

З

ISSN 0233-7673

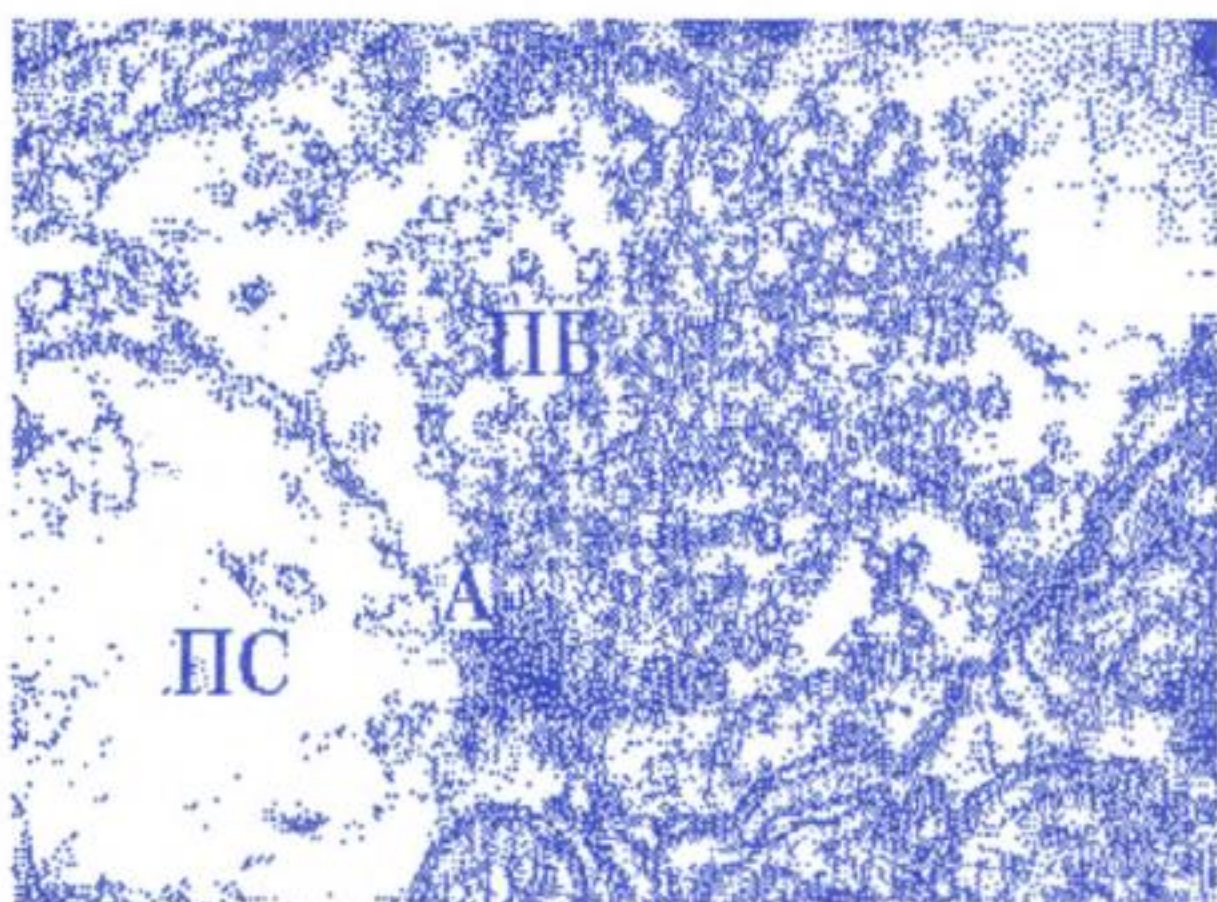
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ,  
ОТДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ,  
БИОХИМИИ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ  
И КРИОМЕДИЦИНЫ



1995

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ



АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ  
ОРГАНОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ *А.М.Белоус, Л.П.Кравченко*

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ  
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО  
МОЗГА. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров  
проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре  
сверхмедленной управляющей системы организма? *В.С.Марченко,  
Г.А.Бабийчук, А.В.Шило, В.В.Ломако, Е.В.Алтуева, Л.Н.Марченко*

Главный редактор В.И.Грищенко

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

Editor-in-Chief V.I.Grishchenko

## EDITORIAL BOARD

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

## EDITORIAL COUNCIL

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

# 3

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

1995

## ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

### СОДЕРЖАНИЕ

#### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ КРИОБИОЛОГИЯ

- Белоус А.М., Кравченко Л.П.* Актуальные вопросы фармакологической защиты органов при криоконсервации . . . . . 3
- Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Шило А.В., Ломако В.В., Алтуева Е.В., Марченко Л.Н.* К механизмам регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера охлажденного мозга. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма? . . . . . 10
- Гольцев А.Н., Луценко Е.Д., Останкова Л.В., Дубрава Т.Г., Опанасенко Е.В.* Мембранные структуры, определяющие фенотипические характеристики и функциональное состояние кроветворных клеток; возможная их модификация под действием факторов криоконсервирования. Часть I. . . . . 19
- Пушкар Н.С., Гордиенко Е.А., Осецкий А.И., Гордиенко О.И., Кулешова Л.Г.* Исследование физических процессов в биологических объектах при глубоком охлаждении . . . . . 30
- Луговой В.И., Липина О.В., Мазалов В.К., Слета И.В.* Влияние полиэтиленоксидов на реологические свойства крови белых крыс при охлаждении . . . . . 37
- Безуглый Н.Д., Гордиенко Н.А.* Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах криопротекторов. I. Общее описание изменений клеточного объема . . . . . 40

#### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

- Межидов С.Х., Моисеев В.А.* Влияние сочетания высокомолекулярных криопротекторов с 1,2-пропандиолом на сохранность эритроцитов при криоконсервировании . . . . . 46

#### КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Шаповалов Д.В.* Применение криоконсервированной островковой ткани поджелудочной железы в профилактике хирургических осложнений у больных сахарным диабетом . . . . . 49

#### РЕЦЕНЗИЯ

#### ХРОНИКА

© Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной Академии наук Украины, "Проблемы криобиологии", 1995

## CONTENTS

### THEORETICAL AND EXPERIMENTAL CRYOBIOLOGY

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Belous A.M., Kravchenko L.P.</i> Current problems of pharmacological protection of organs during cryopreservation . . . . .                                                                                                                                                                                                          | 3  |
| <i>Marchenko V.S., Babiychuk G.A., Shilo A.V., Lomako V.V., Altuyeva E.V., Marchenko L.N.</i> On the mechanisms of regulation of blood-brain barrier permeability of the cooled brain. Report III. Is nitric oxide one of the triggers of BBB permeability in the structure of the supraslow controlling system of the brain? . . . . . | 10 |
| <i>Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V., Dubrava T.G., Opanasenko E.V.</i> Membrane structures, determining phenotypical characteristics and functional state of hemopoietic cells; their possible modification under the action of cryopreservation factors. Part II. . . . .                                                   | 19 |
| <b>Pushkar N.S.</b> , <i>Gordienko E.A., Osetsky A.I., Gordienko O.I., Kuleshova L.G.</i> Study of physical processes in biological systems during profound cooling . . . . .                                                                                                                                                           | 30 |
| <i>Lougovoy V.I., Lipina O.V., Mazalov V.K., Sleta I.V.</i> Effect of polyethylene oxides on rheologic properties of white rat blood during cooling . . . . .                                                                                                                                                                           | 37 |
| <i>Bezugly N.D., Gordienko N.A.</i> Osmotic response of mammalian oocytes and embryos in cryoprotective solutions. I. General description of changes in cell volume . . . . .                                                                                                                                                           | 40 |

### CRYOPRESERVATION OF BIOSYSTEMS

|                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Mezhidov S.Kh., Moiseyev V.A.</i> Effect of combined treatment by highly molecular cryoprotectants and 1,2-propanediol on survival of red blood cells during cryopreservation . . . . . | 46 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### BRIEF COMMUNICATIONS

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Shapovalov D.V.</i> Application of cryopreserved islet tissue of pancreas for prophylaxis of surgical complications in patients with <i>Diabetes mellitus</i> . . . . . | 49 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### REVIEW

### CHRONICLE

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

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

Подп. в печ. 09.01.96. Формат 70x108/16. Бум. тип. № 1. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,9.  
Тираж 350 экз. Оригинал-макет подготовлен в Институте проблем криобиологии и  
криомедицины НАН Украины. Отпечатано в Харьковской городской типографии № 16,  
310003, Харьков, ул. Университетская, 16. Зак.

**АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ  
ОРГАНОВ ПРИ КОНСЕРВАЦИИ**

Проблемы гипотермической консервации органов (печень, почка, сердце) рассматриваются в аспекте ишемического синдрома, являющегося пусковым механизмом развития молекулярно-клеточной патологии. В частности, освещены важная роль процессов ПОЛ и активных форм кислорода в дестабилизации мембранных структур клетки, значение органного отека и метаболического ацидоза в нарушении функции систем энергообеспечения. Описаны меры, направленные на коррекцию нарушенных систем органа в процессе консервации с помощью различных фармакологических препаратов.

За последние 10–12 лет в области гипотермической консервации крупных органов (почка, печень, сердце) достигнуты определенные успехи, что связано прежде всего с углублением фундаментальных исследований метаболических, патохимических и структурных процессов в изолированном органе, а также с совершенствованием микрохирургической техники взятия и пересадки консервированного биотрансплантата [9, 13, 21].

Важным патохимическим процессом, возникающим при консервации органов, является синдром холодовой ишемии, который способствует развитию разносторонней патологии в органе при его изоляции из организма [4, 9, 11]. Поэтому при решении вопросов, касающихся гипотермической консервации органов, прежде всего необходимо дальнейшее выяснение механизмов, при помощи которых синдром ишемии реализует свое разрушающее действие на клетку. Опираясь на данные, полученные при изучении этого вопроса, в последнее время начали использовать более целенаправленно фармакологические и другие средства, что позволило существенно раздвинуть границы гипотермического (0–4 °C) хранения органов и подойти к экспериментальному их замораживанию. Анализ литературы по данному вопросу показывает, что течение ишемического синдрома в изолированном органе осуществляется по определенным закономерностям. Прежде всего – это нарушение стабильности мембран за счет разрушения их липидных и липидно-белковых комплексов процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активацией фосфолипаз, которые увеличивают в тканях пул токсических продуктов распада (гидроперекиси липидов, свободные жирные кислоты (СЖК), лизоформы, продукты распада арахидонового цикла), резко повышая проницаемость биологических мембран для ионов и особенно  $\text{Ca}^{2+}$  [2]. Вторым важным компонентом в развитии указанной выше патологии являются активные формы  $\text{O}_2$ , главным образом супероксидные анионы, которые служат активаторами процессов ПОЛ и обладают выраженным вазоконстрикторным эффектом. Развитие подобных патологических процессов в клетках ишемизированного органа ведет к дезинтеграции метаболических и физиологических функций. В настоящем сообщении рассматривается фармакологическая коррекция нарушений, возникающих в результате повреждающего действия холодовой ишемии на ткани. Это, во-первых, модификация процессов перекисного окисления липидов и роль в них активных форм кислорода; во-вторых, роль органного отека и метаболического ацидоза в нарушении систем энергообеспечения.

К настоящему времени накоплен обширный массив научной литературы, посвященной гипотермической консервации органов [9, 13, 21], и гораздо меньше работ посвящено их замораживанию [12, 20]. С одной стороны, гипотермическая консервация органов рассматривается как самостоятельная проблема, с другой, – ее решение может быть полезным для предварительной под-



готовки органа (аспекты его адаптации, стабилизации) к дальнейшему замораживанию.

В связи с решением проблемы консервации и трансплантации органа необходимо соблюдать некоторые значительно улучшающие исходы трансплантации принципы. К их числу относятся следующие: фармакологическая обработка донора с целью повышения стабилизации органа перед забором; разработка новых консервирующих растворов для хранения; фармакологические меры стимуляции процессов репарации структуры и функций отогретых тканей в период трансплантации.

*Роль процессов перекисного окисления липидов и активных форм  $O_2$  в ишемическом поражении органа в условиях консервации*

Сейчас известно, что одним из важнейших механизмов, ответственных за нестабильность клеток в условиях холодовой ишемии, является усиление ПОЛ и повышение концентрации активных форм кислорода (АФК). Согласно перекисной гипотезе гибели клетки [5] первичные (диеновые конъюгаты, перекиси липидов) и вторичные (алканыли, малоновый диальдегид (МДА) продукты ПОЛ оказывают токсическое воздействие на белки и фосфолипиды, что резко повышает проницаемость клеточных мембран для воды, ионов и метаболитов. В результате действия продуктов распада ПОЛ инициируется набухание клеток и клеточных органелл, выход ферментов лизосом в цитозоль, разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, снижение продукции макроэргов, аутолиз ткани. Особенности развития процессов ПОЛ в ишемизированном органе, подвергнутом гипотермической перфузии и хранению при 0–4 °С, изучены в недостаточной мере [4, 5, 15]. Известно [4], что примерно через 30 мин после тепловой ишемии в тканях таких изолированных органов, как печень и почка происходит увеличение содержания перекисей липидов, а уровень антиокислительной активности снижается. Показано [4, 17], что процессы ПОЛ активируются в перфузируемом органе при его пересадке; это может быть причиной избыточного поступления в кровь различных по своей природе продуктов ПОЛ, которые обладают высокой метаболической и гуморальной активностью. Известно, что выраженным вазоактивным эффектом обладают циркулирующие недоокисленные и окисленные СЖК, гидроперекиси арахидоновой кислоты (АК). В связи с этим существует необходимость решать проблемы циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма АК. Поэтому в настоящее время для подавления вазоконстрикторного действия продуктов распада АК используют ингибиторы циклооксигеназы (индометацин, аскорбиновая кислота, глутатион) и тромбоксантинсинтетазы (сульфинпиразон, дипиридамола) [3].

