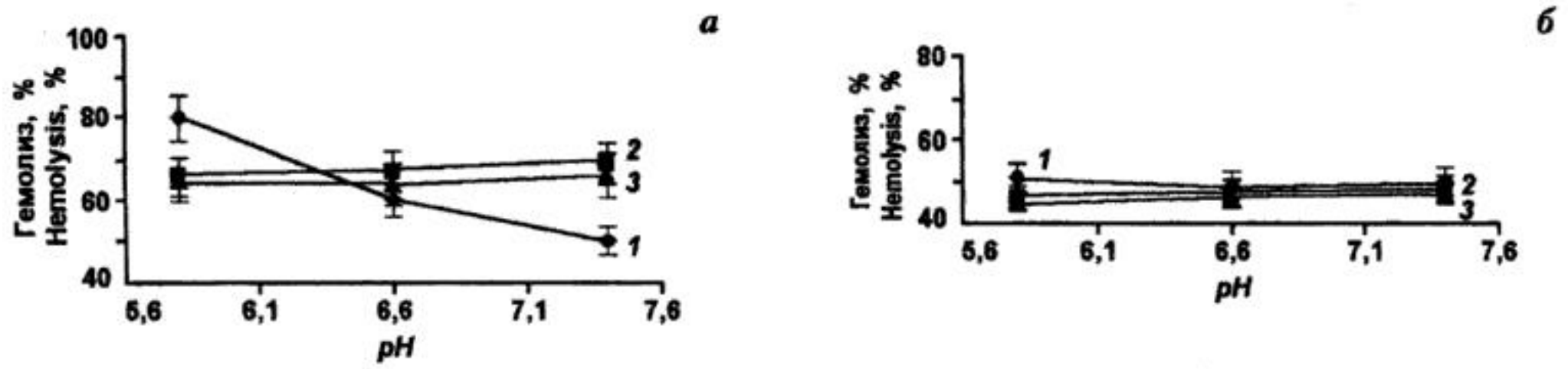



**Рис. 1.** Влияние ДИДС и дипиридамола на уровень гипотонического (*а*) и постгипертонического (*б*) лизиса эритроцитов: *1* – контроль; *2* – ДИДС (5 мкМ); *3* – дипиридамол (20 мкМ).

**Fig. 1.** Effect of DIDS and dipyridamole on level of hypotonic (*a*) and posthypertonic (*б*) lysis of erythrocytes: *1* – control; *2* – DIDS (5 μM); *3* – dipyridamole (20 μM).

ловиях клетки увеличиваются как из-за поступления воды в клетки, так и из-за перераспределения анионов хлора внутрь эритроцитов. Так как тоничность среды не изменяли, а варьировали только значения *pH*, можно предположить, что перераспределение анионов хлора, по-видимому, является решающим в регуляции осмотической устойчивости эритроцитов [4, 5]. Вклад перераспределения анионов хлора в достижении критического гемолитического объема становится существенным при снижении значений *pH* среды, когда отношение внутриклеточной к внеклеточной концентрации хлора превышает единицу [2] и осмотическая хрупкость клеток возрастает (рис. 1, *а*). При постгипертоническом лизисе эритроцитов, когда регидратации предшествует гипертоническое воздействие, отсутствие *pH* зависимости обусловлено, по-видимому, отсутствием перераспределения хлорид-анионов, вследствие чего и не выявляется изменений в уровне гемолиза (рис. 1, *б*).

Для оценки связывания дипиридамола с анионным каналом исследовали поляризацию флуоресценции дипиридамола. Титрование 1 мкМ дипиридамола в флуориметрической кювете белыми тенями эритроцитов приводит к росту степени поляризации флуоресценции данного хромофора (рис. 2, *а* и *б*). При этом не выявляется значитель-

increases (Fig. 1, *а*). During hypertonic lysis of erythrocytes, when rehydration is preceded by hypertonic influence, the absence of *pH* dependence is probably caused by that of chlorine anion's re-distribution, as a result the changes in hemolysis value are not observed (Fig. 1, *б*).

For estimation of dipyridamole bounding with anionic channel we studied the dipyridamole fluorescence polarisation. Titration of 1 μM of dipyridamole in fluorometric well by erythrocyte white ghosts leads to an increase in extent of the chromofore fluorescence polarisation (Fig. 2, *а* and *б*). We have not observed a significant difference between dipyridamole polarisarion both in presence of intact membranes and the ones, obtained from cells preliminarily exposed in 3 M of NaCl (Fig. 2, *а*). Besides, titration of dipyridamole at *pH* 5.8 also reveals no significant difference between the control and posthypertonic ghosts (Fig. 2, *б*). Combination of dipyridamole and membrane suspension with DIDS results in a significant reduction of dipyridamole polarisation extent (≈ 0.1). Introduction of sodium dodecylsulphate (DS-Na) causes the additional reducing of dipiramole fluorescence polarisation value (Fig. 3).

Rehydration is the base of posthypertonic lysis [3]. However, its development depends both on duration of erythrocytes maintaining in hypertonic medium and on its osmolality [1]. It means, that posthypertonic lysis can be revealed only then cell membrane will get a distinct damage at erythrocytes exposure mainly in hypertonic medium. It is possible to say,

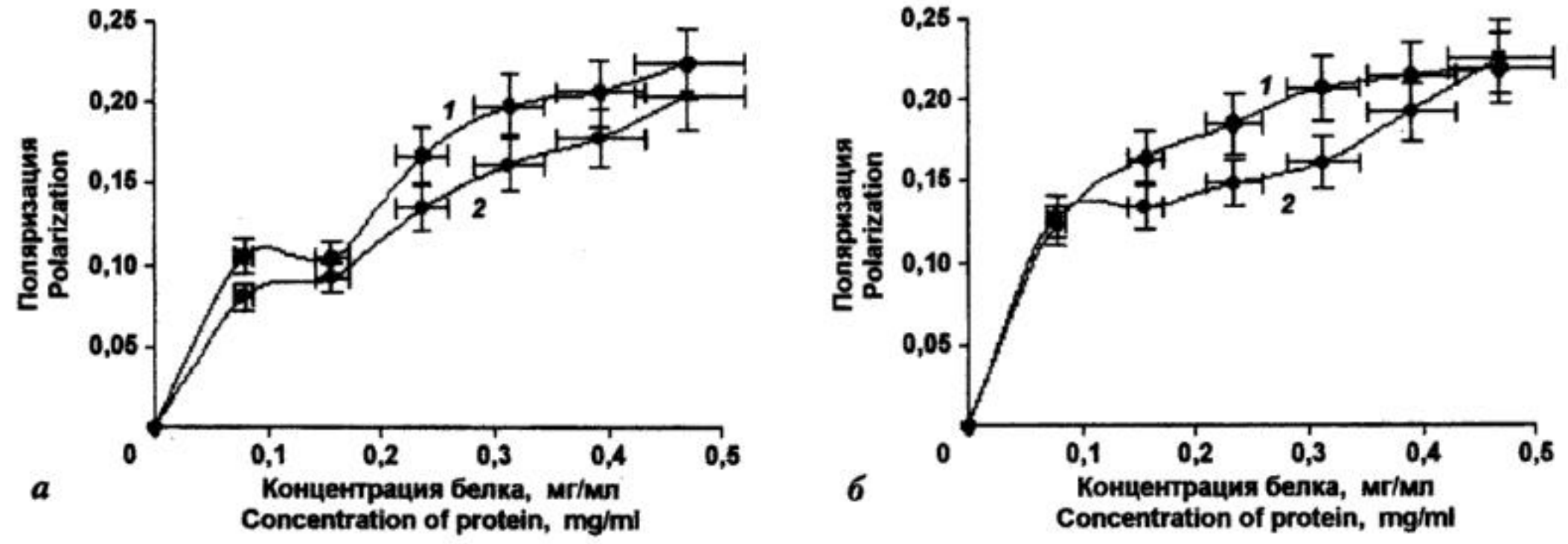



**Рис. 2.** Уровень поляризации флуоресценции дипиридамола при титровании его белыми тенями эритроцитов: *а* – *pH* 7,4; *б* – *pH* 5,8; *1* – контрольные тени; *2* – постгипертонические тени.

**Fig. 2.** Level of dipyridamole fluorescence polarisation at its titration with erythrocyte white ghosts: *а* – *pH* 7.4; *б* – *pH* 5.8; *1* – control ghosts; *2* – posthypertonic ghosts.



Матеріал, захищений авторським правом

ной разницы между уровнем поляризации дипиридамола в присутствии интактных мембран и мембран, полученных из клеток, предварительно экспонируемых в 3 М NaCl (рис. 2, *а*. Кроме того, титрование дипиридамола при *pH* 5,8 также не выявляет значительной разницы между контрольными и постгипертоническими тенями (рис. 2, *б*. Комбинирование дипиридамола и суспензии мембран с ДИДС приводит к значительной редукции степени поляризации дипиридамола (≈ 0,1). Внесение в кювету додецилсульфата натрия (ДСН) вызывает дополнительное уменьшение уровня поляризации флуоресценции дипиридамола (рис. 3).

В основе постгипертонического лизиса лежит регидратация [3]. Однако его развитие зависит как от длительности пребывания эритроцитов в гипертонической среде, так и от осмолярности последней [1]. Это значит, что постгипертонический лизис может проявить себя только тогда, когда мембрана клетки получит определённое повреждение при экспозиции эритроцитов именно в гипертонической среде. Можно сказать, что регидратация при постгипертоническом лизисе является не ведущим, а лишь сопутствующим фактором повреждения. Другими словами, регидратация и образование поры протекают параллельно во времени, тогда как при гипотоническом лизисе гидратация всегда предшествует образованию поры. В пользу этого свидетельствуют полученные результаты, которые показывают, что при сдвиге *pH* в кислую сторону, при котором должно происходить поступление воды и анионов хлора в клетку, уровень постгипертонического лизиса не изменяется (рис. 1, *б*) в отличие от гипотонического (рис. 1, *а*). Как показывают результаты экспериментов по флуоресценции поляризации дипиридамола, анионный переносчик не повреждается гиперконцентрированными растворами NaCl. Надо полагать, что на стадии гипертонической инкубации или в начальный момент регидратации в мембране эритроцитов образуются поры, проницаемые для протонов и анионов хлора. Это приводит к тому, что анионный канал не участвует в изменении уровня регидратации.

Таким образом, ингибиторы анионного канала ДИДС и дипиридамол не оказывают влияния на постгипертонический лизис эритроцитов и снимают *pH* зависимость гипотонического гемолиза.