Вазоконстрикторный и мембраноповреждающий эффекты продуктов ПОЛ могут реализоваться не только по механизму свободнорадикальных процессов, но и через активные формы  $O_2$ . В таких случаях индукция процессов ПОЛ ОН-радикалами может быть ингибирована введением в перфузат антиокислительных ферментов (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза) и ловушек ОН-радикалов (ионол, дигидропиридин). Считают, что СЖК, лизоформы и гидроперекиси жирных кислот (ГПЖК) обладают  $Ca^{2+}$ -ионоформными свойствами, изменяющими проницаемость гидрофобного слоя мембран, благодаря чему избыток экзогенного  $Ca^{2+}$  свободно проникает в цитозоль клетки. Увеличение концентрации кальция в цитоплазме реализуется по сложному механизму с участием в этих процессах продуктов распада фосфатидилинозитов, фосфолипазы  $A_2$  и липоксигеназы [2]. Поскольку фумаровая кислота блокирует места связывания гидроперекисей ЖК на поверхности мембраны и устраняет патологическое их действие, добавка ее в состав перфузата в сочетании со специфическими блокаторами  $Ca^{2+}$ -каналов (варапамид, нифедипин) существенно снижает вазоконстрикторный эффект гидроперекиси жир-

ных кислот, особенно продуктов распада АК – лейкотриенов, тромбоксанов и простагландинов.

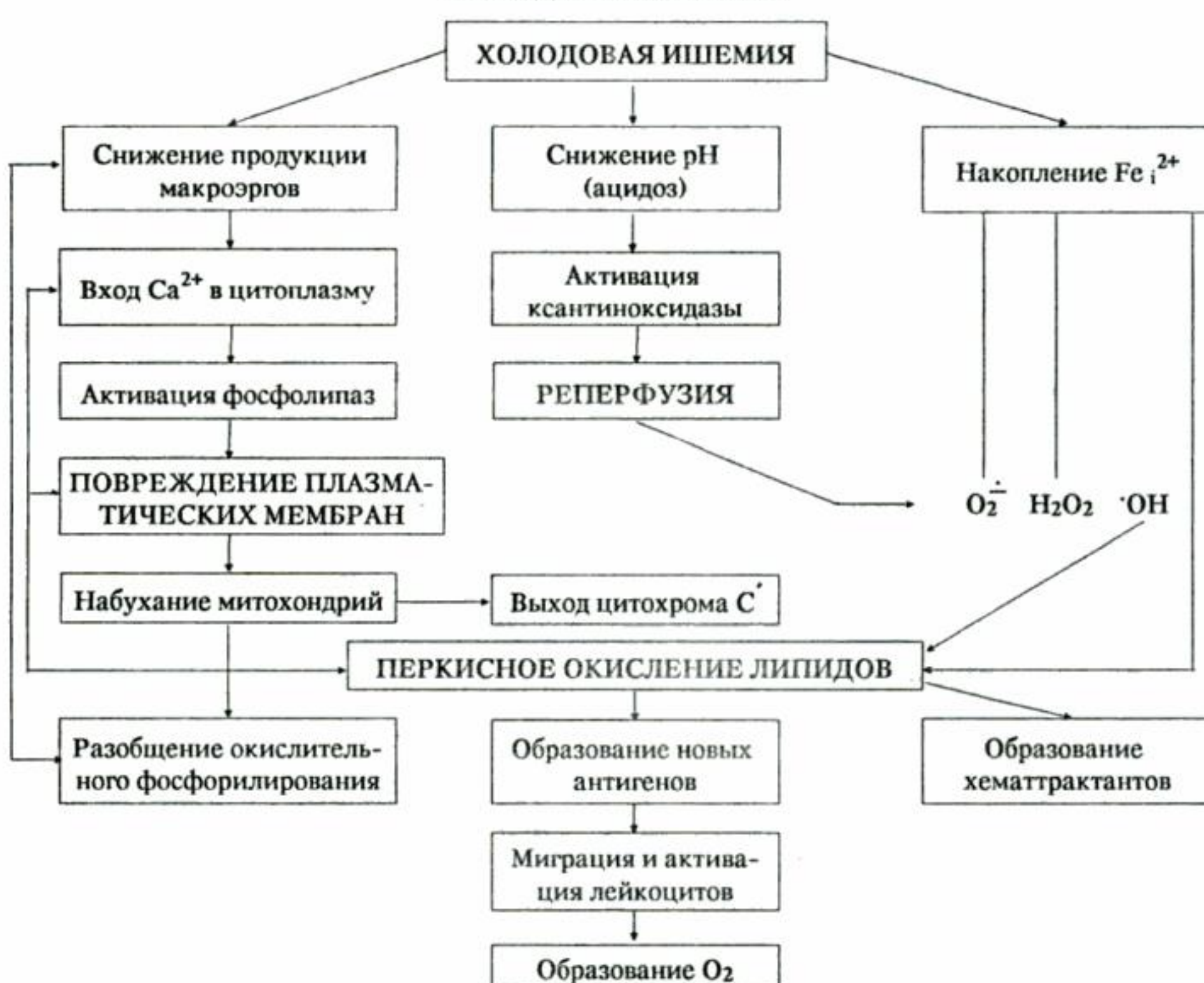
Данные, полученные с использованием ингибиторов метаболизма АК [4, 19], показывают, что подавление активности циклооксигеназы и липоксигеназы позволяет значительно лучше сохранить жизнеспособность органа при его длительной консервации. Так, консервация почки собаки при 0–4 °С позволяет в полном объеме сохранить ее функции на протяжении 5–7 сут при условии, что орган перфузировали раствором, содержащим ингибитор тромбоксансинтетазы (фуреглат), или проводили премедикацию животного аспирином перед трансплантацией органа.

При анализе вопросов, связанных с развитием процессов ПОЛ в ишемизированном органе, следует учитывать то обстоятельство, что в этих условиях активность антиокислительных глутатионсодержащих ферментов в течение первых 12–24 ч может снижаться в следующем порядке: СОД → GSH-пероксидаза → GSH-S-трансфераза → каталаза. Важным фактором снижения указанных выше противоокислительных ферментов и выхода их из клетки является также ацидоз. Показано, что при сдвиге  $pH$  6,2–6,0 активность СОД практически полностью ингибируется.

Согласно данным [4, 10], при консервации и последующей перфузии органов экспериментальных животных уровень глутатиона (GSH) и соотношение GSH/GSSH снижаются, что является также причиной интенсификации процессов ПОЛ. Считают, что снижение содержания GSH при ишемии органа обусловлено не столько его потреблением, сколько нарушением первичного синтеза из-за дефицита аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) или выхода его во внеклеточное пространство. Восстановление свойств глутатионсодержащих ферментов при холодовой ишемии органа может быть достигнуто добавкой в перфузат высоких концентраций восстановителей (аскорбиновая кислота, глутатион, цистеин, сульфат, тиомочевина, восстановленные пиридиннуклеотиды,  $\alpha$ -токоферол и др.) [1, 4, 10]. Антиокислительный механизм действия проявляют многие жирорастворимые антиоксиданты ( $\alpha$  и  $\gamma$ -токоферолы, убихиноны CoQ<sub>10</sub>), стероидные гормоны (тироксин, эстрогены), витамины, сложные фосфолипиды (ретинол,  $\beta$ -каротин), которые не только способны восстанавливать липидные радикалы, но и препятствовать взаимодействию вновь образуемого радикала с новой молекулой окисляемого соединения. Как видно, при ишемии органов, вызванной их консервацией, система антирадикальной и антиокислительной активности клеток снижается, в то время как активность прооксидантных систем увеличивается. В частности, к числу таких систем следует отнести ферментативные и неферментативные циклы генерации активных форм O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><sup>•</sup>, HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, •OH, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [8]. Генераторами активных форм O<sub>2</sub> во многих биологических системах как в физиологических, так и патологических условиях являются: дыхательная цепь митохондрий, электронно-транспортная цепь микросом НАДРН-цитохром Р-450-зависимая система гидроксилирования ксенобиотиков), реакция гипоксантиноксантиноксидаза, начальный путь метаболизма АК, биосинтез и окисление катехоламинов, процесс разложения перекисей GSH-пероксидазой, сдвиги  $pH$ . Поскольку при ишемии органов в тканях увеличивается активность НАДН-оксидаз, в присутствии O<sub>2</sub> они могут продуцировать супероксидные радикалы. Усиливающийся в этих условиях распад АТФ способствует накоплению ксантина и трансформации ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. При этом достаточно весомым механизмом является накопление в тканях Fe<sup>2+</sup>, так как накапливающиеся радикалы O<sub>2</sub> активно восстанавливают Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup>, в присутствии которого H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активно образует анион-радикал типа •OH [16]. Образование •OH, а также выход цитохрома С из митохондрий являются активными факторами, индуцирующими процессы ПОЛ, которые приводят к разрушению липидного остова мембранных структур клеток и тем

самым нарушают ионный гомеостаз клетки. Сейчас выявлено, что в процессе ПОЛ в тканях формируются антигены (окисленные липопротеиды), а также хемоттактанты, которые активируют миграцию лейкоцитов, т. е. способствуют развитию воспаления [4, 13]. Усиление процессов фосфолиполиза, связанное с нарушением структурной организации мембран и накоплением в клетке  $\text{Ca}_i^{2+}$ , а также активация мембранно-связанных лизосомальных гидролаз являются важными повреждающими факторами холодовой ишемии наряду с активными формами  $\text{O}_2$  (схема). Поэтому для снижения указанных выше повреждающих факторов весьма целесообразно добавлять в перфузат такие препараты – тушители активных форм кислорода: ловушки ОН-радикалов (этанол, маннитол, альбумин), противокислительные ферменты (СОД, каталаза, GSH-пероксидаза), хелаторы и восстановители металлов (ЭДТА, тиолы, GSH, ЭГТА, десферриоксамин, карнозин и др.).

#### УЧАСТИЕ ПОЛ И АКТИВНЫХ ФОРМ $\text{O}_2$ В ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК ПРИ ХОЛОДОВОЙ ИШЕМИИ



*Проблема органного отека и ацидоза, нарушающих метаболизм и биоэнергетику клетки*

Использование методов, способствующих частичной дегидратации органа перед его консервацией, является очевидно полезной мерой, поскольку позволяет поддерживать его гипометаболическое состояние. Известно, что диуретики способны защищать от ишемического поражения только в том случае, когда они вводятся в организм до начала нарушения или полного прекращения органного кровообращения [7]. Эффективность диуретиков снижается, если препараты назначают в постишемический период. В этих случаях даже массивные дозы не оказывают эффекта на пораженную ткань. Чаще всего диуретики используются для консервации почки, однако даже его предварительное введение не всегда приводит к предупреждению ишемических повреждений

почки. Наоборот, фуросемид может потенцировать острую печеночную недостаточность, подавлять почечную и системную гемодинамику и вызывать 100%-ю гибель животных.

Сосудорасширяющие вещества ацетилхолин и секретин увеличивают кровоток в почках, но не обладают защитным ренопротекторным действием. Маннитол, введенный до, во время и после действия на почку ишемического фактора, усиливает фильтрационный процесс. Для этакриновой кислоты угнетение клубочковой фильтрации более характерно. Новурит действует ингибирующе на функцию митохондрий, хотя сочетанное применение фуросемида и маннитола не подавляет функцию этих субклеточных органелл и поэтому хорошо защищает почки от ишемии. Таким образом, механизм предотвращения развития клеточного отека под влиянием диуретиков остается во многом невыясненным. Кроме диуретиков, для устранения избыточного отека органов могут быть использованы другие соединения. Поэтому достаточно важно при составлении растворов для гипотермической консервации органов (0–4 °C) соблюдать принцип, позволяющий устранить факторы, способствующие набуханию клеток [18]. Поскольку гипотермическая температура подавляет синтез АТФ и активность ионтранспортирующих систем ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФ-азы и  $\text{Na}^+$ -насоса), в клетке начинают накапливаться осмотически активные вещества, приводящие к аномальному перераспределению воды. Поэтому в настоящее время для борьбы с набуханием клеток широко используют осмотически активные непроникающие в клетку вещества (сахароза, маннитол, рафиноза, глюкоза, фосфорилированные углеводы) и непроникающие анионы (фосфаты, сульфаты, цитраты, глюконаты, лактобионаты) [18, 22]. Коллоидные растворы декстрана, гемоцила, гидрооксиэтил крахмала также оказывают положительное влияние при продолжительной перфузии, поскольку смягчают гидростатическое действие перфузионного потока, что уменьшает глубину и объем перфузионных разрушений.

Изоляция и последующая консервация органа может сопровождаться развитием метаболического ацидоза [14]. В физиологических условиях и при нормальной оксигенации тканей основными источниками кислых эквивалентов являются генерация углекислоты и  $\text{H}^+$  в процессе анаэробного метаболизма, а также утилизации клетками лактата. Образование  $\text{H}^+$  в клетке связано в основном с гликолитическим восстановлением никотинамидных ферментов, окислением трикарбоновых кислот, переводом  $\text{Fe}^{2+}$  в закисное, гидролизом АТФ. Сдвиги  $pH$  на 0,2 в кислую сторону являются сигналом существенных расстройств энергетического обмена и сопряженного с ним гомеостаза клетки.

В настоящее время общепризнано, что в основе метаболического ацидоза при общей или региональной гипоксии лежит перестройка энергетического обмена, обусловленная ограничением доставки  $\text{O}_2$  к клеткам. Дефицит  $\text{O}_2$  и ограничение окислительного фосфорилирования в митохондриях приводит к снижению содержания в клетках креатинфосфата (КФ), АТФ и накоплению продуктов анаэробного метаболизма восстановленных метаболитов (лактат, НАДН и др.) и протонов. По мере накопления восстановленных форм НАДН дыхательный контроль в митохондриях снижается на 50% в течение 20 мин и клетки переходят на гликолитический путь окисления. В клетке источником кислых эквивалентов, кроме гликолиза, является распад макроэргических фосфатов (деградация АТФ, КФ). Показано, что накопление лактата является достаточно информативным индикатором развития метаболического ацидоза в клетках. При  $pH$  ниже 6,6 резко угнетается активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фосфоорилазы, при  $pH$  6,2 ингибируется фосфофруктокиназа и активируется фосфолипаза. Повышение концентрации  $\text{H}^+$  ухудшает взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с белками цитоскелета и его депонирование в саркоплазматическом ретикулуме (СПР). При сдвиге  $pH$  ниже 6,6 кальций вообще не захватывается везикулами СПР.

Опыт показывает, что для различных органов существуют свои оптимальные сроки тепловой ишемии. Если сроки тепловой ишемии не превышают критических величин, то добавление в перфузат субстратов и кофакторов (глюкоза, НАД, АТФ) обычно поддерживает активность гликолиза. Если тепловая ишемия органов превышает допустимые сроки, то восстановить активность ферментов гликолиза добавкой в перфузат макроэргических или других субстратов практически невозможно, поскольку в течение этого периода времени происходит нарушение ферментных систем, регулирующих процесс гликолиза. В органах крупных животных (например, собаки) активность анаэробного гликолиза в клетках полностью подавляется спустя 30–40 мин, а в изолированной печени крыс уровень АТФ полностью регенирируется, если срок тепловой ишемии не превышал 10–20 мин.

Большую роль в поддержании энергообеспечения и устранения метаболического ацидоза ишемизированного сердца играют метаболиты пентозофосфатного цикла (ПФЦ) [6]. Введение больших доз НАДФ крысам существенно повышает их устойчивость к гипоксии, поскольку этот кофермент поддерживает активность ПФЦ. При этом тормозится продукция лактата в зоне ишемии, повышается потребление глюкозы тканями, улучшаются коллатеральное кровообращение и функция цитоскелетных белков клетки. Выявлено положительное влияние рибозы и рибозо-5-фосфата на ишемизированные клетки, в которых повышаются пул 5-фосфорибозил-1-пирофосфата и АТФ, образование глицеральдегид-3-фосфата, синтез АТФ и КФ и включение рибозо-5-фосфата в синтез гипоксантина. Фосфорилированные углеводы и фосфорные эфиры, например 5%-й гексафосфат, положительно влияют на биоэнергетику и функциональное состояние клеток, причем добавлять их целесообразно на этапе отепления органа перед его трансплантацией [3, 6, 9].

Применение аминокислот (глутаминовая, аспарагиновая), субстратов (сукцинат,  $\alpha$ -кетоглутарат) и жирных кислот (оксибутират), легко вовлекаемых в цикл Кребса, также положительно влияет на энергетический баланс клетки и оказывает антигипоксический эффект, что выражается в снижении продукции лактата в ишемизированных клетках. Снижение содержания восстановленных форм адениловых нуклеотидов – НАДН может быть достигнуто с помощью электронакцепторных соединений, которые ускоряют их окисление, например, изатина и его производных (феназинметасульфат). Выраженной активностью обладают убихиноны ( $C_{60}Q_n$ ) – их аналоги и производные, например гексагидроубихинон. Они быстро окисляют НАДН, уменьшают отношение лактат:пироват и снижают темпы распада АТФ и КФ. Заслуживают внимания вещества, усиливающие транспорт лактата во внеклеточную среду и нейтрализующие кислые эквиваленты (гиалуронидаза, маннитол, основные и буферные растворы). К числу сильнодействующих синтетических хинонов относятся производные О-бензохинона, которые улучшают течение процессов окислительного фосфорилирования и эффективно окисляют лактат (изатин и метализатин, гутимин). Из фенотиазинов целесообразно применять феназинметасульфат и метиленовый синий, которые являются средствами, разрушающими в клетках восстановленные эквиваленты (НАДН). Аскорбиновая кислота, 2,3-дегидро-гексоно-1,4-лактон способны формировать в растворе редоксистему, которая проявляет сильные антиоксидантные свойства и повышает выносливость клеток к дефициту  $O_2$ . Флавиновые переносчики (рибофлавин, флавиномононуклеотид, флавинадениннуклеотид) являются источниками окисленных флавиновых и никотинамидных соединений. Поэтому добавление в перфузат никотинамидных соединений, например пиридин-3-карбоновых кислот, будет повышать устойчивость клеток к гипоксии и снижать тяжесть метаболического ацидоза. Эти препараты также оказывают и мембраностабилизирующее действие, уменьшают активность липаз, накопление СЖК и продуктов ПОЛ.

Приведенные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что на всех этапах гипотермического хранения органов при температурах 0–4 °С возможно применение различных химических и биологических препаратов, способных ингибировать процессы набухания клеток, усиление процессов ПОЛ и активировать метаболические процессы. Дальнейшая разработка таких сочетаний препаратов с учетом аддитивного эффекта их действия, разных сроков введения, направленности на различные стадии метаболизма будет способствовать повышению эффективности длительного холодового хранения целых органов, которые так необходимы в клинической трансплантологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барабой В.А. Биологическое действие фенольных соединений. – Киев: Наук. думка, 1976. – 260 с.
2. Белоус А.М., Семенченко О.А. О возможности участия полифосфатидилинозитольного состояния белков цитоскелета при температурно-осмотическом воздействии // Проблемы криобиологии. – 1994. – № 4. – С. 3–11.
3. Биленко М.В. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и при патологии. – М.: Медицина, 1982. – 213 с.
4. Биленко М.В. Ишемическое и реперфузионное повреждение органов. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
5. Владимиров Ю.А., Арчаков Р.М. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
6. Гацура В.В. Метаболиты пентозофосфатного цикла как энергообеспечивающие противоишемические средства // Фармакол. и токсикол. – 1991. – 54, № 4. – С. 4–8.
7. Дубинцев А.В. О механизме противоишемической защиты почек диуретиками // Фармакол. и токсикол. – 1991. – 54, № 4. – С. 76–79.
8. Осипов А.Н., Азизов О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Усп. биол. химии. – 1990. – 31. – С. 180–208.
9. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Актуальные вопросы консервации органов. – М.: Наука, 1979. – 107 с.
10. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Кирпатовский В.И. Фармакологическая защита трансплантата. – М.: Медицина, 1983. – 231 с.
11. Bowler R., Fuller B. Temperature and animal cells // Symposia of the society for experimental biology: Cambridge, CB2, 1987. – 460 p.
12. Fahy G. Future directions in tissue and organ preservation // 29th annual meeting Society for Cryobiology. – Itaka, 1992. – P. 19.
13. Fuller B. Storage of cells and tissues at hypothermia for clinical use // Symposia of the Society for experimental biology. – Cambridge, CB2, 1987. – P. 341–362.
14. Fuller B., Bursa A., Proctor E. Control of pH during hypothermic liver storage: role of the storage solution // Transplantation. – 1988. – 45. – P. 239–241.
15. Fuller B., Green C. Oxidative stress in organs stored at low temperatures for transplantation // Free Radicals. Cell damage and disease. – London: Richelieu Press, 1986. – P. 223–240.
16. Fuller B., Green C., Healing G. et al. The role of iron in oxygen free radical damage during kidney storage at hypothermia // Cryobiology. – 1985. – 22. – P. 614.
17. Green C., Healing G., Simkin S. et al. Increased susceptibility to lipid peroxidation in rabbit kidneys: a consequence of warm ischemia and reperfusion // Comp. Biochem. Physiol. – 1986. – 83B. – P. 603–606.
18. Green C., Pegg D. The effect of variation in electrolyte composition and osmolarity of solutions for infusion and hypothermic storage of kidneys // Organ preservation. – 1979. – Edinburgh. – P. 86–101.
19. Halliwell B., Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. – Oxford: Clarendon Press, 1985. – 250 p.
20. Pegg D. Cryopreservation of tissues // 28th annual meeting Society for Cryobiology. – 1991. – P. 33.
21. Southard J., Gulik T., Ametani M. et al. Important components of the UW solution // Transplantation. – 1990. – 49. № 2. – P. 251–257.
22. Southard J. Impermeants and colloids // 29th annual meeting Society for Cryobiology. – Itaka, 1992. – P. 74.

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

Поступила 08.02.95

А.М.БІЛОУС, Л.П.КРАВЧЕНКО

## АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ЗАХИСТУ ОРГАНІВ ПРИ КОНСЕРВАЦІЇ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Проблеми гіпотермічної консервації органів (печінки, нирки, серця) розглядаються в аспекті ішемічного синдрому, який є пусковим механізмом розвитку молекулярно-клітинної патології. Зокрема висвітлені важлива роль процесів ПОЛ та активних форм кисню в дестабілізації мембранних структур клітини, значення органного набряку та метаболічного ацидозу в порушенні функцій систем енергозабезпечення. Описані заходи, направлені на коригування порушених систем органу в процесі консервування при допомозі різних фармакологічних препаратів.

A.M.BELOUS, L.P.KRAVCHENKO

## CURRENT PROBLEMS OF PHARMACOLOGICAL PROTECTION OF ORGANS DURING CRYOPRESERVATION

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

Problems of hypothermic preservation of organs (liver, kidney, heart) are studied from the point of view of the ischemic syndrome, which is a triggering mechanism of the development of a molecular-cellular pathology. In particular, attention is drawn to an important role of the processes of lipid peroxidation and active forms of oxygen in destabilization of membrane structures of the cell, importance of the organ swelling and metabolic acidosis in the impairment of the energy-supplying system functioning. The measures, aimed at correction of the organ systems in the process of preservation using various pharmacological preparations, are described.

УДК 616.12:615

**В.С.Марченко, Г.А.Бабийчук, А.В.Шило, В.В.Ломако, Е.В.Алтуева, Л.Н.Марченко**

## К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОХЛАЖДЕННОГО МОЗГА. Сообщение 3. Оксид азота (II) – один из триггеров проницаемости гематоэнцефалического барьера в структуре сверхмедленной управляющей системы организма?

Высказывается гипотеза о терморегуляторной функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Холодовые воздействия на крыс с обратной связью по секунднему ритму неокортекса, увеличивая мощность спектра секундного биоэлектрического ритма, приводят к существенному повышению проницаемости ГЭБ. Электронограммы показывают, что после холодových воздействий синаптический аппарат находится в состоянии напряжения, а в эндотелии микрососудов активируются процессы рецепторного трансцитоза, обнаруживаются клатриновые везикулы. Повышение проницаемости ГЭБ, возможно, обусловлено явлением долговременной потенциации в лимбической системе мозга. При этом увеличивается содержание циклических нуклеозидмонофосфатов, активируется NO-синтаза. NO, по-видимому, может выступать регулятором проницаемости ГЭБ при гипотермии.

Основные принципы работы центральной нервной системы (ЦНС) относятся к тем неблагоприятным для исследователя проблемам, которые связаны с необходимостью анализа множества одновременных структурно-функциональных взаимодействий. Но если в данном направлении исследований в обозримом будущем “действительно произойдет прорыв, то, вероятно, это будет на уровне общего управления системой” [10]. Поэтому представляется весьма актуальным изучение функциональных систем мозга, осуществляющих общую регуляцию активности и поддержание гомеостаза ЦНС, в том числе и при температурных воздействиях. Поскольку именно к таким физиологическим

механизмам не в последнюю очередь относятся ГЭБ [2, 4, 11, 12] и сверхмедленная управляющая система мозга [1, 2, 8, 12], они стали предметом изучения данной работы и представляются актуальными объектами исследования в сфере общей физиологии и криофизиологии, в частности.

Глубоко символично удивительное сходство истории изучения ГЭБ и сверхмедленных биоэлектрических процессов мозга. Первые опыты по этим проблемам были проведены почти одновременно на рубеже нашего столетия, но долгое время их результаты либо оспаривались, либо не замечались. В последние годы оба направления получили должное признание и, по нашему убеждению, будут развиваться по пути создания научной концепции, раскрывающей их роль в механизмах поддержания гомеостаза организма человека и животных. В последнее десятилетие уже сформулированы представления о сверхмедленной управляющей системе организма, которая включается в процессы регулирования, когда возмущающее воздействие чрезмерно или становится систематически действующим фактором [1, 8]. Заметим, что сдвиги сверхмедленных потенциалов прямо не связаны с функционированием системы центральной терморегуляции – при гипер- и гипотермии характер активации эффекторных процессов во многом сходен, а сила и продолжительность сдвигов сверхмедленной активности весьма различны [3]. Мы считаем более вероятной опосредованную связь сверхмедленных биоэлектрических процессов с центральными механизмами температурного гомеостаза через нейротрансмиттерную регуляцию проницаемости ГЭБ. К похожему выводу приходят и другие авторы, предполагая, что ряд структурно-функциональных изменений в системе ГЭБ при действии температурных факторов свидетельствует о его важной роли в генезе изменений сверхмедленной биоэлектрической активности [3].

Таким образом, представляется правомерной постановка вопроса о терморегуляторных функциях ГЭБ, который в свою очередь может явиться структурно-функциональной основой сверхмедленной управляющей системы организма. Поскольку эта система формируется на основе сложного нейрогуморального взаимодействия центральных и периферических звеньев [1, 8], что должно находить отражение в специфических изменениях тонкого строения тканей мозга, для ее адекватного изучения необходим комплексный подход, при котором наряду с биоэлектрическими явлениями анализируются нейрохимические процессы с учетом ультраструктурных изменений в нейроглиальных комплексах и эндотелии капилляров. Поэтому в настоящей работе предпринята попытка изучить взаимосвязь ультраструктурных изменений с нейрофизиологическими и нейрохимическими механизмами регуляции проницаемости ГЭБ охлажденного мозга в процессе формирования центральных терморегуляторных реакций организма.

Исследования были проведены на белых беспородных крысах массой 180–250 г. Краниocereбральная гипотермия с обратной связью по секундному ( $\zeta$ )-ритму ( $\zeta$  КЦГ) парами азота ( $t\ 0^\circ\text{C}$ ) осуществлялась на модифицированном аппарате для программного охлаждения, созданном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Ритмические холодовые раздражения каудальных терморцепторов (РРР) длительностью 1 с с частотой 0,1 Гц (0,1 РРР) проводили путем охлаждения хвоста животного ледяной водой ( $t\ 0^\circ\text{C}$ ) в автоматическом режиме на установке, состоящей из электрогенератора, подключенного к планшетному потенциометру, у которого каретка с пером была заменена на охлаждающее устройство. В ходе экспериментов изучали секрецию, рецепцию и проницаемость ГЭБ для  $^3\text{H}$ -норадреналина (НА),  $^3\text{H}$ -адреналина (А),  $^3\text{H}$ -ацетилхолина (АХ),  $^3\text{H}$ -серотонина (СТ),  $^3\text{H}$ -гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК); проводили электронно-микроскопические исследования нейроглиальных комплексов и элементов ГЭБ гипоталамуса, а также спектрально-корреляционный анализ биоэлектрической активности

(БЭА) (пакет программ фирмы "Medsoft", Харьков). Методические подробности описаны ранее [2, 12].