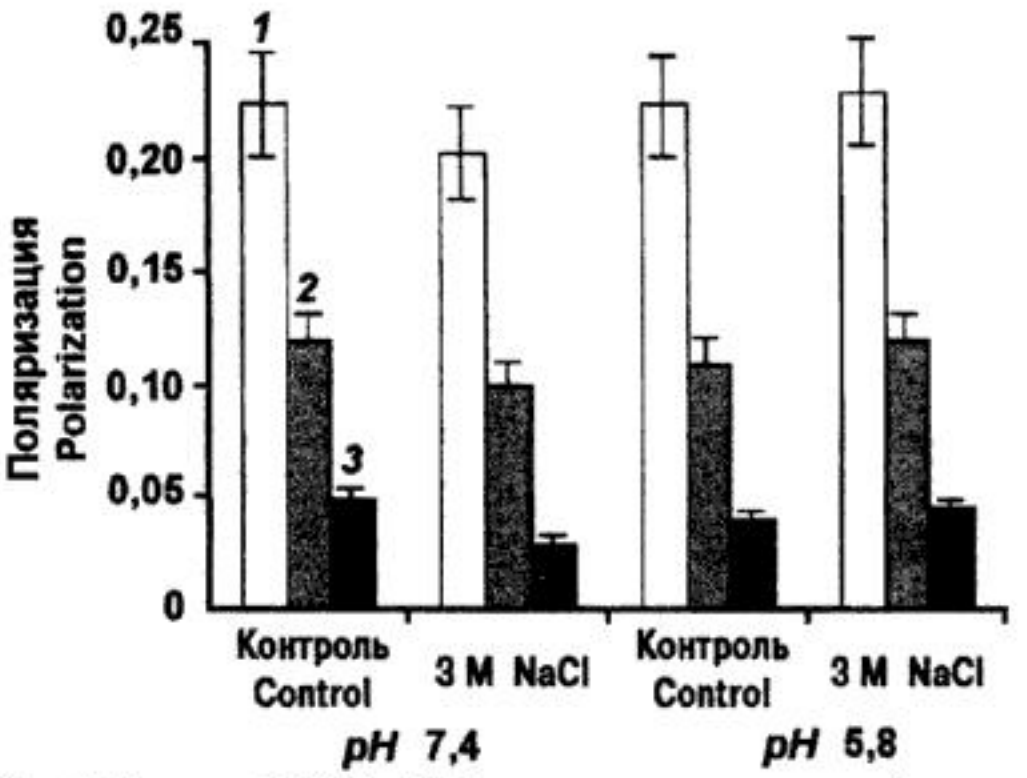



**Рис. 3.** Влияние ДИДС и ДСН на уровень поляризации флуоресценции дипиридамола в присутствии белых теней эритроцитов (концентрация белка 0,47 мг/мл): *1* – контроль; *2* – ДИДС (17 мкМ); *3* – ДСН (5 мкМ).

**Fig. 3**. Effect of DIDS and DS Na on level of dipyridamole fluorescence polarisation in presence of erythrocyte white ghosts (protein concentration is 0.47 mg/ml): *1* – control; DIDS (17 μM); *3* – DS Na (5 μM).

that rehydration at posthypertonic lysis is not the leading factor of damaging, but only the accompanying one. By other words, rehydration and pore formation being simultaneously developed with time, whereas during a hypotonic lysis hydration always precedes the pore formation. In this favor the obtained data showing that at *pH* shift towards an acid side, when the entering of water and chlorine anions should occur, the value of posthypertonic lysis does not change (Fig. 1, *б*) in contrast to hypotonic one (Fig. 1, *а*). The results of experiments on dipyridamole fluorescence polarisation shows that anionic carrier is not damaged by hyperconcentrated NaCl solutions. Probably, at the stage of hypertonic incubation or at initial rehydration moment the pores are formed in erythrocyte membrane, which are permeable for protons and chlorine anions. This leads to non-participation of anionic channel in changing of rehydration level.

Thus, the anionic channel inhibitors, DIDS and dipirydamole, does not affect the posthypertonic lysis of erythrocytes and eliminate the *pH* dependence of hypotonic hemolysis.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Пателаpос С. В.* Влияние моновалентных катионов $Na^+$, $K^+$, $H^+$ на развитие осмотических мембранных повреждений эритроцитов, активируемых ионами $Ca^{2+}$ и $Zn^{2+}$ // Пробл. криобиологии.– 1998.– № 4.– С. 26–30.
2. *Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al.* Stationary ionic states of human red blood cells-consequenses for planing and evaluation of experiments // Studia biophysica.– 1980.– 81, № 2.– P. 43–47.
3. *Rudenko S., Patelaros S.* Cation-sensetive pore formation in regydrated erytrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– 1235.– P. 1–9.
4. *Sato Y., Yamokose H., Susuki Y.* Participation of band 3 protein in hipotonic hemolysis of human erytrocytes // Biol. Pharm. Bull.– 1993.– 16.– № 2.– P. 188–193.
5. *Wessels J., Veerkamp J.* Differences in osmotic behavior of erytrocytes after treatment with electrolyte and non-electrolyte solutions // Biochim. Biophys. Acta.– 1973.– 291.– P. 178–189.


## REFERENCES


1. *Patelaros S. V.* Effect of monovalent cations $Na^+$, $K^+$, $H^+$ to development of erythrocytes osmotic membrane damages, activated by ions $Ca^{2+}$ and $Zn^{2+}$ // Probl. of Cryobiology.– 1998.– № 4.– C. 26–30.
2. *Glaser R., Svetina S., Brumen M. et al.* Stationary ionic states of human red blood cells-consequenses for planing and evaluation of experiments // Studia biophysica.– 1980.– 81, № 2.– P. 43–47.
3. *Rudenko S., Patelaros S.* Cation-sensetive pore formation in regydrated erytrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– 1235.– P. 1–9.
4. *Sato Y., Yamokose H., Susuki Y.* Participation of band 3 protein in hipotonic hemolysis of human erytrocytes // Biol. Pharm. Bull.– 1993.– 16.– № 2.– P. 188–193.
5. *Wessels J., Veerkamp J.* Differences in osmotic behavior of erytrocytes after treatment with electrolyte and non-electrolyte solutions // Biochim. Biophys. Acta.– 1973.– 291.– P. 178–189.





Матеріал, захищений авторським правом

УДК 577.352.462: 611.013.68: 547.42

UDC 577.352.462: 611.013.68: 547.42

# Осмотическое поведение и транспортные характеристики плазматических мембран ядросодержащих клеток кордовой крови человека в гипертонических растворах проникающих криопротекторов

В. С. ХОЛОДНЫЙ

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

# Osmotic Behaviour and Plasmatic Membrane Transport Characteristics of Human Cord Blood Nucleated Cells in Hypertonic Solutions of Penetrating Cryoprotectants

V. S. KHOLODNYY

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

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников используется в терапии при различных патологиях кроветворения (в том числе связанных со злокачественным ростом). Источниками этих клеток являются костный мозг, периферическая кровь и плацентарная/пуповинная кордовая кровь. Кордовая кровь имеет преимущество перед остальными источниками из-за сравнительно низкой иммунореактивности содержащихся в ней иммунокомпетентных клеток и меньшей иммуногенной активности, простых методов получения и достаточно большого количества стволовых клеток и клеток-предшественников [2]. Основным методом при создании запасов этого трансплантационного материала является низкотемпературное хранение. Разработка методов криоконсервирования базировалась главным образом на эмпирическом подходе. Предпосылкой выполнения данной работы послужило предположение, что анализ осмотического поведения клеток в растворах криопротекторов и определение на его основе транспортных характеристик плазматических мембран клеток позволит оптимизировать существующие методы криоконсервирования.

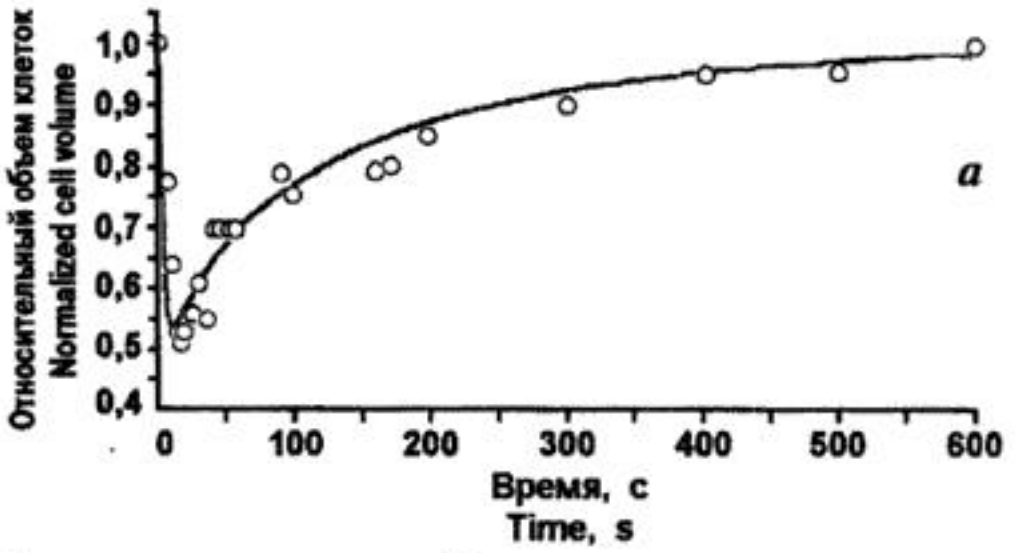
Ядросодержащие клетки кордовой крови человека на глюкозо-цитратном буфере выделяли методом ускоренного осаждения эритроцитов в коллоидных растворах низкой плотности [1, 4]. В работе использовался 1%-й раствор желатина, содержащий сахарозу, глюкозу, цитрат натрия и ЭДТА натрия. Осмотический ответ клеток оценивался анализом изображений клеток, полученных с помощью светового микроскопа при эквилибрации клеточной суспензии в гипертонических растворах проникающих криопротекторов (1 М ДМСО, 1 М 1,2-пропандиола, 1 М глицерина). Для определения коэффициентов проницаемости плазматичес-