Т а б л и ц а 1

Влияние гипотермии (60 мин) на проницаемость ГЭБ

| Воздействие                                                                   | Нейро-медиа-тор | Области мозга                |                            |             |             |             |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                                                                               |                 | передние отделы гипоталамуса | задние отделы гипоталамуса | таламус     | гиппокамп   | кора        |
| Контроль наркоз, 37 °С ректальная                                             | АД              | 0,05±0,01                    | 0,06±0,01                  | 0,08±0,01   | 0,05±0,09   | 0,04±0,01   |
|                                                                               | НА              | 0,13±0,04                    | 0,16±0,05                  | 0,12±0,03   | 0,09±0,01   | 0,11±0,02   |
|                                                                               | АХ              | 0,12±0,03                    | 0,09±0,02                  | 0,13±0,04   | 0,09±0,009  | 0,1±0,03    |
|                                                                               | СТ              | 0,04±0,01                    | 0,05±0,01                  | 0,04±0,01   | 0,03±0,006  | 0,03±0,006  |
|                                                                               | ГАМК            | 0,07±0,01                    | 0,08±0,01                  | 0,09±0,01   | 0,05±0,005  | 0,085±0,01  |
| КЦГ, 32 °С ректальная                                                         | АД              | 0,16±0,01                    | 0,21±0,02                  | 0,14±0,01   | 0,14±0,02   | 0,11±0,01   |
|                                                                               | НА              | 0,24±0,03                    | 0,3±0,03                   | 0,3±0,05    | 0,2±0,02    | 0,27±0,04   |
|                                                                               | АХ              | 0,39±0,08                    | 0,38±0,07                  | 0,53±0,06   | 0,21±0,04   | 0,22±0,03   |
|                                                                               | СТ              | 0,05±0,01                    | 0,03±0,01                  | 0,03±0,01   | 0,02±0,004  | 0,05±0,009  |
|                                                                               | ГАМК            | 0,08±0,01                    | 0,09±0,01                  | 0,1±0,01    | 0,056±0,01  | 0,1±0,01    |
| ζ-КЦГ, 32 °С ректальная                                                       | АД              | 0,71±0,05                    | 1,26±0,09                  | 1,24±0,09   | 1,04±0,06   | 1,24±0,09   |
|                                                                               | НА              | 0,56±0,08                    | 1,3±0,2                    | 1,02±0,1    | 0,77±0,09   | 1,2±0,1     |
|                                                                               | АХ              | 0,65±0,08                    | 0,48±0,07                  | 0,63±0,01   | 0,41±0,06   | 1,17±0,1    |
|                                                                               | СТ              | 0,46±0,05                    | 0,44±0,05                  | 0,53±0,07   | 0,43±0,06   | 0,58±0,08   |
|                                                                               | ГАМК            | 0,5±0,05                     | 0,45±0,05                  | 0,5±0,06    | 0,4±0,05    | 0,6±0,07    |
| 0,1 РРР, 37–35 °С ректальная                                                  | АД              | 0,52±0,06                    | 0,31±0,05                  | 0,51±0,05   | 0,43±0,03   | 0,51±0,05   |
|                                                                               | НА              | 0,5±0,04                     | 0,4±0,02                   | 0,5±0,04    | 0,4±0,03    | 0,6±0,06    |
|                                                                               | АХ              | 0,45±0,01                    | 0,4±0,02                   | 0,3±0,02    | 0,25±0,02   | 0,4±0,03    |
|                                                                               | СТ              | 0,02±0,003                   | 0,024±0,004                | 0,03±0,004  | 0,015±0,003 | 0,025±0,004 |
|                                                                               | ГАМК            | 0,02±0,004                   | 0,023±0,004                | 0,028±0,005 | 0,014±0,003 | 0,025±0,005 |
| Локальная гипотермия коры, 37 °С ректальная                                   | НА              | 0,13±0,05                    | 0,12±0,05                  | 0,09±0,02   | 0,13±0,05   | 0,05±0,01   |
| Локальная гипотермия передних отделов гипоталамуса 37–34 °С, 39 °С ректальная | НА              | 0,33±0,06                    | 0,28±0,05                  | 0,29±0,05   | 0,28±0,04   | 0,24±0,03   |

В предыдущем сообщении уже были приведены некоторые факты, свидетельствующие о взаимообусловленности процессов повышения проницаемости ГЭБ охлажденного мозга и усиления пространственной синхронизации ζ-ритма БЭА. Однако дискуссионным оставался вопрос о возможном прямом действии холода на ЦНС, сходным образом влияющего на оба процесса. В связи с этим, нами проведены эксперименты по местному охлаждению некоторых структур мозга. И если суперфузия с помощью push-pull-канюли холодным (порядка 5–10 °С) раствором Кребса-Рингера различных участков неокортекса ( $\Delta t$  3–5 °С) не влияла на ГЭБ, то локальное охлаждение гипоталамуса повышало проницаемость барьера для  $^3\text{H}$ -НА (табл.1). Можно предположить, что для изменения проницаемости ГЭБ важно не столько изменение температуры нервной ткани само по себе, сколько повышение активности, в частности, гипоталамических центров терморегуляции. Оставалось оценить роль и "степень специфичности" в этом процессе сверхмедленной активности головного мозга. Поэтому в новой серии экспериментов нами применено холодное воздействие с обратной связью по ζ-ритму (ζКЦГ, ректальная  $t$  32 °С), при котором максимально повышалась проницаемость ГЭБ (табл. 1), причем в спектре БЭА доминировал секундный ритм с частотой 0,1–0,2 Гц. Теперь можно было с большей определенностью говорить о взаимосвязях в функционировании ГЭБ и сверхмедленной управляющей системы мозга, так как у контрольных крыс, охлаждаемых точно таким же, но "чужим" ζ-ритмом подопытных животных, проницаемость ГЭБ существенно не возрастала, оставаясь на

несколько повышенном уровне, характерном для классической КЦГ до 32 °С (табл. 1).

Тем не менее при  $\xi$ КЦГ, возможно, нарушаются, а значит, не могут быть адекватно изучены естественные физиологические механизмы центральной терморегуляции. При таком воздействии происходит скорее “аварийное открытие” ГЭБ для всех изученных нами нейротрансмиттеров, участвующих в прямо противоположных терморегуляторных процессах обеспечения как теплопродукции, так и теплоотдачи (табл. 1). Поэтому в дальнейших исследованиях применялся более “мягкий” способ ритмического холодового раздражения каудальных рецепторов с частотой 0,1 Гц (0,1 РРР). В этом случае температура тела не опускалась ниже 35 °С, а проницаемость ГЭБ повышалась адекватно воздействию для тех медиаторов, которые участвуют в повышении теплопродукции (НА, АХ, АД), и не изменялась для нейротрансмиттеров, опосредующих теплоотдачу (СТ, ГАМК) (табл. 1). Примечательно, что обычная КЦГ до ректальной температуры 35 °С не изменяет проницаемость ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА [2].

Эти данные хорошо согласуются с существующими моделями центральной терморегуляции [2, 16], исходя из которых можно, например, объяснить более высокую проницаемость ГЭБ для АХ по сравнению с НА при КЦГ (табл. 1) тем, что АХ непосредственно активизирует механизм обеспечения теплопродукции, в то время как НА, действуя опосредованно, усиливает доминирующий нейрохимический процесс. При 0,1 РРР проявляются и некоторые особенности структурной специализации центральных функциональных систем обеспечения температурного гомеостаза. Так, в передних отделах гипоталамуса наблюдается достоверно более высокий коэффициент проницаемости ( $K_p$ ) для нейромедиаторов по сравнению с задним гипоталамусом (табл. 1). На первый взгляд, это расходится с представлением об участии задних отделов гипоталамуса в процессе обеспечения теплопродукции. Однако данные литературы свидетельствуют о наличии в передних отделах гипоталамуса специфической термоафферентной системы, реагирующей как на сдвиг “установочной точки” температуры гипоталамуса, так и на температурные раздражения периферических терморепцепторов. В случае ритмических холодовых воздействий влияние холодового фактора проявляется значительно слабее, чем при КЦГ, поэтому мы не наблюдаем характерного для гипотермии до 32 °С (табл. 1) преобладания повышенной проницаемости в области задних отделов гипоталамуса. Интересно отметить, что в гиппокампе, единственной из исследуемых нами структур с резко сниженным показателем площади поверхности капилляров на 1 мм<sup>2</sup> ткани [11],  $K_p$  достаточно высок. Тогда с учетом степени васкуляризации истинная проницаемость ГЭБ в гиппокампе должна превышать таковую в гипоталамусе, мозжечке, таламусе и неокортексе в 2–3 раза. По нашему мнению, этот факт можно связать с явлением долговременной потенциации, которая представляет собой устойчивое усиление нейрональной передачи в синапсах после тетанической активизации афферентных путей [9] и еще более усиливается при снижении температуры [18]. Долговременная потенциация лежит в основе длительных следовых явлений регистрации информации и наиболее характерна для гиппокампальных нейронов [9]. Таким образом, появляются некоторые основания утверждать, что гипотермические воздействия, направленные на усиление сверхмедленных физиологических процессов, активизируют специфические нейрохимические терморегуляторные реакции организма.

Дальнейший анализ результатов экспериментов показал, что при 0,1 РРР повышение проницаемости ГЭБ происходит периодически и сохраняется по крайней мере 48 ч, причем максимумы повышенной проницаемости отмечаются через 24 ч, каждые 9–10 ч, 3–4 ч, 55–60 мин, 15–20 мин и 5 мин. Спектрально-корреляционный анализ БЭА при этом воздействии выявил домини-

рование тета- и дельта-ритма в электроэнцефалограмме (ЭЭГ), усиление сверхмедленной активности секундного и декаминутного диапазона, а также часовые “качания” постоянного потенциала (ПП).

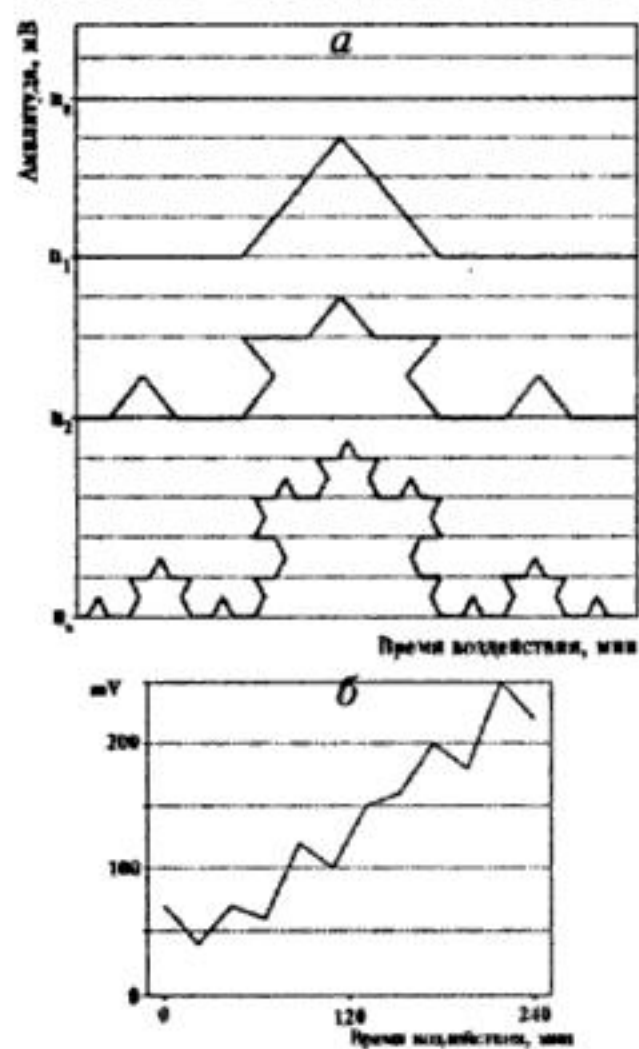


Рис. 1. Построение триадной кривой Коха (а) и динамика постоянного потенциала БЭА (ПП) (б) при 0,1 РРР:  $p_0$  – единичный отрезок (затравка),  $p_1$  – образующий элемент,  $p_n$  – поколение кривой (предфрактал)

Оба процесса в первом приближении математически хорошо описываются триадной кривой Коха (рис. 1), если ее образующему элементу поставить в соответствие максимумы проницаемости ГЭБ и БЭА, а исходный единичный отрезок (затравку) считать равной 48 ч, в течение которых сохраняются изменение в БЭА и повышенная проницаемость ГЭБ (табл. 2). Триадная кривая Коха – это один из стандартных примеров фрактальных кривых (фракталом называется структура или процесс, состоящий из частей, которые в каком-то смысле подобны целому и имеют дробную размерность). Такая структура или процесс выглядят одинаково в различных масштабах или в различных по продолжительности интервалах времени [7, 14] (рис. 2). В ЦНС примером фрактальной структуры могут быть нейроны, а фрактального процесса – БЭА [7]. Можно предположить, что при ритмических холодовых воздействиях динамика БЭА и проницаемости ГЭБ приобретают одинаковую геометрию, характеризующуюся фрактальной размерностью порядка 1,3, так как размерность самоподобия триадной кривой Коха равна 1,263 [14]. Если это так, то оба процесса могут иметь сходным образом организованную структурную основу.

Т а б л и ц а 2

Теоретические и экспериментальные временные параметры максимумов ритмики БЭА и проницаемости ГЭБ при охлаждении

| Периоды доминирующих колебаний |                                                |                                                    |
|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Триадная кривая Коха           | БЭА                                            | Проницаемость ГЭБ                                  |
| 48 ч                           | Сохраняются изменения                          | Сохраняется повышенная проницаемость               |
| 24 ч                           | То же                                          | Порядка 24 ч                                       |
| 8 ч                            | То же                                          | Порядка 9–10 ч                                     |
| 2 ч 40 мин                     | Нерегулярные изменения ПП 2–3 ч                | Порядка 3–4 ч                                      |
| 53 мин                         | “Часовые качания” ПП 40–60 мин                 | 55–60 мин                                          |
| 18 мин                         | Декаминутный ритм 15–20 мин                    | Слабо выраженные колебания проницаемости 15–20 мин |
| 6 мин                          | Не исследовано                                 | Нерегулярный ритм 5 мин                            |
| 2 мин                          | То же                                          | Не исследовано                                     |
| 39,5 с                         | То же                                          | То же                                              |
| 13,2 с (0,08 Гц)               | ζ-ритм (0,1–0,5 Гц), 10 с (0,1 Гц)             | То же                                              |
| 4,4 с (0,23 Гц)                | 5 с (0,2 Гц)                                   | То же                                              |
| 1,5 с (0,68 Гц)                | Дельта-ритм (0,5–3 Гц)<br>1,7–2 с (0,5–0,6 Гц) | То же                                              |
| 0,5 с (2 Гц)                   | 0,5–1 с (1–2 Гц)                               | То же                                              |
| 0,16 с (6,3 Гц)                | Тета-ритм (4–8 Гц)<br>0,14–0,17 с (6–7 Гц)     | То же                                              |

Известно, что в генезе БЭА важная роль принадлежит синаптическим структурам, а проницаемость ГЭБ во многом определяется особенностями эндотелиальных клеток капилляров мозга. Обе структуры, по нашему мнению, в качестве удобного приближения могут рассматриваться как масштабно инвариантные фракталы аналогично тому, как в традиционной морфо- и стере-

ометрии используются гладкие кривые и поверхности. Анализ электроннограмм показал, что при повышении проницаемости ГЭБ геометрия ультраструктуры эндотелиальных клеток капилляров мозга и геометрия распределения синаптических пузырьков активных синапсов становятся удивительным образом сходными (рис. 2, 3). Причем, если ультраструктура эндотелия капилляров кажется “более рыхлой”, менее упорядоченной, о чем может свидетельствовать увеличение фрактальной размерности ( $D$ ) с 1,1 до 1,3, то распределение синаптических пузырьков приобретает большую упорядоченность ( $D$  понижается до 1,3). В малоактивных синапсах  $D$  лежит в пределах 1,7–1,8 (для сравнения, размерность кластеров случайным образом распределенных частиц коллоидного золота, проанализированных с помощью электронного микроскопа, равна  $1,7 \pm 0,1$  [14]).

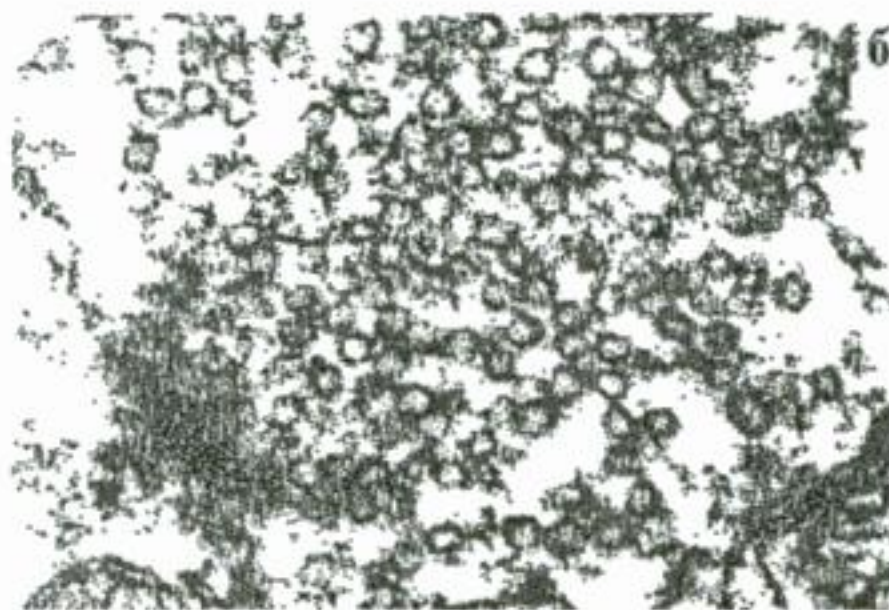
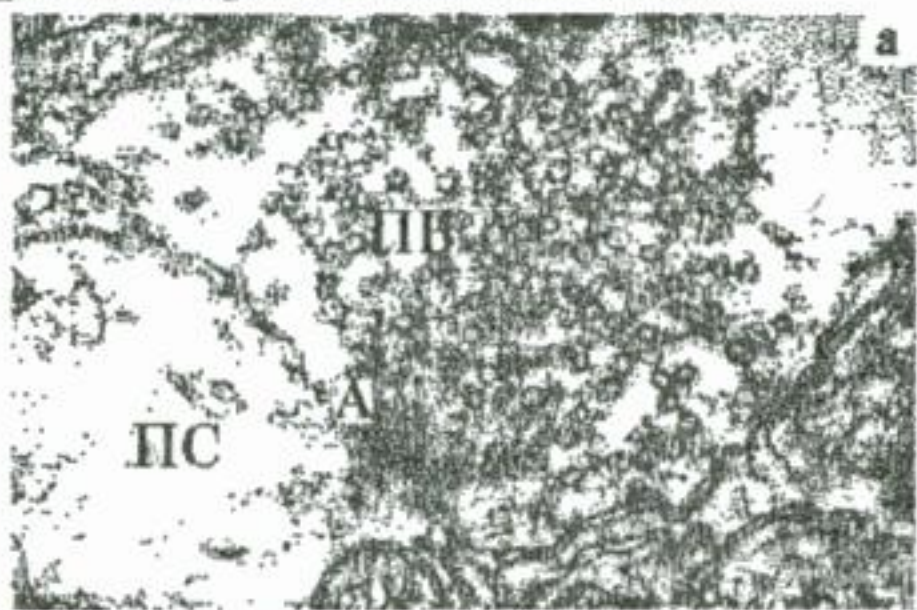
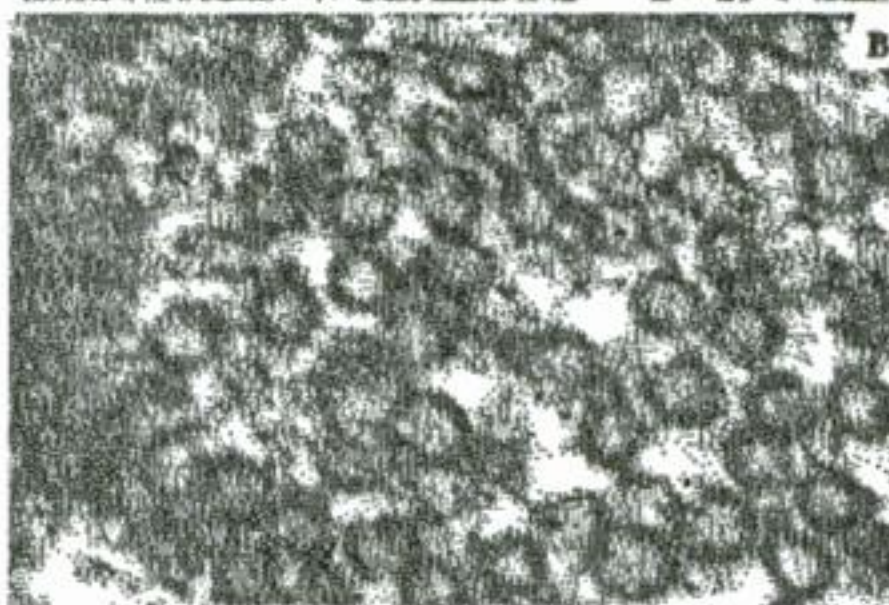


Рис. 2. Ультраструктура активного синапса гипоталамуса при 0,1 PPP: ПБ – присинаптический бутон, заполненный синаптическими пузырьками; ПС – постсинаптические структуры; А – активная зона синапса.  $\times 100\,000$  (а).  $\times 150\,000$  (б).  $\times 300\,000$  (в). Уменьшение при репродуцировании 2/3



Таким образом, повышение проницаемости ГЭБ происходит тогда, когда “синхронизируется” геометрия эндотелиальных клеток, синапсов, БЭА и динамики проницаемости ГЭБ. Эти структуры и процессы приобретают одинаковую фрактальную размерность 1,3, т.е., возможно, становятся в равной степени упорядоченными. Для обеспечения и поддержания такого структурно-функционального состояния ЦНС необходимо наличие синхронизирующего механизма или фактора, обеспечивающего процессы общности нейрональной коммуникации. Такой фактор нейрональной пластичности должен обладать свойством быстрой межклеточной диффузии, быть специфическим физиологически активным веществом, а его метаболизм – иметь секундную ритмику. По нашему мнению, этим критериям мог бы соответствовать биоактивный, легко диффундирующий “нейрональный газ”.

Недавно установлено, что важным посредником физиологических процессов во многих клетках и органах может являться свободно радикальный газ – оксид азота (II) [13]. В сердечно-сосудистой системе NO – важный компонент расслабления кровеносных сосудов, а в мозге он представляет новый тип мессенджера, который обеспечивает, например, нейротрансмиттерные процессы типа долговременной потенциации [17], что может играть определенную роль в механизмах терморегуляции. Синтез NO из L-аргинина при помощи конститутивной и/или индуцируемой синтазы оксида азота – это широко распространенный путь регуляции клеточных функций и взаимодействий [13, 17]. Для ЦНС более характерна (или лучше изучена?) конститутивная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая NO-синтаза, которая освобождает небольшое количество NO

в течение короткого периода времени (время полужизни 6–10 с) [15, 17]. Таким образом, оксид азота может быть одним из факторов нейрональной пластичности, обеспечивающих терморегуляторные функции ГЭБ. В связи с этим дальнейшие исследования были направлены на подтверждение данных положений.

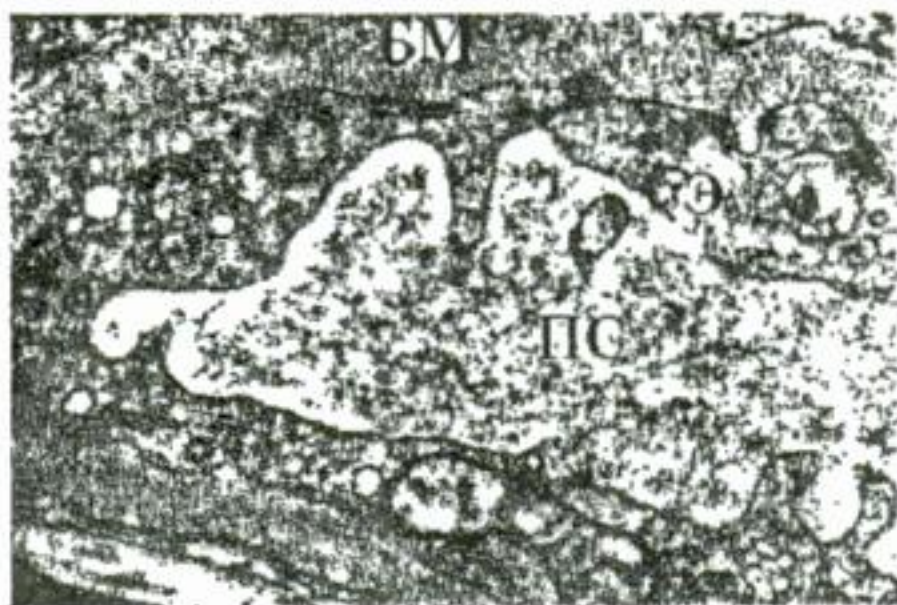


Рис. 3. Ультраструктура кровеносного капилляра гипоталамуса после 0,1 RPP: ПС – просвет сосуда, БМ – базальная мембрана, Э – эндотелиоцит.  $\times 25\,000$ . Уменьшение при репродукции 2/3

В предыдущих работах было показано, что начальный этап гипотермии характеризуется некоторыми компонентами неспецифической активации функциональных систем организма: в крови увеличивается содержание биогенных аминов, активируются адренорецепторы и аденилатциклазная система, повышается аккумуляция  $\text{Ca}^{2+}$ . Эти процессы неизбежно должны вести к стимуляции синтеза оксида азота [19]. Повышенное содержание NO может влиять на белки цитоскелета, изменяя ультраструктуру эндотелиоцитов в сторону облегчения процессов эндоцитоза.

Действительно, анализ электронограмм показал увеличение количества везикул в эндотелиоцитах капилляров мозга. При этом не наблюдалась активация функциональной системы ГЭРЛ (комплекс Гольджи, эндоплазматический ретикулум, лизосомы), что может свидетельствовать об усилении процессов транцитоза. Очевидно, именно этот процесс обеспечивает первое “стресс-обусловленное” повышение проницаемости ГЭБ (рис. 4). На этом этапе гипотермического воздействия проницаемость ГЭБ не достигает своего максимального уровня из-за того, что оксид азота находится *еще не в оптимальной* концентрации, так как стимуляция синтеза NO внутрибрюшинным введением L-аргинина (1 мг/100 г) увеличивает проницаемость ГЭБ до уровня второго максимума проницаемости (рис. 4), а блокада  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов фентоламином и пропранололом (1 мг/100 г) или  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы оубаином (1 мг/100 г) снижает проницаемость ГЭБ до уровня контроля (рис. 5).