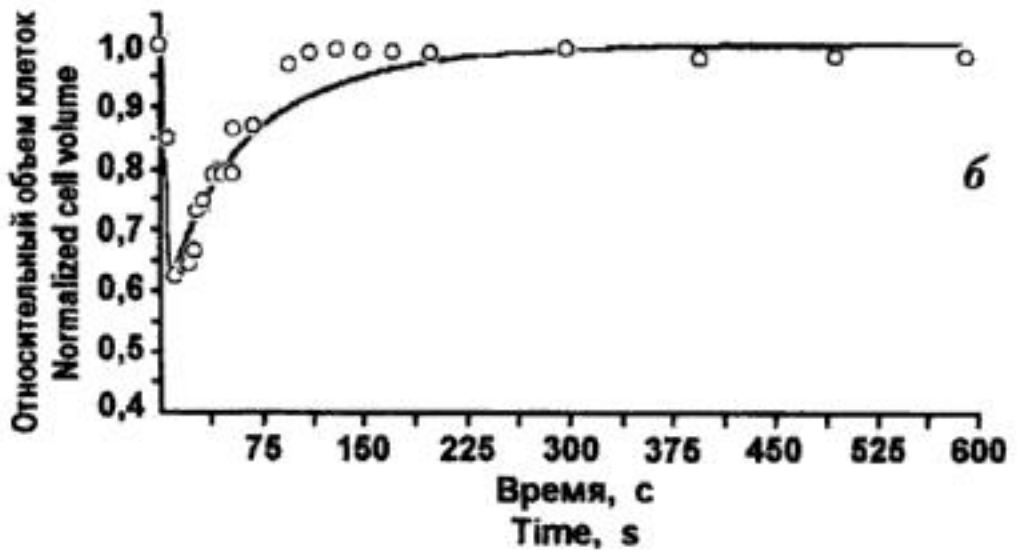
Hemopoietic stem and progenitor cell transplantation has been used to successfully treat a broad spectrum of malignant and non-malignant diseases. Sources of these cells include bone marrow, peripheral blood, and placental/umbilical cord blood. Cord blood has an advantage when comparing with others because of its relatively lower immune cell reactivity and immunogenic activity, simple collecting and separation techniques and quite large amount of stem and progenitor cells [2]. Now the low temperature storage is the main method in creating the banks of this transplantation material. Elaboration of cryopreservation methods was mainly based on empirical approach. The current work is preconditioned upon the hypothesis that more optimal methods for cord blood cryopreservation could be developed from knowledge of cell osmotic behaviour and determined on its base the plasmatic membrane transport characteristics.

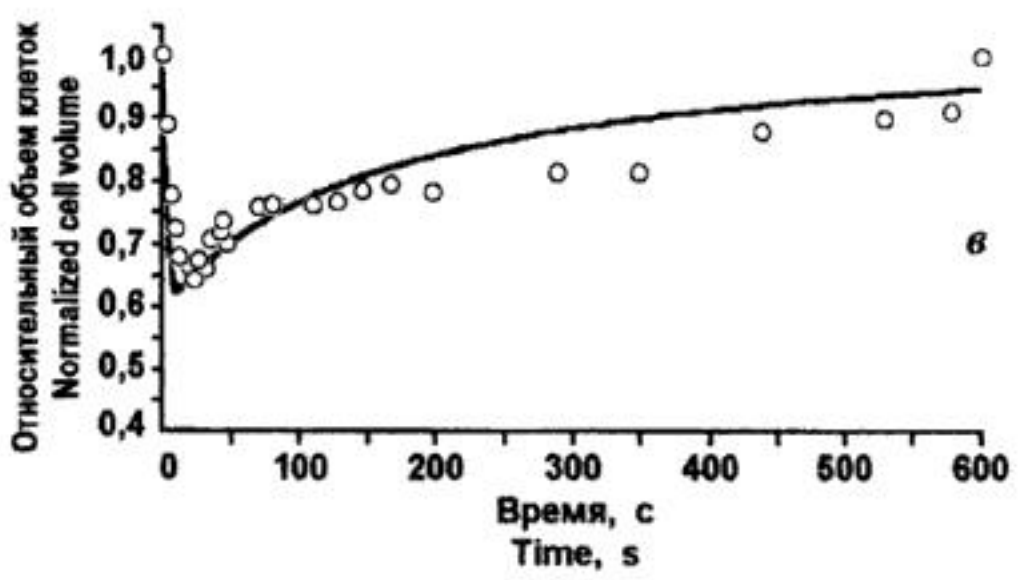
This work was conducted in glucose-citrate buffered cord blood. Nucleated cells were separated by the method of rapid erythrocyte depletion in low density colloid solutions [1, 4]. Containing sucrose, glucose, sodium citrate and sodium EDTA, 1% gelatine solution was used. Individual cell osmotic response was evaluated by analysis of the images, obtained with a light microscope when exposing the cell suspension to abrupt dilution with penetrating cryoprotectants (1 M $Me_2SO$, 1 M 1,2-propane diol (1,2-PD), 1 M glycerol). For determining the plasmatic membrane permeability coefficients the Kedem–Katchalsky mass transport model was used [3], which describes total transmembrane volume flux and permeable solute flux for a ternary solution composed of a permeable solute ($Me_2SO$, 1,2-PD, glycerol) and an impermeable solute



Матеріал, захищений авторським правом




Изменение относительного объема ядросодержащих клеток кордовой крови при 18 °С в растворах: *а* – 1 М ДМСО; *б* – 1 М 1,2-пропандиола; *в* – 1 М глицерина. ○ – экспериментальные данные, сплошная линия – данные, рассчитанные на основе уравнений Кедем–Качальского.

Changes in normalised volume of cord blood nucleated cells at 18 °C as a function of time, following abrupt dilution of: *а* – 1 M $Me_2SO$, *б* – 1 M 1,2-PD; *в* – 1 M glycerol; ○ – experimental data points, solid line – theoretical curve.

ких мембран клеток применяли уравнения Кедем–Качальского [3], описывающие процессы массопереноса между клеткой и многокомпонентным раствором, состоящим из воды, проникающего (криопротектор) и непроникающего вещества (NaCl). Уравнения могут быть использованы для описания изменений в клеточном объеме в зависимости от потоков воды и растворенных веществ.

На рисунке приведены экпериментальные и теоретические зависимости относительного объема ядросодержащих клеток кордовой крови человека диаметром 8–10 мкм от времени экспозиции в 1 М растворах ДМСО, 1,2-пропандиола и глицерина. Время максимальной дегидратации во всех трех случаях составляет 15–18 с, а объем клеток восстанавливается в растворах ДМСО к 140-й, пропандиола – 100-й, а глицерина – к 650-й секунде.

Коэффициенты проницаемости клеточных мембран получены путем совмещения экспериментальных и расчетных зависимостей [5] (рисунок и таблица). Среди исследованных криопротекторов наибольшим коэффициентом проницаемости обладает 1,2-пропандиол, для молекул ДМСО он меньше в 2 раза, а для глицерина – в 9 раз. Коэффициенты проницаемости для молекул воды статистически не отличаются для всех трех случаев.

Полученные данные по коэффициентам проницаемости могут быть использованы при оптимизации существующих методов низкотемпературного консервирования ядросодержащих клеток кордовой крови человека.

**Коэффициенты проницаемости плазматических мембран ядросодержащих клеток кордовой крови для молекул воды ($L_p$) и криопротекторов ($K$) при 18 °С (среднее ± стандартное отклонение).**

| Вид криопротектора | $L_p$, $10^{-13}$ м$^3$/с/Н | $K$, $10^{-7}$ м/с |
|---|---|---|
| ДМСО | 1,45 ± 0,26 | 0,47 ± 0,05 |
| 1,2-пропандиол | 1,32 ± 0,16 | 1,368 ± 0,34 |
| Глицерин | 1,14 ± 0,21 | 0,19 ± 0,04 |

(NaCl). This model can be used for describing the changes in the cellular volume in this solution.

The figure shows experimental and theoretically determined dependencies of normalized volume of cord blood nucleated cells (diameter of 8–10 μm) on time after abrupt dilution with 1 M $Me_2SO$, 1 M 1,2-PD and 1 M glycerol. The time of maximal dehydration is 15–18 s in all three cases, and the recovery of cell volume occurs in the case of $Me_2SO$ to the 140 s, 1,2-PD does 100 s, and glycerol to the 650 s.

The permeability parameters (hydraulic conductivity and permeability coefficient of cryoprotective additive) were obtained by fitting the theoretical curve to the experimental data points (Table and Figure). Among the studied cryoprotectants the permeability coefficient of 1,2-PD is the highest one, this of $Me_2SO$ is twice less, and that for glycerol is nine-fold less. Hydraulic conductivities for each of three cases did not statistically differ from each other.

**Cord blood nucleated cell permeability characteristics: hydraulic conductivity () and cryoprotective additive permeability coefficient ($K$) (mean ± SD), at 18 °C.**

| Cryoprotectant | $L_p$, $10^{-13}$ m$^3$/s/N | $K$, $10^{-7}$ m/s |
|---|---|---|
| $Me_2SO$ | 1.45 ± 0.26 | 0.47 ± 0.05 |
| 1,2-propane diol | 1.32 ± 0.16 | 1.368 ± 0.34 |
| glycerol | 1.14 ± 0.21 | 0.19 ± 0.04 |

The obtained data on permeability parameters could be applied for optimising the existing low temperature preservation protocols for human cord blood nucleated cells.



Матеріал, захищений авторським правом

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Калиниченко Т. А.* Криоконсервирование гемопоэтических клеток кордовой крови для клинического применения: Дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1999.– 189 с.
2. *Broxmeyer H. E.* Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation // Current Opinion in Pediatrics.– 1995.– 7.– P. 47–55.
3. *Kedem O., Katchalsky A.* Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1958.– 27.– P. 229–246.
4. *Perutelli P., Catellani S., Scarso L. et al.* Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery // Vox Sang.– 1999.– 76.– P. 237–240.
5. *Woods E. J., Liu J., Derrow C. W. et al.* Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34$^+$ cells and their application to cryopreservation // J. of Hematother. and Stem Cell Res.– 2000.– 9.– P. 161–173.

## REFERENCES

1. *Kalinichenko T. A.* Cryopreservation of cord blood haemapoietic cells for clinical application: Thesis for obtaining scientific degree of candidate of medical sciences.– Kharkov, 1999.– 189 p.
2. *Broxmeyer H. E.* Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation // Current Opinion in Pediatrics.– 1995.– 7.– P. 47–55.
3. *Kedem O., Katchalsky A.* Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to nonelectrolytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1958.– 27.– P. 229–246.
4. *Perutelli P., Catellani S., Scarso L. et al.* Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery // Vox Sang.– 1999.– 76.– P. 237–240.
5. *Woods E. J., Liu J., Derrow C. W. et al.* Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34$^+$ cells and their application to cryopreservation // J. of Hematother. and Stem Cell Res.– 2000.– 9.– P. 161–173.



УДК 611.013.68: 612.59: 547.42

UDC 611.013.68: 612.59: 547.42


# О девитрификации в суспензиях эритроцитов кордовой крови при охлаждении и нагреве с 1,2-пропандиолом и глицерином


Е. Н. БОБРОВА, А. В. ЗИНЧЕНКО

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


# About Devitrification in Cord Blood Erythrocytes Suspensions When Cooling and Thawing with 1,2-propanediol And Glycerol


E. N. BOBROVA, A. V. ZINCHENKO

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



Фазовые переходы внутри- и внеклеточных растворов являются существенной причиной криоповреждения клеток. Считается, если замораживание клеточных систем медленное, то лед сначала формируется во внеклеточной среде. Это приводит к дегидратации клеток вследствие осмотических эффектов, возникающих при замораживании внеклеточных растворов. Медленное охлаждение способствует тому, что внутриклеточный раствор становится подверженным стеклованию и затвердеванию в аморфном состоянии, хотя клетки могут повреждаться вследствие эффектов растворов. Если охлаждение слишком быстрое, то кристаллизуется внутриклеточный раствор с сопутствующим этому повреждением клеток. При скоростях охлаждения, близких к оптимальным, внутриклеточный раствор стеклуется полностью или почти полностью. Однако такое состояние раствора метастабильно и в нем может развиться кристаллизация (девитрификация), что является причиной повреждения клеток при нагреве.

Phase transitions of intra- and extracellular solutions are significant causes of cell damages. If freezing of cellular systems is considered to be slow, an ice is initially formed in extracellular medium. This results in cell dehydration due to osmotic effects, appearing during freezing of extracellular solutions. Slow cooling promotes to the fact that intracellular solution becomes susceptible to vitrification and solidification in an amorphous state, although the cells can be damaged due to the effects of solutions. If cooling is too rapid, then intracellular solution crystallizes with accompanying cell damage. Under cooling rates close to the optimum, intracellular solution is completely or practically completely vitrified. However such a state of solution is metastable and crystallization (devitrification) can develop in it, that is the cause of the cells damage during heating.

Investigation of the devitrification appearance conditions in erythrocytes suspensions with adding 1,2-propanediol (1,2-PD) and glycerol (Gl) cryoprotectants at the stage of their heating following freezing down to –196 °C. By changing the concentration of





Матеріал, захищений авторським правом

Цель работы – исследование условий возникновения девитрификации в суспензиях эритроцитов с добавками криопротекторов – 1,2-пропандиола (1,2-ПД) и глицерина (Гл) на этапе их нагрева после замораживания до –196 °С. Меняя концентрацию криозащитных веществ, мы стремились определить условия, при которых внутри- и внеклеточные растворы в суспензии клеток менее всего подвержены девитрификации в условиях медленного нагрева.

Объектами исследования были эритроциты кордовой крови. Их смешивали с равной по объему криозащитной смесью, содержащей 40, 50, 60, 70, 75 и 80 масс % 1,2-ПД или Гл. После смешения эритроциты осаждали центрифугированием при 800*g* в течение 5 мин и отделяли плотную суспензию клеток от надосадочной жидкости. Исходные смеси эритроцитов с криопротекторами, надосадочную жидкость и осажденные эритроциты исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Образцы охлаждали со скоростью 200 °С/мин, помещали в охлажденный до –196 °С калориметрический блок. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 0,5 °С/мин.

Девитрификация наблюдается в суспензиях эритроцитов после смешения с раствором 75 масс % Гл или 70% 1,2-ПД и выше. В то же время разбавление тех же криозащитных смесей равными объемами воды дает раствор, в котором девитрификация не регистрируется. Еще более интенсивно и при более низких концентрациях криопротектора проявляется девитрификация в надосадочной жидкости или в осадке эритроцитов. Пик девитрификации регистрируется в образцах, полученных смешением с растворами 70 масс % Гл или 60 масс % 1,2-ПД и выше. Наблюдаемые явления объясняются особенностями распределения криозащитных веществ между внутри- и внеклеточной средой эритроцитов. В плотной суспензии эритроцитов снижается вероятность внеклеточной кристаллизации, а высокая концентрация криопротектора внутри клетки способствует стеклованию внутриклеточной жидкости. В разбавленной суспензии клеток такой эффект стеклования требует более высоких концентраций криопротектора.

Таким образом, в условиях использования низкомолекулярных криопротекторов с коэффициентом распределения между внутри- и внеклеточной средой, близким к единице, высокая плотность клеток способствует стеклованию внутриклеточной жидкости. В таких системах девитрификация начинает играть роль наиболее существенного повреждающего фактора.

cryoprotective substances we tried to determine the conditions, under those intra- and extracellular solutions in cellular suspension are less subjected to devitrification under slow heating.

Cord blood erythrocytes were the objects under study. They were mixed with an equal on volume cryoprotective mixture, containing 40, 50, 60, 70, 75 and 80 % masses of 1,2-PD and Gl. Following mixing the erythrocytes were sedimented by centrifuging at 800*g* within 5 min and dense cell suspension was separated from a supernatant liquid. Initial mixtures of erythrocytes with cryoprotectants, supernatant liquid and sedimented erythrocytes were investigated by the method of differential scanning calorimetry. The samples were cooled with the rate of 200 °C/min, stored into a cooled down to –196 °C calorimetric block. Thermograms were recorded when heating with the rate of 0.5 °C/min.

Devitrification was noted in the erythrocytes suspensions following mixing with 75% masses of Gl and 70% 1,2-PD solutions and higher. At the same time dilution of the same cryoprotective mixtures with equal water volumes provides obtaining the solution, in which devitrification is not observed. More intensively and unedr lower cryoportectant concentrations devitrification is manifested in a supernatant liquid and in the erythrocytes' sediment. Devitrification peak is recorded in the samples, obtained by mixing with solutions of 70% masses of Gl or 60 masses % 1,2-PD and higher. Observed phenomena are explained by the redistribution peculiarities of cryoprotective substances between intra- and extracellular erythrocytes medium. In a dense suspension of erythrocytes the probability of extracellular crystallization decreases, and a high cryoprotectant concentration inside a cell promotes to vitrification of intracellular liquid. In a diluted cell suspension such a vitrification effect requires higher cryoprotectant concentrations.

Thus, under the conditions of usage low-molecular cryoprotectants with the redistribution coefficient between intra- and extracellular medium, close to 1, a high cell density promotes to vitrification of an intracellular liquid. In such systems devitrification is starting to play a role of the most significant damaging factor.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043.612.111

UDC 57.043.612.111

# Действие лидокаина на развитие гипертонического гемолиза эритроцитов при различных температурах

О. П. СЫНЧИКОВА, Н. М. ШПАКОВА

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

# Lidocaine Effect on the Development of Hypertonic Hemolysis of Erythrocytes at Various Temperatures

O. P. SYNCHYKOVA, N. M. SHPAKOVA

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

Перенесение эритроцитов в среды, отличающиеся по тоничности от физиологической, может сопровождаться повреждением мембран и лизисом клеток. Показано, что введение в лизирующие среды амфифильных соединений позволяет снизить степень повреждения эритроцитов при действии на них стрессовых факторов. В частности, известно, что лидокаин защищает клетки при гипотоническом и гипертоническом лизисе эритроцитов, а также при охлаждении клеток в гипертонических средах [4, 8]. Чувствительность эритроцитов к действию гипертонических сред и низкой температуры определяется состоянием цитоскелета [1]. Эффективность амфифильных соединений зависит от температуры [2]. Поэтому представляло интерес изучить влияние температуры (в диапазоне 5–20 °С) на развитие гипертонического лизиса эритроцитов в присутствии лидокаина.

В работе были использованы фенилгидразин фирмы Sigma, лидокаин и реактивы отечественного производства квалификации "хч и "чда. Все растворы были приготовлены на 5 мМ фосфатном буфере, *pH* 7,4. Объектом исследования служили эритроциты донорской крови группы II. Эритроциты трижды отмывали центрифугированием в 10 объемах физиологического раствора (0,15 М NaCl, *pH* 7,4). Клетки хранили не более 4 ч при температуре 4 °С.

Динамику гемолиза эритроцитов регистрировали методом светорассеяния ($\lambda = 720$ нм). Аликвоты клеточной суспензии переносили в термостатированную кювету, содержащую 4,0 М NaCl, при различных температурах и постоянно перемешивали (конечная концентрация – $3{,}1 \cdot 10^6$ кл./мл). Степень гемолиза эритроцитов определяли по величине оптической плотности, которая при больших разведениях была пропорциональна концентрации целых клеток. Скорость гемолиза эритроцитов определяли как тангенс угла наклона касательной, проведенной к кинетической кривой изменения оптической плотности суспензии эритроцитов в 4,0 М растворе NaCl.

Erythrocytes transfer into the media, differed on their tonicity from physiological one, can be accompanied by an injury of cellular membranes and lysis. It was shown that introduction into being lysed media of amphiphilic compounds allowed to reduce an extent of erythrocytes injury under the effect of stress factors on them. In particular, it is known that lidocaine protects cells during hypotonic and hypertonic lysis of erythrocytes, as well as when cooling cells in hypertonic media [4, 8]. Erythrocytes susceptibility to the effect of hypertonic media and low temperatures is determined by a cytoskeleton state [1]. Efficiency of amphiphilic compounds depends on the temperature [2]. Therefore it was interesting to study the temperature effect (within the range from 5 to 20 °C) on the development of erythrocytes' hypertonic lysis in the presence of lidocaine.

Phenylhydrasine (Sigma), lidocaine and reagents of the Ukrainian production with the quality of "chemically pure" and "pure for analysis" were used in the work. All the solutions were prepared with 5 mM phosphate buffer, *pH* 7.4. Donor's blood erythrocytes of the 2nd group were the objects under study. Erythrocytes were thrice washed-out by centrifuging in 10 volumes of physiological solution (0.15 M NaCl, *pH* 7.4). The cells were stored not more than 4 hrs under the temperature of 4 °C.