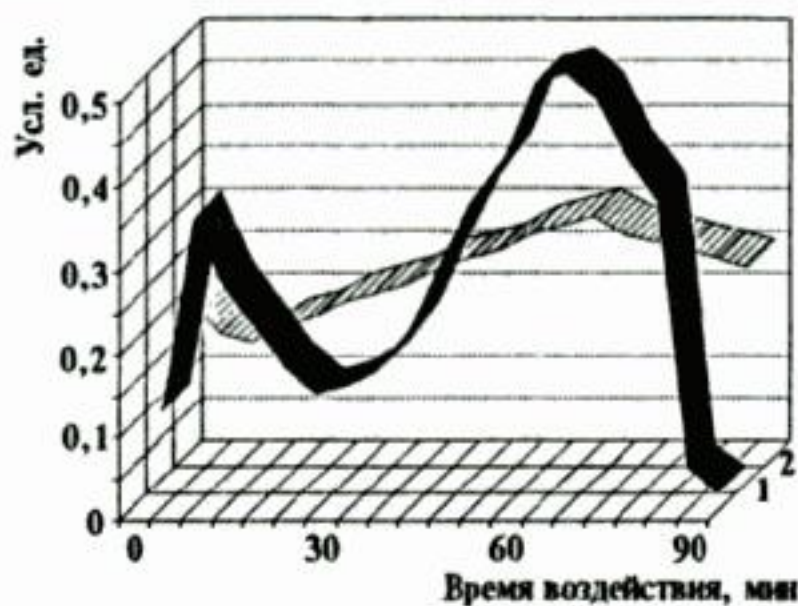


Рис. 4. Проницаемость ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА и содержание цАМФ в динамике 0,1 RPP: 1 – проницаемость ГЭБ, 2 – содержание цАМФ

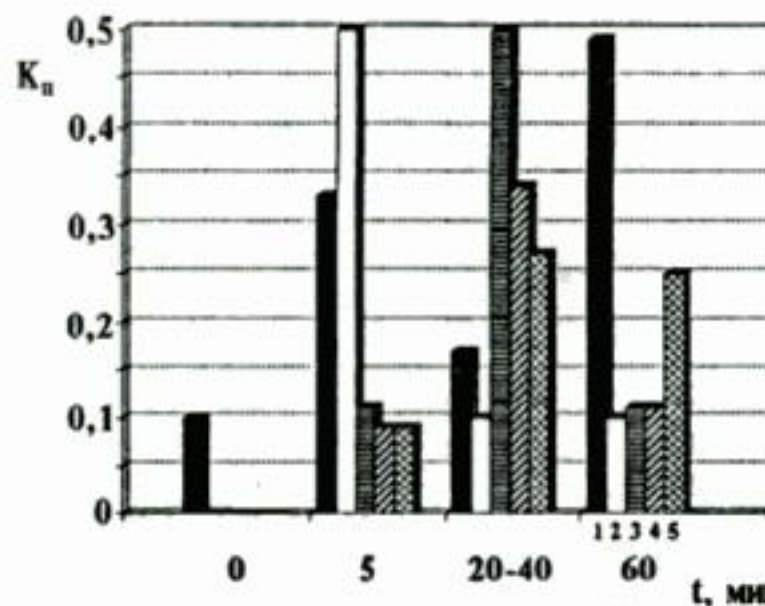


Рис. 5. Проницаемость ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА при 0,1 RPP на фоне фармакологических воздействий: 1 – проницаемость ГЭБ при 0,1 RPP, 2 – проницаемость ГЭБ при 0,1 RPP + L-аргинин, 3 – проницаемость ГЭБ при 0,1 RPP + оубаин, 4 – проницаемость ГЭБ при 0,1 RPP + фентоламин, 5 – проницаемость ГЭБ при 0,1 RPP + пропранолол

Повышение проницаемости ГЭБ для  $^3\text{H}$ -НА способствует включению компенсаторных механизмов ЦНС. Происходит увеличение секреции НА и глутамата (рис. 4), что на фоне повышенной проницаемости ГЭБ для НА уси-

ливаает процесс долговременной потенциации. Об этом свидетельствует изменение ультраструктурных особенностей обеспечения нейросинаптической передачи: структурируется постсинаптическая организация нейронов по типу шипикового аппарата (рис. 2, а). Этот комплекс нейрофизиологических процессов приводит к повышению концентрации NO, возникают изменения ультраструктуры, активирующие систему ГЭРЛ, что ведет к снижению процессов транскрипции и уменьшению уровня проницаемости ГЭБ. В этот момент NO, возможно, находится уже не в оптимальной для обеспечения состояния повышенной проницаемости ГЭБ концентрации. В отличие от начального этапа охлаждения стимуляция синтеза NO L-аргинином ведет к дальнейшему снижению проницаемости, а опосредованное подавление синтеза оксида азота оубаином и блокаторами адренорецепторов – к увеличению проницаемости барьера.

Дальнейшее повышение функциональной активности НА стимулирует термоспецифические реакции ЦНС. Происходит десенсибилизация адренорецепторов, угнетается процесс долговременной потенциации, а значит, снижается уровень NO. В цитоплазме эндотелиоцитов отмечается появление специфических (одетых) везикул, что в комплексе с данными о повышении концентрации цАМФ в ткани мозга (рис. 4) свидетельствует об усилении рецепторного транскрипции. На этом этапе концентрация NO, очевидно, находится на почти оптимальном для состояния повышенной проницаемости ГЭБ уровне, так как экспериментальное повышение и понижение содержания NO уменьшает проницаемость ГЭБ (рис. 4). Однако более мягкое воздействие на синтез NO внутрибрюшинным введением аспарагина (1 мг/на 100 г), увеличивающего концентрацию оксида азота опосредованно через аргининосукцинат, ведет к максимальному увеличению проницаемости ГЭБ до уровня, характерного для  $\zeta$ -КЦГ.

Таким образом, экспериментальные воздействия на синтез NO при 0,1 RPP существенно изменяют динамику проницаемости ГЭБ. А в предыдущем сообщении было показано, что в аналогичных условиях серьезно нарушается и рисунок БЭА. Процессы рассогласовываются и даже в приближении уже не могут быть описаны одной, например триадной кривой Коха. При возрастании концентрации оксида азота происходит повышение проницаемости ГЭБ, но превышение оптимального уровня ведет к снижению специфической проницаемости, т.е. NO может быть своеобразным триггером этих процессов. Кажется вполне вероятным, что оксид азота (II) играет некоторую роль в синхронизации биоэлектрической, нейрохимической и ультраструктурной организации функциональной системы терморегуляции организма. Во всяком случае, не вызывает сомнения тот факт, что NO – это сильный нейрональный эффектор, чья роль в физиологии и патофизиологии мозга еще только начинается изучаться. Для подтверждения вышеприведенных предположений необходима дополнительная информация и новые исследования функциональной роли в изучаемых процессах всех основных терморегуляторных нейромедиаторов и не только при искусственном охлаждении, но и при естественной гипотермии. Этим проблемам будет посвящено следующее сообщение.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аладжалова Н.А. Психофизиологические аспекты сверхмедленной ритмической активности головного мозга – М.: Наука, 1979. – 213 с.
2. Бабийчук Г.А., Марченко В.С., Ломакин И.И., Белостоцкий А.Е. Нейрофизиологические процессы охлажденного мозга. – Киев: Наук. думка, 1992. – 207 с.
3. Белявский Е.М., Арчакова Р.И., Нетукова Н.И. Структурно-функциональная организация центра терморегуляции в нормальных условиях и при развитии лихорадки // Вегетативная нервная система в регуляции функций. – Минск: Наука и техника, 1989. – С. 18–43.
4. Бредбери М. Концепция гематоэнцефалического барьера. – М.: Медицина, 1983. – 480 с.

5. Булдакова С.Л., Дутова Е.А., Ивлев С.В. Вызванная температурой длительная потенция в срезах гиппокампа // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1993. – 29, № 4. – С. 364–370.
6. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. – М: Высшая школа, 1987. – 94 с.
7. Голдберг Э.Л., Ричи Д.Р., Уэст Б.Д. Хаос и фракталы в физиологии человека // В мире науки. – 1990. – № 4. – С. 25–32.
8. Илюхина В.А. Физиология функциональных состояний головного мозга человека в норме и при патологии // Механизмы деятельности мозга человека. Ч. 1. Нейрофизиология человека – Л.: Наука, 1988. – 563 с.
9. Кендел Э.Р., Хокинс Р.Д. Биологические основы обучения и индивидуальности // В мире науки. – 1992. – №11–12. – С. 43–51.
10. Крик Ф. Мысли о мозге // Мозг. – М.: Мир, 1987. – С. 257–275.
11. Майзелис М.Я. Гематоэнцефалический барьер и его регуляция – М.: Медицина, 1973. – 182 с.
12. Марченко В.С., Бабийчук Г.А., Ломако В.В. и др. Общий подход к проблеме повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера и холодовой устойчивости организма // Проблемы криобиологии. – 1994. – № 4. – С. 24–32.
13. Солодков А.П., Божко А.П. Изменение активности эндотелиоцитов коронарных сосудов под влиянием стресса // Физиол. журнал им. И.М.Сеченова. – 1994. – 80, № 4. – С. 65–71.
14. Федер Е. Фракталы. – М: Мир, 1991. – 260 с.
15. Berridge M.J., Galione A. Cytosolic calcium oscillators // FASEB J. – 1988. – 2, № 15. – P. 3074–3082.
16. Bligh J. The central neurology of mammalian thermoregulation // Neurosci. – 1979. – № 4. – P. 1213–1236.
17. Chabrier P.-E., Demerle-Pallardy C., Braquet P. Potential physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the brain // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1992. – № 4. – С. 31–33.
18. Dahl D., Scorvey J.M. Norepinephrine induces pathway – specific long-lasting potentiation and depression in hippocampal dentata gyrus // Proc. Nat. Acad. SciUSA. – 1989. – 86, № 12. – P. 4776–4780.
19. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin // Biochem. Pharmacol. – 1989. – 38. – P. 1709–1715.

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

Поступила 23.03.95

В.С.МАРЧЕНКО, Г.О.БАБІЙЧУК, О.В.ШИЛО, В.В.ЛОМАКО, О.В.АЛТУЄВА,  
Л.М.МАРЧЕНКО

**ДО МЕХАНІЗМІВ РЕГУЛЯЦІЇ ПРОНИКНОСТІ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ ОХОЛОДЖЕНОГО МОЗКУ. Повідомлення 3. Оксид азоту (II) – один з тригерів проникності ГЕБ в структурі надповільної управляючої системи мозку?**

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Висловлюється гіпотеза про терморегуляторну функцію ГЕБ, який може бути структурно-функціональною основою надповільної управляючої системи організму. Холодовий вплив на щурів із зворотним зв'язком за секундним ритмом неокортексу, який збільшує потужність спектру секундного біоелектричного ритму, веде до істотного підвищення проникності ГЕБ. Електронограми показують, що після холодкових впливів синаптичний апарат знаходиться у стані напруги, а у ендотелії мікросудин активізуються процеси рецепторного трансцитозу, виявляються клатринові везикули. Підвищення проникності ГЕБ, можливо, обумовлено явищем довгочасної потенціації у лімбічній системі мозку. При цьому підвищується рівень циклічних нуклеозидмонофосфатів, активізується NO-синтаза. NO, певно, може виступати регулятором проникності ГЕБ при гіпотермії.

V.S.MARCHENKO, G.A.BABIYCHUK, A.V.SHILO, V.V.LOMAKO, E.V.ALTUYEVA,  
L.N.MARCHENKO

**ON THE MECHANISMS OF REGULATION OF BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY OF THE COOLED BRAIN. Report III. Is nitric oxide one of the triggers of BBB permeability in the structure of the supraslow controlling system of the brain?**

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

The authors hypothesize on the thermoregulatory function of the BBB, which may be a structure-functional basis of the supralow controlling system of the organism. Cold exposures of rats with a feedback

by a seconds' rhythm of the neocortex, while increasing a spectral power of the seconds' bioelectrical rhythm, result in a considerable increase in the BBB permeability. The electrongrams demonstrate that after cold exposures the synaptic apparatus is in a state of tension, while the endothelium of microvessels witnesses the activation of the processes of a receptor transcytosis, and appearance of coated vesicles. A rise in the BBB permeability, apparently, is due to the event of a long-term potentiation in the limbic brain system. The content of cyclic nucleoside monophosphates is increased, and NO-synthase is activated. Apparently, NO may act as a regulator of the BBB permeability during hypothermia.

УДК 615.361.018.46.014.41

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

## **МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК; ВОЗМОЖНАЯ ИХ МОДИФИКАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ. Часть I**

Обзор литературных и полученных на основании собственных исследований данных о структуре ряда поверхностных молекул кроветворных клеток разного уровня дифференцировки и их роли в регуляции функционального состояния гемопоэтических предшественников. Обсуждается возможность изменения экспрессии антигенов и функциональной активности рецепторных структур на кроветворных предшественниках после криоконсервирования в качестве одной из причин изменения защитного действия трансплантируемого криоконсервированного костного мозга.

Установленный факт “аномального” восстановления гемопоэза реципиентов криоконсервированного костного мозга определяет необходимость детального анализа ситуации и выяснения причин наблюдаемых изменений. Известно, что своевременное начало функционирования миелотрансплантата является важным составным компонентом успеха применения гемопоэтической ткани, и что данный параметр трансплантата в первую очередь определяется сохранением структурно-функциональных свойств полипотентных кроветворных клеток. Высказываются предположения о том, что изменения функционального состояния криоконсервированного миелотрансплантата могут быть обусловлены нарушением метаболической активности, развитием нелетальных повреждений в кроветворных клетках, модификацией количественных и качественных параметров регуляторных популяций миелотрансплантата [2]. Вместе с тем нельзя не учитывать возможных изменений структурной организации пула родоначальных кроветворных клеток в результате действия холода, в частности, состояния их рецепторного аппарата, акцептирующего широкий спектр регуляторных сигналов. Именно эти мембранные молекулы являются рецепторами локальных и дистантных ростовых регуляторных факторов, частью аппарата сигнальной трансдукции, ферментами, расщепляющими лиганд, структурами, ответственными за адгезию и взаимодействие с аксессуарными клетками, включая стромальные элементы микроокружения *in situ*, а также миелотрансплантата [6]. Хотя с помощью ряда иммунологических приемов и широкого набора моноклональных антител (МАТ) идентифицированы различные антигенные мембранные структуры кроветворных предшественников разной степени зрелости, функции многих молекул остаются неизвестными. В этой связи следует отметить, что констатация факта наличия тех или иных мембранных структур кроветворных предшественников является, очевидно, не самоцелью, а ступенью к расшифровке сложного механизма регуляции гемопоэза, участия в этих процессах других жизнеобеспечивающих систем организма, например ЦНС и эндокринной.

Есть ли на кроветворных предшественниках антигены (АГ) главного комплекса гистосовместимости и какова их роль? Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о наличии на стволовых кроветвор-

ных клетках (СКК) мышей антигенных детерминант, кодируемых К и D областями H-2 комплекса [36]; этим же локусом кодируется и продукция антигена на иммунокомпетентных клетках. В этой связи высказывается предположение, что на определенных стадиях дифференцировки кроветворных клеток уже заложены предпосылки для их взаимодействия с иммунокомпетентными клетками, оказывающими, как известно, существенное влияние на функциональную активность кроветворных клеток. В пользу такого предположения может свидетельствовать факт наличия на кроветворных клетках LFA-структур – лигандов для молекулы CD2 (поверхностных структур незрелых Т-клеток), что указывает на возможность непосредственного контакта кроветворных клеток с регуляторными популяциями [23].