Dynamics of the erythrocytes hemolysis was recorded by the method of light dispersion ($\lambda = 720$ nm). Aliquotes of cell suspension were transferred into a thermostated cuvette, containing 4.0 M NaCl and constantly mixed at various temperatures (final concentration made $3.1 \cdot 10^6$ cells/ml). The level of erythrocytes hemolysis was determined on the value of optic density, which under high dilutions was proportional to the concentrations of the whole cells. The rate of erythrocytes hemolysis was evaluated as tangent of the slope of the curve, built to a kinetic curve of the change of an optic density of erythrocytes suspension in 4.0 M NaCl solution. Modification of the erythrocytes' cytoskeleton with phenylhydrazine was done according to the method proposed by Arduini and co-authors [3]. Under the conditions of



Матеріал, захищений авторським правом

Модификацию цитоскелета эритроцитов фенилгидразином осуществляли по методу, предложенному Arduini с соавт. [3]. В условиях постоянного перемешивания клетки инкубировали с фенилгидразином (1 мМ) при температуре 37 °С в течение 10 мин, дважды отмывали от модификатора и использовали в дальнейших экспериментах.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что уровень гипертонического гемолиза эритроцитов практически не зависит от температуры среды, незначительно снижаясь при 5 °С. Введение в литическую среду лидокаина оказывает влияние на развитие гипертонического повреждения клеток. Защитный эффект местного анестетика проявляется по мере снижения температуры эксперимента. При температуре 5 °С уровень гемолиза в присутствии лидокаина снижается примерно на 25%, в то время как при 20 °С антигемолитический эффект амфифила не выявлен.

По-видимому, зависимость защитного действия лидокаина при гипертоническом гемолизе от температуры литической среды обусловлена особенностями встраивания лидокаина в эритроцитарную мембрану при разных температурах. Известно, что лидокаин встраивается предпочтительно в области с более высокой текучестью [6, 7], доля которых при низкой температуре уменьшается. Следовательно, для насыщения жидких фаз при 5 °С потребуется меньшее количество молекул лидокаина. Наблюдаемый эффект уменьшения защитного действия амфифила с увеличением температуры, по-видимому, связан с тем, что присутствующего в литической среде лидокаина (1 мМ) становится недостаточно для насыщения мембраны до уровня, при котором происходит пертурбация клеточной мембраны, лежащая в основе антигемолитической активности амфифила [4].

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что скорость гипертонического гемолиза контрольных эритроцитов увеличивается с ростом температуры. В присутствии лидокаина отмеченная зависимость сохраняется, но величины скорости лизиса клеток снижаются. Таким образом, при высоких температурах развитие гемолитической поры ускоряется, а лидокаин снижает скорость во всем температурном диапазоне.

Предварительная инкубация клеток с фенилгидразином, модификатором цитоскелета [3], приводит как к повышению уровня гемолиза эритроцитов при перенесении их в 4,0 М NaCl по сравнению с контрольными эритроцитами во всем температурном диапазоне (рис. 1), так и к изменению температурной зависимости скорости гипертонического гемолиза (рис. 2). Фенилгидразин вызывает деградацию спектрина, разрушая его α- и β-цепи, а также влияет на трансбислойное движение фосфолипидов [3, 5]. Наши результаты свидетельствуют о том, что изменения, вызванные фенилгидразином, более значимы для клеток,

constant mixing the cells were incubated with phenylhydrazine (1 mM) under the temperature of 37 °C within 10 min, twice washed out of the modifier and used in further experiments.

The data in Fig. 1 show, that the level of hypertonic hemolysis of erythrocytes practically does not depend on the temperature of being lysed medium, insignificantly decreasing at 5 °C. Introduction into a lytic medium of lidocaine affects the development of the cell hypertonic damage. Protective effect of a local anaesthetic is manifested with the temperature reduction in an experiment. Under the temperature of 5 °C hemolysis effect in the presence of lidocaine decreases approximately by 25%, whereas under 20 °C antihemolytic effect was not revealed.

Obviously, dependence of the lidocaine protective effect during hypertonic hemolysis on the temperature of a lytic medium is stipulated by the peculiarities of lidocaine building-in into the erythrocytes membrane at various temperatures. It is known that lidocaine builds-in predominantly into the areas with higher fluidity [6, 7], the percentage of those decreases under low temperatures. Therefore for saturation of liquid phases less number of lidocaine molecules will be required. The effect observed in the reduction of an amphiphile protective effect with the temperature increase, probably, was related to the fact that the quantity of lidocaine (1 mM), present in a lytic medium, became insufficient for the membrane saturation up to the level, whereas perturbation of a cellular membrane occurred, which is in the base of an amphiphile antihemolytic activity [4].

According to the data of Fig. 2, the rate of hypertonic hemolysis of the control erythrocytes increases with the temperature growth. In the presence of lidocaine the mentioned peculiarity is kept, but the values of the rate of cell lysis are reduced. Thus under high temperatures the development of hemolytic pore accelerates, and lidocaine reduces the rate within the whole temperature range.

Preliminary cell incubation with phynylhydrazine, that is a cytoskeleton modifier [3], results both in a rise of the level of erythrocytes hemolysis when transferring them into 4.0 M NaCl, comparing to the control erythrocytes within the whole temperature range (Fig. 1), and in the change of a temperature dependence of the hypertonic hemolysis rate (Fig. 2). Phenylhydrazine causes spectrin dehydration, destroying its α- and β-chains, as well as affects a transbilayer movement of phospholipids [3, 5]. Our results testify to the fact that the changes, caused by phenylhydrazine, are more significant for the cells, being in highly concentrated saline media under low temperature.

Lidocaine during hypertonic hemolysis of the cells, modified by phenylhydrazine, reduces the erythrocytes damage only at the temperature of 20 °C up to the control level (Fig. 1). Revealed reduction of the rate of cell hypertonic lysis at 5 and 20 °C in the



Матеріал, захищений авторським правом

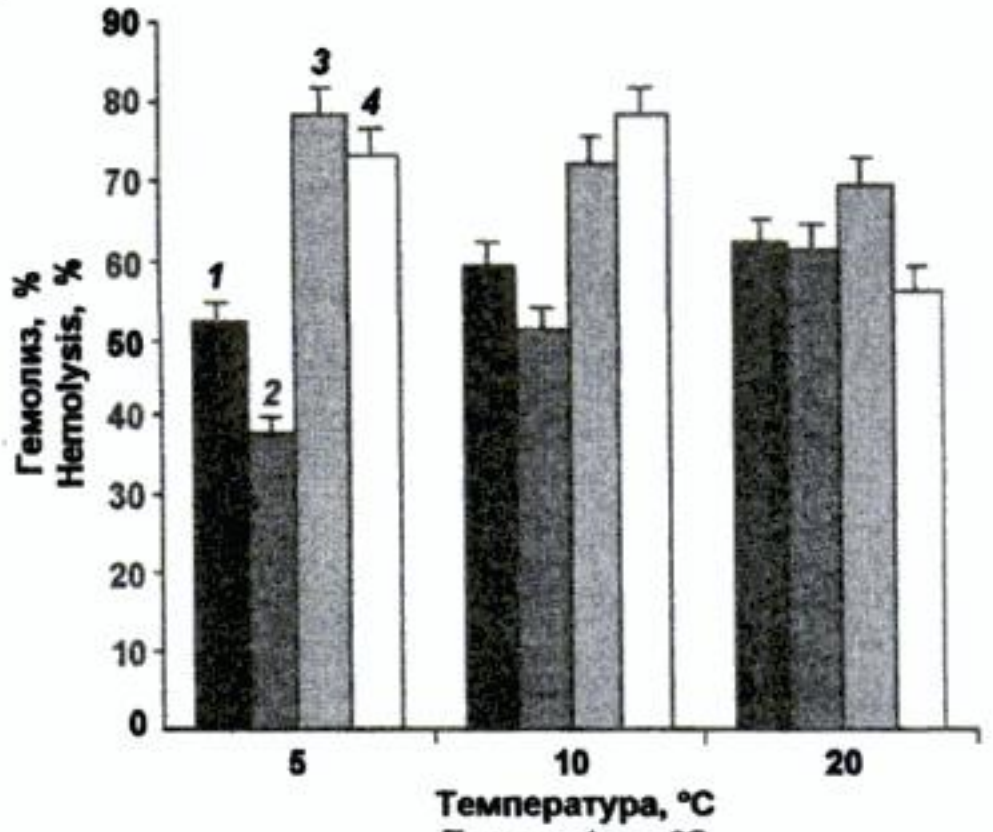



**Рис. 1.** Влияние температуры на гипертонический гемолиз эритроцитов в присутствии лидокаина: *1* – контроль; *2* – лидокаин (1 мМ); *3* – фенилгидразин (1 мМ); *4* – лидокаин (1 мМ), фенилгидразин (1 мМ).

**Fig. 1.** Temperature effect on the erythrocytes hypertonic hemolysis in the presence of lidocaine: *1* – the control; *2* – lidocaine (1 mM); *3* – phenylhydrasine (1 mM); *4* – lidocaine (1 mM); phenylhydrazine (1 mM).

находящихся в высоконцентрированных солевых средах при низкой температуре.

Лидокаин при гипертоническом гемолизе клеток, модифицированных фенилгидразином, снижает повреждение эритроцитов лишь при температуре 20 °С, причем до уровня контроля (рис. 1). Выявленное снижение скорости гипертонического лизиса клеток при 5 и 20 °С в присутствии лидокаина в целом не изменяет температурную зависимость скорости гипертонического гемолиза, характерную для эритроцитов, обработанных фенилгидразином (рис. 2).

Известно, что амфифильные соединения, обладающие антигемолитической активностью, являются либо капформерами, либо кренаторами [7]. Полагают, что для проявления антигемолитической активности эта способность веществ является обязательной. В работе мы использовали лидокаин в той концентрации (1 мМ), при которой не отмечено изменения морфологии клеток даже в процессе длительной инкубации (60 мин) [4]. Полученные результаты свидетельствуют, что лидокаин проявляет антигемолитическую активность при гипертоническом гемолизе эритроцитов и в том случае, когда амфифильное соединение не вызывает изменения формы клеток.

Таким образом, не следует говорить о существовании прямой связи между снижением уровня гипертонического гемолиза эритроцитов и их трансформацией под действием амфильных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М.* Роль регуляторных систем, модулирующих состояние белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Пробл. криобиологии.– 1992.– № 4.– С. 3–13.
2. *Шпакова Н. М., Панталер Е. Р., Бондаренко В. А.* Антигемолитический эффект хлорпромазина при гиперосмотическом и холодовом шоке эритроцитов // Биохимия.– 1995.– 60, № 10.– С. 1624–1631.

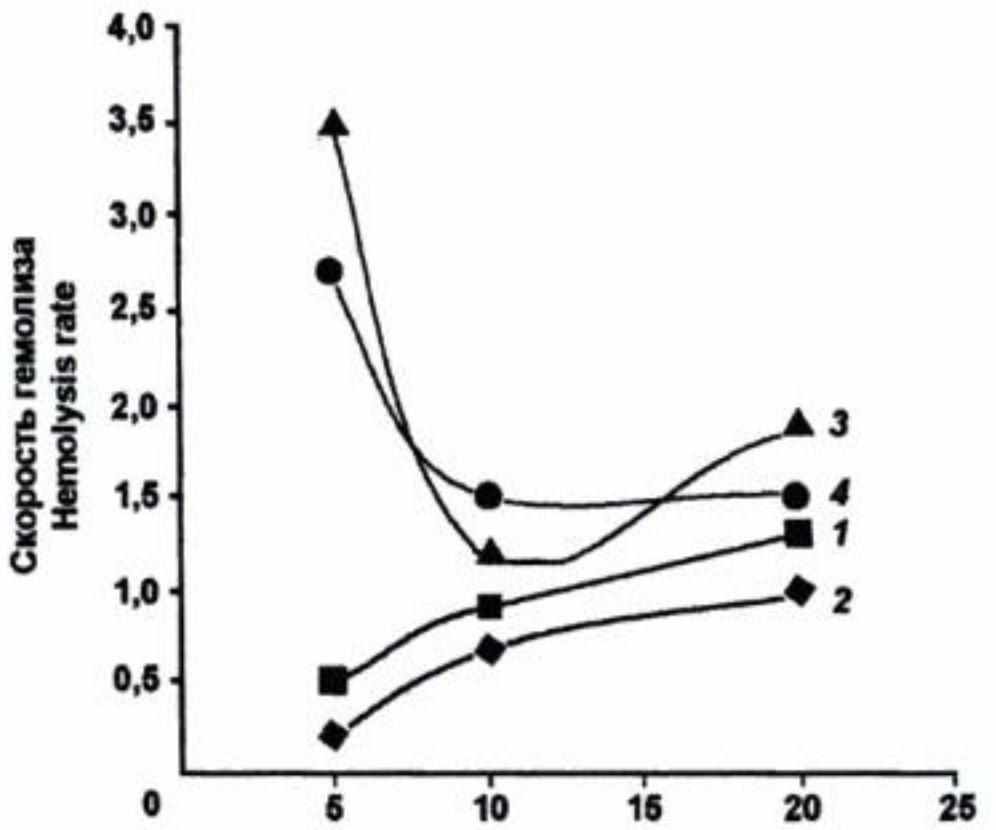



**Рис. 2.** Влияние лидокаина и фенилгидразина на скорость гипертонического гемолиза эритроцитов в 4,0 М NaCl при различных температурах: *1* – контроль; *2* – лидокаин (1 мМ); *3* – фенилгидразин (1 мМ); *4* – лидокаин (1 мМ), фенилгидразин (1 мМ).

**Fig. 2.** Effect of lidocaine and phenylhydrazine on the rate of the erythrocytes hypertonic hemolysis in 4.0 M NaCl under various temperatures: *1* – the control; *2* – lidocaine (1 mM); *3* – phenylhydrasine (1 mM); *4* – lidocaine (1 mM); phenylhydrazine (1 mM).

presence of lidocaine, in the whole does not change a temperature dependence of the rate of hypertonic hemolysis, that is characteristic for the erythrocytes treated with phenylhydrazine (Fig. 2).

It is known that amphiphilic compounds, possessing an antihemolytic activity, are either capformers or crenators [7]. It is considered that for the manifestation of antihemolytic activity this capability of the substances is the obligatory. In this work we used lidocaine under the concentration (1 mM), whereas no change in the cell morphology was revealed even during the process of long term incubation (60 min) [4]. Obtained results testify that lidocaine manifests an antihemolytic activity under the erythrocytes hypertonic hemolysis and in the case when an amphiphilic compound does not cause the change in a cell shape.

Thus it should not be spoken about the existence of a close bond between the decrease in the level of the erythrocytes hypertonic hemolysis and their transformation under the effect of amphiphilic compounds.

## REFERENCES

1. Belous A. M. Role of the regulatory systems, modulating the state of cytoskeleton proteins under the temperature-osmotic effect // Problems of cryobiology.– 1992.– № 4.– P. 3–13.
2. Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A. Antihemolytic effect of chlorpromazine under hyperosmotic and cold shock of erythrocytes // Biokhimia.– 1995.– 60, № 10.– P. 1624–1631.
3. *Arduini A., Storto S., Belfigilo M. et al.* Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979, № 1.– P. 1–6.



Матеріал, захищений авторським правом

3. *Arduini A., Storto S., Belfigilo M. et al.* Mechanism of spectrin degradation induced by phenylhydrazine in intact human erythrocytes // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– 979, № 1.– P. 1–6.
4. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced anti-haemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
5. *Hashmi A. N., Saleemuddin M.* Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // Biochem. Mol. Biol. int.– 1996.– 40, № 3.– P. 543–550.
6. *Hutterer R., Kramer K., Schneider F. W., Hof M.* The localization of the local anesthetic tetracaine in phospholipid vesicles: A fluorescence quenching and resonance energy transfer study // Chem. Phys. Lipids.– 1997.– 90, № 1–2.– P. 11–23.
7. *Schrier S., Malheiros S. V. P., Paula E.* Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– 1508, № 1–2.– P. 210–234.
8. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Dunayevskaya O. N., Bondarenko V. A.* Antihemolytic effect of amphiphilic compounds at cold and hyperosmotic stress of erythrocytes. XI-th Meeting of the European Association for Red Cell Research.– Ljubljana, Slovenia, 1997.– P. 62.

4. *Hagerstrand H., Isomaa B.* Amphiphile-induced anti-haemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation // Chem.-Biol. Interactions.– 1991.– 79.– P. 335–347.
5. *Hashmi A. N., Saleemuddin M.* Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // Biochem. Mol. Biol. Int.– 1996.– 40, № 3.– P. 543–550.
6. *Hutterer R., Kramer K., Schneider F. W., Hof M.* The localization of the local anesthetic tetracaine in phospholipid vesicles: A fluorescence quenching and resonance energy transfer study // Chem. Phys. Lipids.– 1997.– 90, № 1–2.– P. 11–23.
7. *Schrier S., Malheiros S. V. P., Paula E.* Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects // Biochim. Biophys. Acta.– 2000.– 1508, № 1–2.– P. 210–234.
8. *Shpakova N. M., Pantaler E. R., Dunayevskaya O. N., Bondarenko V. A.* Antihemolytic effect of amphiphilic compounds at cold and hyperosmotic stress of erythrocytes. XI-th Meeting of the European Association for Red Cell Research.– Ljubljana, Slovenia, 1997.– P. 62.

УДК 57.085.23: 611.811.013

UDC 57.085.23: 611.811.013

# Органотипическое культивирование как метод оценки функциональной активности эмбриональной ткани мозга

Н. Н. БАБЕНКО, А. Н. ГОЛЬЦЕВ

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

# Organotypic Culturing as the Method for Estimating the Functional Activity of Embryonic Neural Tissue

N. N. BABENKO, A. N. GOLTSEV

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

Поиск информативных критериев оценки жизнеспособности органов и тканей, подвергшихся криоконсервированию, остается актуальным и важным для решения вопроса об их пригодности для дальнейшей трансплантации с лечебной целью. Наиболее информативным для исследования процессов жизнедеятельности, развития и роста клеток, тканевых и органных структур является метод культивирования. Цель данной работы — разработка метода долгосрочного культивирования эмбриональных нервных клеток и тканей человека для моделирования поведения их в организме. Материалом исследования служила нервная ткань эмбрионов человека 10–11 недель гестации, полученных при искусственных абортах. В экспериментах была использована агаровая культура с фидерным слоем в модификации авторов. Размер эксплантатов не превышал 1–3 мм$^3$. Для стимуляции роста клеток в питательную среду добавляли субстраты-индукторы роста клеток. Окраску агаровых дисков производили азур-эозином по Романовскому и мети-

The search of informative criteria for the estimation of organs and tissue viability, subjected to cryopreservation, has remained an actual and important problem for solving the question about their suitability for further transplantation in therapeutic purposes. Culturing method is the most informative for studying the processes of vital activity, cell development and growth, tissue and organ structures. Elaboration of the method for a long-term culturing of human embryonic neural cells and tissues for their behavior modeling in an organism was the aim of given work. Neural tissue derived from 10–11 gestation weeks' human embryos, obtained during therapeutic abortions served as the material for investigation. Agar culture with a feeder layer in the authors' modification was used in the experiment. The size of explants did not exceed 1–3 mm$^3$. To stimulate the cell growth the substrates-inductors of cell growth were added into a nutrient medium. Agar discs staining was done with azur-eosine by Romanovsky and methylene blue by Nissle. To



Матеріал, захищений авторським правом

леновым синим по Нисслю. Для учета изменений клеток в культуре использовали прижизненную световую и фазово-контрастную микроскопию, анализ окрашенных препаратов.

Как показали результаты опыта, первоначальное формирование зоны роста идет за счет глиальных клеток, нейритов и фибробластов, которое ко 2-й неделе культивирования сменялось интенсивным образованием радиально направленных "тяжей" клеток в толще агара. При этом главный отросток каждой клетки был направлен в сторону миграции. Эти "тяжи" были представлены рядами плотноприлегающих друг к другу вытянутых клеток с длинными отростками, причем глиальные клетки образовывали как бы изолирующий чехол, внутри которого цепочкой располагались нейрональные элементы. При культивировании эксплантатов в питательной среде, содержащей 10% сыворотки кордовой крови, обнаружено более выраженное формирование "тяжей" в виде многорядной цепочки клеток. Параллельно с процессами миграции происходила гибель значительной части клеточных элементов в центре эксплантата с образованием зоны некроза, что обусловливало непрозрачность его центральных отделов.

К 21-м суткам культивирования происходило просветление центральной зоны эксплантата, нейробласты которой представляли собой клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки, что может свидетельствовать о поэтапности созревания нейрональных элементов в процессе культивирования нервной ткани.

К 30-м суткам культивирования отмечено формирование системы "тяжей" мигрирующих элементов, отходящих от эксплантата. Клеточные "тяжи" приобретали вторичные, третичные разветвления и таким образом образовывали в толще агара сложные сплетения волокон.

К 35-м суткам процесс культивирования можно было считать завершенным, у большей части клеток в культуре наблюдались признаки деградации. По-видимому, это связано с дефицитом питательных веществ, включенных в агаровый гель.