Через антиген H-2 комплекса осуществляется также влияние на коммитированные предшественники (КОЕ-ГМ) простагландинов и изоферритина. Необходимо отметить, что плотность H-2 АГ неодинакова у различных субпопуляций СКК; около 80% клеток имеют высокую плотность АГ, до 10–15% — низкую и около 5% вообще не чувствительны к действию сыворотки и комплемента. Причем безантигенная фракция КОЕ<sub>с</sub> в такой же степени чувствительна к действию фазоспецифических агентов (оксимочевине), как и основная часть СКК, и имеет такую же способность к самоподдержанию. Вместе с тем физиологическая роль антигенов H-2 в осуществлении межклеточных контактов, обуславливающих регуляцию пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток, не вызывает сомнения. Так, введенные в организм облученного реципиента СКК начинают активно пролиферировать уже через 1 ч после трансплантации костного мозга [3]. В аналогичной ситуации, но антигенмодулированные СКК, лишенные H-2 АГ, начинают пролиферировать только через 3 ч после трансплантации, когда вновь экспрессируются на мембране H-2 АГ. Интересно, что к данному классу антигенов не относятся рецепторы, ответственные за “хоминг” (расселение) кроветворных предшественников. При этом надо отметить, что исследование механизма “хоминга”, опосредующего взаимодействие между кроветворной клеткой-предшественником и стромальной клеткой, затруднено из-за отсутствия необходимых молекулярных методов, которые позволили бы исследовать специфичность этого процесса на уровне лиганд-рецепторных взаимодействий. Природа этого явления неизвестна. Работы с использованием лектиновых митогенов [34] подтвердили, что молекулярная основа распознавания и хоминга включает взаимодействие мембранного лектина и соответствующей конформации определенных углеводных групп мембранного гликоконъюгата, приводящее к селективному заселению стволовыми кроветворными клетками соответствующих участков микроокружения.

Исследованиями с помощью искусственно синтезированных неогликопротеинов (представляющих собой ковалентно связанные Р-аминофенил производные биологически активных моносахаридов – N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы (Гл), фукозы в пиранозной форме к бычьему сывороточному альбумину (БСА)), которые за счет конкурентного связывания блокируют взаимодействие лектина и гликоконъюгата, было не только подтверждено опосредование хоминга лектин-углеводными взаимодействиями, но и участие маннозной и галактозной частей при хоминге. Именно в пробах с Гл-БСА отмечалось ингибирование хоминга стволовых клеток. Эффективность заселения костного мозга, определяемая как концентрация КОЕ<sub>с</sub> в костном мозге спустя 2 и 24 ч после трансплантации, снижалась. Восстановление гемопоэза, определяемое составом клеток костного мозга и концентрациями КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ-ГМ спустя неделю после трансплантации, замедлялось [34].

С помощью метода селективной агглютинации было установлено, что мембранные лектины присутствуют на всех предшественниках костного мозга. Кроме того, было обнаружено, что КОЕ<sub>с</sub> и КОЕ-ГМ селективно агглютини-

ровали в присутствии неогликопротеинов с галактозной и маннозной специфичностями [34].

На стромальных клетках лектин отсутствует, что выявлено с помощью  $^{125}\text{I}$ -метки и связывающих проб. При этом отсутствие лектина показано не только на стромальных клетках в длительной культуре костного мозга, которые могут быть гетерогенны по природе, но также на клетках стромальной линии D2X. Мембранные лектины кроветворных предшественников взаимодействуют с соответствующим углеводным остатком (гликоконъюгатом) на стромальных клетках. Природа этих гликоконъюгатов точно не известна, но показана необходимость их присутствия для связывания предшественников со стромой. Так, обработка мембран клеток стромальной линии галактозидазой и маннозидазой отменяет хоминг кроветворных клеток-предшественников клоновой линии [43].

Известно, что содержание хоминг-белка на кроветворных клетках изменяется по мере их дифференцировки. Он присутствует на полипотентных и коммитированных клетках, дифференцирующихся в гранулоцитарные элементы. Дифференцировка в эритроидную линию сопровождается потерей белка. Более того, белок отсутствует не только на зрелых эритроцитах, но и на гранулоцитах.

Наличие клоновых линий-предшественников позволило получить очищенную форму хоминг-белка, представляющего собой гликопротеиновый гетеродимер, состоящий из двух цепей (23 и 87 кДа), связанных дисульфидными мостиками. Как и для большинства лектинов, для хоминг-белка необходимо присутствие  $\text{Ca}^{2+}$  для связывания с углеводами мембран стромальных клеток. Обнаружено сходство между хоминг-белками в кроветворных клетках и хоминг-рецепторами лимфоцитов [34], относящихся к семейству С-лектинов или LEC-Сам, которые вовлекаются в лимфоидные и нейтрофил-эндотелиальные взаимодействия.

Кроветворные предшественники, взаимодействуя с поверхностью эндотелия, проходят через него и попадают в костномозговое окружение. Здесь происходит второй этап хоминга, где предшественники связываются с линие-специфическими стромальными клетками, которые поддерживают их пролиферацию и дифференцировку. Однако доказано, что включение механизма хоминга, т.е. взаимодействие мембранного лектина и гликоконъюгата, происходит уже при распознавании и взаимодействии клеток-предшественников с эндотелием. В данном случае эндотелий содержит распознающий лектин, а клетка-предшественник несет распознаваемую углеводную частицу. Эндотелий в этом случае играет роль структуры, элиминирующей из кровяного русла кроветворные предшественники. Доказательства этого получены в экспериментах, когда после внутривенного введения галактозилсодержащих неогликопротеинов более интенсивное их поглощение происходит в костном мозге, а не в печени, как ожидалось, где гепатоциты вырабатывают галактозилные рецепторы [34]. Кроме того, поглощение кроветворных клеток эндотелием подтверждается данными электронной микроскопии. Указывается на возможность причастности к хомингу СКК полисахаридов гликокаликса, содержащих сиаловую кислоту. Нейраминидаза лишает СКК сиаловой кислоты и резко нарушает их хоминг. Эффект обусловлен тем, что концевые участки D-галактозы, обнажающиеся после обработки нейраминидазой, являются мишенью для галактозилных рецепторов на клетках в некроветворных органах, где они захватываются и погибают. Блокада галактозилных остатков на СКК восстанавливает их хоминг [22]. С этими данными согласуются результаты работы, в которой галактозилные рецепторы печени ингибировались обработкой деасиалофетуином, что приводило к 5–10-кратному увеличению колониеобразующей способности миелотрансплантата [25].

Следовательно, уже сейчас очевидно присутствие на мембране этого класса клеток двух структур, выполняющих, видимо, самостоятельную функциональную нагрузку. Экспрессируются эти структуры одновременно или сменяют друг друга, например, ответственные за взаимодействие со стромальными элементами и их регуляторными сигналами приходят на смену галактозилсодержащим эндотелиально-адгезивным структурам? Неожиданным помощником в решении данного вопроса выступила криобиология. Полученные нами данные показали [2], что после криоконсервирования часть КОЕ<sub>с</sub> временно теряет способность к хомингу в кроветворном микроокружении реципиентов. Фактор *f* криоконсервированных КОЕ<sub>с</sub> в раннем посттрансплантационном периоде составлял около 50% в селезенке и 40% в костном мозге по сравнению с нативным контролем. Параллельно наблюдалось снижение пролиферативной активности криоконсервированных КОЕ<sub>с</sub>. При этом важно, что КОЕ<sub>с</sub> проявляли сниженную пролиферацию уже после хоминга, т.е. сохраняя способность к хомингу, эти же клетки в течение некоторого времени теряли способность к пролиферации. Очевидно, это является подтверждением одновременного присутствия на кроветворных клетках рецепторов и демонстрирует различную их “устойчивость” к действию факторов криоконсервирования. Кроме того, получено еще одно подтверждение возможности использования криоконсервирования не только как способа обеспечения длительного хранения биообъектов, но и как методического подхода, позволяющего решить некоторые вопросы общепатологической проблемы.

Взаимодействие между адгезивными рецепторами к матриксу и соответствующими белковыми лигандами является существенным моментом в миграции кроветворных клеток из/или в костный мозг и лимфоидные ткани, а также в процессах их дифференцировки и созревания. Согласно современным данным на клетках стромы костного мозга представлены различные акцептирующие белки, такие как коллаген I, III, IV типов, фибронектин (ФН), ламинин, протеоглики. Наиболее изученным компонентом внеклеточного матрикса, связанным с гемопоэзом, является ФН. С помощью иммунофлюоресценции показано, что формирование кроветворных колоний в костном мозге связано с ФН-богатыми областями [34], т.е. подтверждается важная роль ФН в прикреплении кроветворных клеток к строме. Способность адгезии сохраняется до уровня незрелых эритроцитов. Перестройка плазматической мембраны ретикулоцитов при созревании сопровождается потерей способности клеток адгезировать к ФН и выходом клеток в кровяное русло [21]. Известно, что трипептид арг-гли-асп (RGD) – это та последовательность в составе молекулы ФН, которая опосредует сцепление клеток. Для интегринов – рецепторов адгезии клеток – RGD мотив является в структуре лиганда сигнальным.

Экспрессия нескольких интегринов – суперсемейства гликопротеинов прослежена на различных клетках нормального костного мозга. Одна из форм подсемейства интегриновых рецепторов – лейкоцитарных адгезивных молекул Leu-Cam ( $\beta_2$ ) – отсутствует на ранних предшественниках кроветворных клеток (HLA-DR<sup>+</sup>MPO<sup>-</sup>) и проявляется в процессе их созревания [26]. Необходимо отметить, что компоненты этого семейства входят в состав хорошо известных мембранных структур, акцептирующих регуляторные сигналы: LFA-1, MAC-1, Gr 150/95. Представителем структур этого класса является также молекула  $\beta_1$  VLA с ее различными изоформами (VLA-1,2,3,4,5,6). При этом только VLA-4 определяется на 40% кроветворных клеток с локализацией в месте межклеточных контактов, что подтверждается использованием иммунотрансмиссионной электронной микроскопии. VLA-4 присутствуют также на лимфоцитах, моноцитах. Ими опосредуются межклеточные взаимодействия и обеспечивается прикрепление лимфоцитов в костном мозге к лиганду, в роли которого может выступать ФН. Клетки костного мозга, выделенные с помощью МАТ к VLA-4 были обогащены КОЕ-ГМ. При этом важно отметить,

что фракция VLA-4<sup>+</sup>-клеток была обогащена также CD34<sup>+</sup> клеточными компонентами, т.е. примитивными кроветворными предшественниками.

Высокая степень экспрессии VLA-1 и VLA-3 – отмечалась на клетках длительной культуры костного мозга, относящихся к фибробластам и эндотелиальным клеткам; некоторые их фибробластов были также VLA-2<sup>+</sup>. То есть очевидно, что экспрессия интегринов на клетках костного мозга жестко регулируется. Тот факт, что некоторые из этих молекул находятся на мембране стромальных элементов, а другие на кроветворных предшественниках доказывает их участие в процессах регуляции функционального состояния последних (например, процессов дифференцировки).

В последнее время все больше упоминается о причастности к процессу хоминга кроветворных предшественников протеогликанов – группы матричных субстанций, синтезируемых главным образом стромой костного мозга. Им отводится роль амплификаторов связи между кроветворными предшественниками и стромой, а также посредников передачи ростовых и дифференцировочных сигналов к кроветворным клеткам. Например, показано, что один из представителей протеогликанов – гепарантсульфат может избирательно извлекать и связывать ростовые факторы из среды культивирования для презентации их кроветворным предшественникам [34]. Другой протеогликан – гемонектин – вовлекается в линиеспецифическое связывание гранулоцитарных предшественников.

Показано, что и кроветворные клетки синтезируют значительные количества протеогликанов – хондроитинсульфата, который первоначально связан с мембраной, а затем освобождается во внеклеточное пространство [19]. Последние работы [34] также подтверждают участие мембранно-связанного хондроитинсульфата в адгезии предшественников к гемопозитической строме. Эта связь опосредуется хондроитинсульфатом предшественников и ФН стромальных клеток. Продуцируемый клетками ФН (вне зависимости от направленности лиганд-рецепторного взаимодействия) обуславливает их связывание с субстратом, сопровождающееся формированием под мембраной актомиозиновых фибрилл цитоскелета. Система микрофибрилл и микротрубочек, обладая высокой пластичностью, проявляет, кроме того, и высокую чувствительность к действию широкого спектра физико-химических факторов (изменению концентрации водородных ионов, осмотических градиентов и т. д.). Общеизвестным является факт дезинтеграции микротрубочек клеток теплокровных животных при их охлаждении до 0°C с последующим восстановлением при 37°C. Наряду с этим микрофибриллярные компоненты проявляют чувствительность к димексиду, колхицину, трипсину и некоторым другим веществам. Показано, например, что эквilibрация клеток с 10%-м димексидом в течение 30 мин приводит к исчезновению микрофибрилл в цитоплазме, тогда как микротрубочки при этих условиях опыта остаются интактными [8]. Разрушение микротрубочек под действием колхицина явилось основанием для повышения сохранности клеток при замораживании путем добавления в среду консервирования небольших концентраций колхицина [17]. Эти данные позволяют предположить, что предварительное разрушение цитоскелета клетки является “упреждающим” процессом повреждения клетки факторами криоконсервирования, в том числе и мембранных структур кроветворных клеток, ответственных за адгезию в кроветворном микроокружении. По крайней мере, клетки, замороженные в виде суспензии, проявляли более высокую колониеформирующую активность, чем замороженные в распластанном состоянии [12]. Следовательно, сохранение адгезивных свойств (определяющих пролиферативную активность?) кроветворных клеток является одной из главных проблем криобиологии, успешное решение которой зависит от правильно подобранных режимов замораживания–отогрева суспензии, вида и концентрации криопротекторов и некоторых других условий.

В ряду антигенно-рецепторных мембранных структур кроветворных предшественников наиболее полно охарактеризованной структурой стволовых клеток человека является антиген CD34. Моноклональные антитела к CD34 (My10, B13C6, 12.8) реагируют с 1–4% клеток нормального костного мозга человека [5]. Эти клетки костного мозга поддерживают длительный гемопоэз *in vitro* и полностью восстанавливают гемопоэтическую систему летально облученных обезьян, формируя элементы всех линий дифференцировки [31]. Экспрессия антигена CD34 снижается по мере созревания кроветворных клеток: коммитированные предшественники являются слабо положительными или CD34<sup>-</sup>; антиген не определяется на зрелых клетках крови. Хотя функция этого гликолизированного фосфогликопротеина остается неизвестной, привлекательна гипотеза, что CD34 также является одной из адгезивных молекул, позволяющей стволовым клеткам оставаться или расселяться в стромальном микроокружении при гемопоэзе. Тем более что вне лимфогемопоэтической системы антиген CD34 экспрессируется на клетках сосудистого эндотелия посткапиллярных венул. Интересно, что ген CD34 находится в области, которая содержит кластеры генов семейства адгезивных лейкоцитарных или эндотелиальных молекул [5]. Основанием считать, что антиген CD34 вовлекается в клеточные взаимодействия и адгезию, а не представляет собой акцептор ростовых факторов, явилось отсутствие присущей этим акцепторам тирозинкиназной активности, низкая скорость синтеза и обновления этой мембранной структуры [5]. Вместе с тем результаты последних исследований показывают, что CD34-гликопротеин фосфорилируется протеинкиназой C, подтверждая, что CD34 вовлекается в сигнальную трансдукцию. Не исключено в этом случае участие и кооперативное взаимодействие с CD34 других мембранных антигенных структур, в частности антигенов HLA-комплекса.