Итак, при данном способе культивирования эмбриональной нервной ткани клетки в полной мере реализуют свои гистологические потенции. Трехмерность субстрата, окружающего культивируемую ткань, позволяет включать в него различные биологически активные вещества для изучения их влияния на развитие культивируемых объектов. Очевидно, клетки фидерного слоя способны к выделению специфических ростовых факторов, проявляющих митогенную активность в отношении бластных форм клеток. Наблюдавшиеся многочисленные "тяжи" клеток представляют, по-видимому, способ миграции нейрональных элементов, не зависящий от радиальной глии. Можно предположить, что эти клетки используют клетки-партнеры в качестве миграционного субстрата. Таким образом, агаровая культура с фидерным слоем является адекватной долгосрочной моделью исследования поведения клеток мозга человека в культуре.

register the cell changes in a culture a life-time light microscopy and phase-contrast one, as well as the analysis of stained preparations were used.

As the experiment results demonstrated, an initial forming of a growth zone occurred due to glial cells, neurits and fibroblasts, that to the 2nd week of culturing changed by an intensive forming of radially directed "chains" of cells in agar. Thereat the basic axon of each cell was migration-oriented. These "chains" were presented by the rows of closed to each other stretched cells with long axons, thereat glial cells formed an isolating cover, inside of which neuronal elements were located as a "chain". During the explants' culturing in a nutrient medium containing 10% cord blood serum, we revealed more manifested, multi-row dislocation of cells formed the "chains". In parallel with the processes of migration the death of a significant part of cellular elements occurred in the center of explant with forming necrosis zone, that stipulated the opacity of its central compartments.

To the 21st day of culturing the enlightenment of the central zone of explant occurred, neuroblasts of which were the cells, being at different differentiation stages, that might testify to the stage-by-stage maturation of neuronal elements during the process of neural cells culturing.

To the 30th day of culturing the formation of the system of migrating elements "chains", branching of the explant, was noted. Cellular "chains" gained the secondary and tertiary branchings and in such a way formed the complex combinations of fibers in the agar width.

To the 35th day the process of culturing can be considered as finished, in the most part of cells in culture the signs of degradation were observed. Probably, this is related to the deficit of nutrient substances, comprised by agar gel.

Thus, during the given way of culturing of embryonic neural tissue the cells completely realize their histological potentials. Three-dimension of the substrate, surrounding the cultured tissue allows to comprise in it various biologically active substances to study their effect on the development of being cultured objects. Obviously the cells of a feeder layer are capable of releasing specific growth factors, manifesting mytogenic activity in respect of blast forms of cells. Observed by us numerous "chains" of cells, are, probably, representing the way for neuronal elements migration, not depending on a radial glia. It could be supposed, that these cells used the cells-partners as the migration substrate. Thus, agar culture with feeder layer is an adequate long-term model for investigation of human neural cells behavior in a culture.



Матеріал, захищений авторським правом

УДК 57.043: 576.311.347: 57.085.1: 577.12/.7

UDC 57.043: 576.311.347: 57.085.1: 577.12/.7

# Чувствительность системы окислительного фосфорилирования к гипотермическому хранению печени

А. Ю. СОМОВ

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

# Sensitivity of Oxidative Phosphorylation System to Hypothermic Storage of Liver

A. Yu. SOMOV

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

Восстановление энергетической функции печени после холодового хранения является одним из основных параметров ее жизнеспособности. Известно, что продолжительная гипотермия, а также гипоксия нарушают синтез АТФ в митохондриях, что в свою очередь может задерживать восстановление функции печени после трансплантации. Было показано [2, 4], что после 24-часового хранения печени потеря АТФ обусловлена снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Предполагают [1], что устойчивость компонентов дыхательной цепи к ишемии для каждого органа специфична.

Для поддержания энергетического состояния органа и снижения возможных осложнений трансплантации большое значение имеют раствор хранения, а также продолжительность консервирования [3]. Использование в трансплантологии раствора Университета Висконсин (UW) позволило эффективно сохранять печень на протяжении 10–13 ч, но по-прежнему остаются перспективными исследования по разработке новых консервирующих сред. Сахарозосодержащий раствор (ССР), разработанный в нашем институте, использовался для исследования метаболического состояния печени во время гипотермического хранения. Однако влияние холодового хранения печени на устойчивость дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий не изучалось.

Цель работы — изучение влияния гипотермического хранения в ССР и последующей нормотермической реперфузии печени крыс на функциональное состояние изолированных митохондрий.

В работе использовали беспородных белых крыс. Печень анестезированных животных отмывали от крови и насыщали консервирующим раствором *in situ*. Затем в портальную вену вводили катетер, и орган помещали в ССР, который хранили в холодильнике при 4 °С 60 мин и 24 ч. После хранения печень реперфузировали в среде Кребса–Рингера (бикарбонатный буфер, *pH* 7.4) 60 мин при 37 °С. Митохондрии выделяли дифференциальным центрифугированием. Концентрацию

Recovery of liver energetic function after cold storage is one of main parameters of viability. It is known, that a prolonged hypothermia and hypoxia impair the ATP synthesis in mitochondria, that in its turn may lead to the delay in restoration of liver function. It has been shown [2], that loss of ATP after 24 hrs' storage of liver is caused by the reduction in the efficacy of oxidative phosphorylation. One assumed [1], that resistance of the respiratory chain components to ischaemia was specific for each organ.

Storage solution and preservation term are of great importance for maintenance of organ's energetic state and reduction of possible complications in transplantation [3]. Usage of UW solution in transplantology allowed the effective liver storage during 10–13 hours, but the studies in the elaboration of new preservation media remained important. Sucrose-based solution elaborated in the IPC&C was used in investigations of liver metabolic state during hypothermic storage. However, the effect of liver cold storage on the resistance of respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria has not been studied.

The aim of this work is to study the effect of hypothermic storage in sucrose-based solution and following normothermic re-perfusion of rat's liver on a functional state of isolated mitochondria.

Breedless white rats were used in this work. Liver of anaesthetised animals was washed-out of blood and saturated with preservation solution *in situ*. Then the portal vein was catheterised and the organ was placed to sucrose-based solution and stored in refrigerator at 4 °C during 60 min and 24 hours. After storage the liver was re-perfused in Krebs–Ringer medium (bicarbonate buffer, *pH* 7.4) during 60 minutes at 37 °C. Mitochondria were isolated by differential centrifugation. Protein concentration was determined by biuret method. Estimation of respiration and oxidative phosphorylation was performed polarografically in the presence of substrates (malate, glutamate, succinate) and ADP. Respiration uncoupling was initiated by adding of dinitrophenol. Respiration control index (RCI) was determined as a ratio of oxygen consump-



Матеріал, захищений авторським правом

белка определяли биуретовым методом. Оценку дыхания и окислительного фосфорилирования осуществляли полярографически в присутствии субстратов (малат, глутамат, сукцинат) и АДФ. Разобщение дыхания инициировалось добавкой динитрофенола. Дыхательный контроль (ДК) определяли отношением скорости потребления кислорода $V_3$ (АДФ и субстрат присутствуют) к скорости $V_4$ (только субстрат). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin.

Данные эксперимента приведены в таблице. Установлено, что после 60 мин гипотермии печени скорость $V_3$ на малате + глутамат составляла 22,04 нмоль $O_2$/мг белка/мин при ДК 4,52 и снижалась ($P \le 0,05$) до 15,42 нмоль $O_2$/мг белка/мин после 60 мин нормотермической реперфузии. Скорость $V_3$, инициированная сукцинатом, не изменялась после реперфузии. Добавка динитрофенола после исчерпания АДФ разобщала дыхание до контрольных значений. Это свидетельствует о возможном снижении активности АТФазы при сохранении относительно высоких значений работы дыхательной цепи. 24-часовое хранение приводило к снижению ДК до 2,88 ± 0,25 на малате + глутамат и уменьшению скорости $V_3$ до 11 нмоль $O_2$/мг белка/мин. Потребление кислорода $V_3$ на сукцинате также было снижено до 15,38 нмоль $O_2$/мг белка/мин. Следует отметить, что не было обнаружено достоверных отличий в изменении скорости дыхания при добавке малата + глутамат и сукцината на этапе контроля и реперфузии, а также после 24 ч холодового хранения. Реперфузия после 24-часового хранения приводила к практически полной потере дыхательного контроля и увеличению скорости $V_4$. Полученные результаты позволя-

tion rate $V_3$ (in the presence of ADP and substrate) and rate $V_4$ (in the presence of substrate). Statistical evaluation of the results was performed with the Origin software.

Experimental data are given in Table. It is established, that after 60 minutes of hypothermia the $V_3$ rate was 22.04 at RC of 4.52 and decreased ($p \le 0.05$) down to 15.42 nM $O_2$/mg of protein/min after 60 minutes of normothermic re-perfusion. $V_3$ rate, initiated by succinate, did not change after re-perfusion. Adding of dinitrophenol after ADP exhaustion uncoupled the respiration down to the control values. This testifies to possible reduction of ATPase activity during keeping of relatively high values of respiratory-chain function. 24 hr's storage resulted in a decrease of RC down to 2.21 ± 0.13 in the presence of malate and glutamate and decrease of $V_3$ rate down to 11 nM $O_2$/mg of protein/min. Oxygen consumption at succinate adding also decreased down to 15.38 nM $O_2$/mg of protein/min. It should be noted that there were no statistically significant differences in changes of respiration rate during adding of malate + glutamate and succinate on control and reperfusion stage, and after 24 hour cold storage. Re-perfusion after 24 hour storage resulted in practically complete loss of RCI and increase of $V_4$ rate. Obtained data allow to assume the development of hypothermia-induced latent defects.

**Параметры дыхательной активности митохондрий печени крыс после гипотермического хранения и нормотермической реперфузии**

**Parameters of respiratory activity of rats' liver mitochondria after hypothermic storage and normothermic re-perfusion**

| Параметры дыхания<br>Respiration parameters | Контроль<br>(60 мин гипотермии)<br>Control<br>(60 min of hypothermia) | 24 ч хранения<br>24 hrs of storage | 60 мин хранения + реперфузия<br>60 min of storage + reperfusion | 24 ч + реперфузия<br>24 hrs + re-perfusion |
|---|---|---|---|---|
| | нмоль $O_2$/мг белка/мин<br>nmol $O_2$/mg of protein/min | | | |
| $V_4$ малат + глутамат<br>$V_4$ malate + glutamate | 4,18 ± 0,66 | 5,12 ± 0,92 | 3,75 ± 0,73 | 4,43 ± 0,7 |
| $V_3$ АДФ<br>$V_3$ ADF | 22,04 ± 1,48 | 11,05 ± 0,79** | 15,42 ± 1,39* | 8,46 ± 1,17 |
| ДНФ<br>DNPh | 27,28 ± 2,44 | 22,68 ± 4,23 | 27,07 ± 2,69 | 12,5 ± 1,67 |
| ДК<br>RCI | 4,52 ± 0,35 | 2,88 ± 0,25** | 3,98 ± 0,41 | 2,0 ± 0,26 |
| $V_4$ сукцинат<br>$V_4$ succinate | 7,6 ± 1,7 | 8,75 ± 0,8 | 6,47 ± 0,92 | 7,85 ± 1,57 |
| $V_3$ АДФ<br>$V_3$ ADPh | 27,18 ± 6,43 | 15,38 ± 1,38 | 14,18 ± 0,22 | 11,75 ± 2,25 |
| ДНФ<br>DNPh | 35,68 ± 9,52 | 32,86 ± 5,22 | 25,33 ± 3,48 | 15,05 ± 2,4 |
| ДК<br>RCI | 3,1 ± 0,22 | 2,21 ± 0,13 | 2,7 ± 0,4 | 1,51 ± 0,09 |

**Примечания.** *значения достоверны при $p \le 0,05$ по отношению к контролю; **значения достоверны при $p \le 0,01$ по отношению к контролю.

**Notes.** *values are statistically significant at $p \le 0.05$ in respect to the control; **values are statistically significant at $p \le 0.01$ in respect to the control.



Матеріал, захищений авторським правом

ют предположить развитие латентных дефектов, индуцированных гипотермией.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Almeida A., Allen K. L., Bates T. E., Clark J. B.* Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory-chain in the gerbil brain // J. of Neurochemistry.– 1995.– 65.– P. 1698–1703.
2. *Mitchell S. J., Churchill T. A., Winslet M. C., Fuller B. J.* Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver // Cryobiology.– 1999.– 39(2).– P. 130–137.
3. *Mitchell S. J., Churchill T. A., Winslet M. C., Fuller B. J.* Effects of different cold preservation solutions on restoration of hepatic energy metabolism during cold reperfusion // Cryobiology.– 1996.– 33(4).– P. 413–422.
4. *Sammut I. A., Thorniley M. S., Simpkin S. et al.* Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers // Cryobiology.– 1998.– 36.– P. 49–60.


## REFERENCES


1. *Almeida A., Allen K. L., Bates T. E., Clark J. B.* Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory-chain in the gerbil brain // J. of Neurochemistry.– 1995.– 65.– P. 1698–1703.
2. *Mitchell S. J., Churchill T. A., Winslet M. C., Fuller B. J.* Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver // Cryobiology.– 1999.– 39(2).– P. 130–137.
3. *Mitchell S. J., Churchill T. A., Winslet M. C., Fuller B. J.* Effects of different cold preservation solutions on restoration of hepatic energy metabolism during cold reperfusion // Cryobiology.– 1996.– 33(4).– P. 413–422.
4. *Sammut I. A., Thorniley M. S., Simpkin S. et al.* Impairment of hepatic mitochondrial respiratory function following storage and orthotopic transplantation of rat livers // Cryobiology.– 1998.– 36.– P. 49–60.



УДК 611.013.3/.8.08: 612-017: 616/72-002/77-08

UDC 611.013.3/.8.08: 612-017: 616/72-002/77-08


# Оценка структурно-функциональных характеристик клеток моноцитарно-макрофагальной системы при применении продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса в условиях развития аутоиммунных заболеваний


И. В. РАССОХА, А. Н. ГОЛЬЦЕВ, Л. В. ОСТАНКОВА, Т. Г. ДУБРАВА, Е. Д. ЛУЦЕНКО

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


# Evaluation of Structural and Functional Characteristics of Monocyte-Macrophage System Cells when Applying the Products of Embryofetoplacental Complex under Conditions of Autoimmune Disease Development


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

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


В последние годы наблюдается тенденция к росту патологий, имеющих аутоиммунный генез. Вопросы, связанные с решением данной проблемы, приобретают не только медицинский, но и социальный характер. К числу тяжелых и социально значимых форм аутоиммунных патологий относится ревматоидный артрит (РА), отличающийся вариабельностью течения и прогрессированием изменений с развитием стойкой деформации суставов, нарушением их функций, что приводит к потере трудоспособности и ранней инвалидизации.

Для лечения РА используют противовоспалительные препараты, недостатком которых является развитие побочных эффектов. Следовательно, возникает необходимость оптимизации методов терапии, базирующихся на понимании механизмов развития процесса и прежде всего участия субстратов иммунной системы в инициации данной патологии.

Recently, there has been the tendency to the growth of pathologies of autoimmune genesis. The questions related to the solving of this task, gain not only medical but also social character. To the number of severe and socially significant forms of autoimmune pathologies one can refer rheumatoid arthritis (RA), featuring with variability of the course and progressing of the changes with the development of stable deformation of joints, disorder in their function, that results in the loss of capacity for work and early invalidity.

For treating RA antiinflammatory preparations are used, the shortcoming of them is the development of side effects. Therefore appears the necessity in optimisation of therapy methods basing on understanding of mechanisms of process development and primarily participation of substrates of immune system in initiation of this pathology.




Матеріал, захищений авторським правом

При развитии любой патологии, включая РА, бесспорным является факт изменения структурно-функциональной организации тех клеток, которые формируют цитокиновый профиль организма и реализуют эффекторные функции. К таковым относятся клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Наше внимание было обращено на изучение этих клеток при развитии РА и возможности коррекции их структурно-функциональной организации под действием продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК). Применение ПЭФПК было предопределено их потенциальной способностью изменять цитокиновый профиль и в целом состояние иммунокомпетентной сферы реципиентов с активацией супрессорного звена иммунитета.

Цель данной работы — изучение характера и степени иммунокоррегирующей активности ПЭФПК в модели адъювантного артрита (АА) крыс. Эксперимент выполнен на 3-месячных самцах крыс линии Вистар массой 160 г. АА индуцировали субплантарным введением 0,1 мл полного адъюванта Фрейнда. В данной дозе адъювант инициирует состояние, имеющее все морфофункциональные признаки РА. Эмбриональный материал — гомогенат плаценты (ГП) крыс вводили однократно внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл.

Состояние моноцитарно-макрофагальной системы оценивали по адгезивной способности и фагоцитарной активности клеток перитониальной полости (ПП). В качестве фагоцитирующих частиц использовали st aureus.

Установлено, что на 14-е сутки после инициации АА наблюдается достоверное увеличение количества клеток в ПП и адгезивных клеток в них. При оценке фагоцитарной активности клеток ПП у животных с АА выраженного изменения таких показателей, как фагоцитарный индекс (ФИ), т.е. процент фагоцитирующих клеток, и фагоцитарное число (ФЧ), т.е. количество поглощенных каждой клеткой частиц, отмечено не было по сравнению с контролем (соответственно $16{,}0 \pm 0{,}9$:$18{,}3 \pm 1{,}1$ и $17{,}1 \pm 1{,}0$:$16{,}0 \pm 0{,}8$). Вместе с тем наблюдалось четкое перераспределение типов фагоцитирующих клеток. Так, например, при АА появляются новые их формы в виде больших гранулярных лимфоцитов, отсутствующих в ПП контрольных животных. Введение как нативного, так и криоконсервированного ГП в большей степени оказывало влияние на ФИ, чем на ФЧ, повышая процент фагоцитирующих клеток примерно в 1,5–1,8 раза по сравнению с их содержанием у животных с АА. Одновременно после введения ГП снижался процент адгезивных клеток, приближая их содержание к контролю, причем нативный материал больше, чем криоконсервированный, обладал такого рода активностью.

Известно, что экспрессия молекул адгезии и функциональный потенциал фагоцитирующих клеток изменяется в условиях преформации цитокинового профиля организма. Следовательно, ГП обладает способностью модифицировать состояние иммунокомпетентной сферы при аутоиммунных заболеваниях и может реализовать терапевтический эффект через включение механизмов коррекции моноцитарно-макрофагальной системы.

During the development of any pathology, including RA, indisputable is the fact of changes in structural and functional organisation of those cells which form cytokine profile of an organism and realise effectory functions. The cells of monocyte-macrophage system are referred to those.

Our attention was paid to the studying of these cells during the development of RA and correction possibility of their structural and functional organisation under the effect of the products of the embryofetoplacental complex (PEFPC). PEFPC application was preconditioned by the potential ability to change cytokine profile and in general the state of immune competent sphere of recipients with activation of immunity suppressor link.

The aim of this work was to investigate the character and extent of immune correcting activity of PEFPC in the model of adjuvant arthritis (AA) of rats. The experiment was carried-out in 3-months' Wistar male rats of 160 g mass. AA was induced by subplantar injection of 0.1 ml complete Freund's adjuvant. In this dose adjuvant initiates the state this all morphofunctional signs of RA. Embryonic material, placenta homogenate (PH), of rats was once introduced intraperitoneally in the volume of 0.5 ml.

The state of monocyte-macrophage system was estimated on adhesive ability and phagocytic activity of cells of peritoneal cavity (PC). St. aureus were used as phagocytic substances. It has been established that to the 14-th day after AA initiation statistically true increase in the number of cells is observed in PC and adhesive cells among them. When estimating phagocytic activity of PC cells in animals with AA no manifested changes in such indices as phagocytic index (PhI), i.e. the percentage of phagocyting cells, and phagocytic number (PhN), i.e. the number of taken-up particles by every cell, were noted in comparison with the control (correspondingly $16.0 \pm 0.9$:$18.3 \pm 1.1$ and $17.1 \pm 1.0$:$16.0 \pm 0.8$). Simultaneously a distinct re-distribution of phagocyting cell types was observed. So, for instance, at AA their new forms appear as large granular lymphocytes, absent in PC of control animals. Introduction of both native and cryopreserved PH in a greater extent affected PhI, then PhN, increasing the percentage of phagocyting cells approximately in 1.5–1.8 times in comparison with their content in animals with AA. At the same time after PH introduction the percentage of adhesive cells reduced, approaching their content to the control, and in this case native material in bigger extent than cryopreserved one possessed such an activity.

It is known that the expression of adhesion molecules and functional potential of phagocytic cells change under conditions of preformation of an organism cytokine profile. Hence, PH possesses an ability to modify the state of immune competent sphere under autoimmune diseases and can realise therapeutic effect via the triggering the mechanisms of correction of monocyte-macrophage system.



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 5.04.2002. Формат 60×84 1/8. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 15,35. Тираж 350 экз. Цена договорная. Отпечатано МЧП "Райдер", г. Харьков, ул. Артема, 4.

Матеріал, захищений авторським правом

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

# 1

# 2002

# PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY

Индекс 70474

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, меди-цине 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

Матеріал, захищений авторським правом