Вопрос, экспрессируют ли стволовые кроветворные клетки человека антигены II-го класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) HLA-D, пока окончательно не решен. Известно, что данный тип антигена кодируется генами HLA-D области. Как отмечают некоторые авторы [5], CD34<sup>+</sup>-клетки обладают низкими и средними уровнями экспрессии HLA-DR, однако в краткосрочной клеточной культуре фракционированного костного мозга обнаружили и CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>-клетки. В [14] сообщалось о том, что и в длительной культуре человеческого костного мозга не содержатся DR<sup>+</sup>-клетки. В то же время в более поздних работах при изучении наличия HLA-D<sup>+</sup>-клеток в костном мозге человека показано, что как мультипотентные (KOE<sub>mix</sub>), так и коммитированные предшественники (KOE-ГМ, БОЕ-Э, KOE-Mer) экспрессируют антигены, кодируемые локусами DR и B/DR/D-области. Лишь в незначительном количестве кроветворные клетки разного уровня дифференцировки экспрессировали DQ антиген, причем в основном KOE-ГМ. Данный факт свидетельствует, очевидно, о том, что клеточная поверхность селективно экспрессирует продукты различных локусов D-области во время гемопоэтической дифференцировки. Принято считать, что экспрессия антигенов HLA-DR, подобно молекулам CD34, снижается по мере созревания кроветворных клеток, может регулироваться не только уровнем дифференцировки предшественников, но, очевидно, определяется скоростью пролиферации или их клеточным циклом. Выявлено, в частности, что Ia-подобные антигены в максимальном количестве экспрессируются на клетках в S-фазе клеточного цикла [4]. Функциональное значение гликопротеинов II-го класса ГКГ на гемопоэтических клетках остается пока не совсем ясным. Эти структуры, по-видимому, включены в регуляцию гемопоэза, что подтверждается рестрикцией супрессии БОЕ-Э Т-лимфоцитами [16]. Альтернативно они могут выполнять общую функцию на нелимфоидных клетках как потенциальные элементы иммунного распознавания [14].

Использование техники выделения клеток позволило [29] элиминировать из клеток костного мозга мышей популяцию, экспрессирующую Ly-6A.2 молекулу (ранее определяемую как антиген-1 стволовой клетки – Sca-1) и не экспрессирующую поверхностные маркеры дифференцированных гематолимфоидных клеток (Lin<sup>-</sup>). Полученная фракция содержала очень высокий процент малодифференцированных (КОЕ<sub>c13</sub>) кроветворных предшественников, в то время как содержание КОЕ<sub>c8</sub> было в 10 раз меньше, чем в интактном костном мозге. Анализ фенотипа клеточной поверхности изолированных Ly-6A.2<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> клеток показал, что 30–50% из них экспрессировали низкие уровни Thy-1 антигена и именно среди этой Thy-1<sup>Lo</sup> популяции содержались преимущественно КОЕ<sub>c13</sub>. Ly-6A.2<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> клетки экспрессировали промежуточные уровни фагоцитарного гликопротеина-1 (Pgp-1), низкие уровни термостабильного антигена (HSA), высокие уровни антигенов класса-1 ГКГ (H2K/D), общий лейкоцитарный антиген (Ly-5), углеводные участки связывания с лектином агглютинином семян пшеницы (WCA). По этим критериям полученные клетки фенотипически сходны с кроветворными стволовыми клетками, изолированными другими методами.

На примере Т-лимфоцитов показано, что МАТ, перекрестно связывающиеся с поверхностными молекулами, кодируемыми мышинным Ly-6 локусом, могут включать пусковой сигнал в этих клетках [24] и, таким образом, играть важную роль в регуляции функции Т-клеток. Это подтверждает возможность участия Ly-6 молекул в регуляции сигнальной трансдукции через плазматическую мембрану и активации как минимум Т-клеток, а возможно, и в целом клеточных популяций лимфогемопоэтического комплекса, экспрессирующих эти молекулы. Важно отметить, что экспрессия Ly-6 молекул усиливается при обработке покоящихся клеток интерфероном  $\gamma$  [7].

Известно, что большинство кроветворных клеток несут на поверхности мембраны рецепторы к КСФ, причем многие клетки могут экспрессировать одновременно рецепторы к нескольким ростовым факторам (М-КСФ, ГМ-КСФ, ИЛ-3, ИФ $\gamma$ ). Можно предположить, что общее биологическое действие различных колониестимулирующих факторов на кроветворные предшественники может быть следствием наличия семейства близких регуляторов, но это не всегда подтверждается данными анализа аминокислотной последовательности полипептидов КСФ [5]. Имеются существенные доказательства того, что КСФ действительно близкое семейство: во-первых, гены КСФ имеют общую структуру; во-вторых, гены для ГМ-КСФ и ИЛ-3 соседствуют в хромосомах человека и животных и, вероятно, функционально связаны; в-третьих, рецепторы трех КСФ имеют сходную последовательность. К этому же можно отнести и близкое по стимулирующему действию на кроветворные клетки ИФ $\gamma$  и ИЛ-3, продуцируемых одними и теми же субпопуляциями Т-лимфоцитов, которые могут выступать в роли регуляторных клеток кроветворного микроокружения не только в физиологическом состоянии, но и при трансплантации костного мозга. Убедительно продемонстрированы различные эффекты изменения функции кроветворных предшественников при удалении из трансплантируемого костного мозга тех или иных клеточных компонентов, в том числе и различных субпопуляций Т-лимфоцитов [2], среди которых есть и продуценты ИФ $\gamma$ . Большая часть клеток имеет несколько сотен КСФ-рецепторов, но КСФ может взаимодействовать только с малым процентом этих рецепторов [20]. Высказывается предположение, что “атакованный” КСФ-рецептор инициирует множественный сигнальный каскад в отвечающих клетках, вызывая множественность наблюдаемых действий КСФ. Вероятно, отвечающие клетки “самостоятельно” определяют характер запуска сигнального каскада и какой тип клеточного ответа реализовать. В этой связи уместно заметить, что готовность клеток к “самостоятельному” выбору пути ответа может зависеть от количественных соотношений и качественного состояния ука-

занных рецепторов. Эти параметры, в свою очередь, определяются состоянием окружающих кроветворные клетки регуляторных клеточных популяций. Предположение того, что КСФ могут инициировать множество сигнальных каскадов безусловно требует идентификации их участия в митотическом сигнале. При изучении культуры мышинной кроветворной линии FDG-P1 показано, что клетки могут отвечать митотической активностью на стимуляцию ГМ-КСФ, ИЛ-3, ИЛ-4, ИФу, а после определенных трансформаций – на М-КСФ и человеческий ГМ-КСФ [18]. Маловероятно, чтобы одна клетка обладала шестью различными митотическими сигнальными системами. Возможно, первичные сигналы от различных рецепторов отличаются друг от друга, но в итоге они вливаются в общий сигнал, действующий на соответствующую хромосомную мишень. На модели ранних предшественников гемопоэза продемонстрирована чувствительность этих клеток к действию отдельных цитокинов (ИЛ-3, ИЛ-6, ГМ-КСФ) [6, 13] и их комбинированному сочетанию. Кроме того, показано, что ИЛ-3, ГМ-КСФ, ИЛ-5 дополняют друг друга при связывании со своими рецепторами на незрелых миелоидных клетках человека [32]. Эти наблюдения, а также анализ рецепторов цитокинов, экспрессируемых фактор-зависимой линией клеток TF-1 [15], позволяет предположить, что рецептор для ИЛ-3, ГМ-КСФ, ИЛ-5 содержит  $\beta$  субъединицу, присутствующую по крайней мере в трех цитокиновых рецепторных системах у человека.

На зрелых миелоидных клетках больных острой и хронической лейкемией показано присутствие ИЛ-2Р (CD25) [9]. CD25 структуры не определяются на свежесыведенных клетках костного мозга здоровых людей, но на небольшом количестве клеток появляются при определенных условиях культивирования нормального костного мозга, причем добавление в среду культивирования ИЛ-3 приводило к увеличению числа клеток, экспрессирующих CD25 структуры. Потенциальная биологическая роль экспрессии ИЛ-2Р на миелоидных предшественниках пока неизвестна. ИЛ-2Р отчасти уникальный среди цитокиновых рецепторов, поскольку экспрессия каждой из двух цепей (p55 и p75) может контролироваться цитокинами, функционально отличными от ИЛ-2. Возможно, этот тип регуляторного контроля является механизмом предотвращения ответа клеток на сигнал, отличный от ИЛ-2, обладающего широким биологическим действием на кроветворные клетки. Действие различных цитокинов на экспрессию ИЛ-2Р зависит от типа отвечающих клеток. Например, ИФу-зависимая экспрессия ИЛ-2 на моноцитарных клетках снижается после их экспозиции с ГМ-КСФ или другими агентами, которые приводят к увеличению внутриклеточного пула цАМФ. В то же время ГМ-КСФ вызывает экспрессию ИЛ-2Р на эозинофилах и нормальных миелоидных клетках. Аналогично ИЛ-3 может вызывать индукцию цепи p55 ИЛ-2Р на клетках костного мозга и эозинофилах [30], но не действует на p55 экспрессию на базофилах.

На коммитированных предшественниках костного мозга взрослых животных, а также моноцитах, макрофагах существуют высокоаффинные рецепторы к КСФ-1, специфическому гемопоэтину, стимулирующему пролиферацию и дифференцировку клеток моноцитарной линии. Рецептор КСФ-1 кодируется c-fms протоонкогеном и является членом семейства рецепторов ростовых факторов, связывание которого с лигандом изменяет конформацию рецептора и приводит к активации тирозин-специфической протеин-киназы [27]. Активация рецептора киназы запускает каскад биохимических событий, некоторые из которых передают сигнал от плазматической мембраны к клеточному ядру, что приводит к транскрипции КСФ-1-отвечающих генов и последующему клеточному делению. КСФ-1 может оказывать плеiotропное действие, которое включает быстрые и медленные биохимические “события”, а это свидетельствует о том, что потенциально может быть идентифицировано множество физиологических субстратов для рецептора киназы. Так, после

связывания КСФ-1 с рецептором мембрана приобретает складчатый характер, в ней появляется вакуолизация, отмечается защелачивание цитоплазмы через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмен [35], усиление транспорта гексозы [11], активация семейства “быстрых ранних генов”, включая протоонкоген *c-fos*. Однако этих кратковременных событий недостаточно, чтобы вызвать митоз, так как установлено, что КСФ-1 необходим в течение всего перехода клетки из  $G_1$  в клеточный цикл для обеспечения пролиферативного ответа [27]. Таким образом, смену различных субстратов для рецептора киназы можно рассматривать как движение клетки к S-фазе. Более того, субмитогенные дозы ростовых факторов могут поддерживать жизнеспособность непродифференцирующихся клеток, находящихся в ранней  $G_1$ -фазе, подтверждая, что семейство КСФ-1-отвечающих генов может включать те, которые поддерживают клеточный метаболизм, а также те, которые регулируют клеточный рост.

Рецептор к КСФ-1 – это трансмембранный гликопротеин, содержащий сигнальный пептид с внеклеточным лигандсвязывающим доменом, гидрофобной промежуточной областью и внутриклеточным тирозинкиназным доменом. В отсутствие КСФ-1 рецептор относительно стабилен в течение 3–4 ч. При связывании КСФ-1 комплекс лиганд-рецептор быстро погружается, попадает в зону действия лизосомальных ферментов и деградирует [10], что именуется “down”-регуляция. Полная деградация рецептора происходит в течение 15 мин при избытке КСФ-1, и клетка становится нечувствительной к стимуляции лигандом до тех пор, пока не произойдет синтез и накопление новых рецепторов на поверхности клетки. Хотя этот процесс может замедлять активность тирозинкиназы, маловероятно, что полная деградация происходит *in vivo*, так как моноциты не образуют избыток КСФ-1.

Существует и другой механизм усиления оборачиваемости зрелых КСФ-1Р, приводящий к потере мест связывания КСФ-1, называемый трансмодуляцией. Суть его заключается в протеолитическом расщеплении КСФ-1Р в его внеклеточном домене вблизи мембраннопогруженного участка [27] под действием индукторов протеинкиназы С – продуктов расщепления инозитолфосфолипидов фосфолипазой С. Появление продуктов гидролиза инозитольных липидов установлено после криоконсервирования эритроцитов, спермиев, митохондрий вследствие активации фосфолипазы С и разрушения в процессе холодового воздействия эндогенных антиоксидантов клетки [1], что может отразиться на состоянии указанных рецепторов клетки после криоконсервирования. Развитие таких процессов вполне возможно и в кроветворных предшественниках, но отсутствие до настоящего времени методических подходов, дающих возможность констатировать такие изменения именно в данной популяции клеток, не позволяет однозначно говорить об этом.

О возможном наличии на кроветворных предшественниках рецепторов ко многим регуляторным сигналам свидетельствуют биологические эффекты, оказываемые этими сигналами на кроветворную систему, хотя для таких выводов требуются, безусловно, корректные доказательства.

На поверхности различных кроветворных клеток (КОЕ<sub>с</sub>, бластные клетки) экспрессируется гликопротеин с молекулярной массой 100–130 кДа – рецептор гранулоцитарного фактора (Г-КСФ), стимулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников нейтрофилов. Рецептор представляет собой гомодимер, акцептирующий Г-КСФ с высокой аффинностью и передающий сигнал в клетку. Внеклеточный домен рецептора содержит последовательность из 200 аминокислот, типичную для разных цитокинов. Кроме того, внеклеточный домен содержит участок, сходный с иммуноглобулином, и три участка, гомологичные ФН типа III. Участок, содержащий последовательность, сходную с иммуноглобулином, и последовательность, сходную с рецепторами других цитокинов, по структуре близок к цепи рецептора для

ИЛ-6. Однако авторы точно не установили, является ли действие Г-КСФ в данных моделях прямым или опосредованным.

Исследования последних лет свидетельствуют о возможности присутствия на кроветворных клетках ИЛ-1Р. Ранее было отмечено, что при добавлении человеческого рекомбинантного ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в среду культивирования клеток костного мозга увеличивалось как число КОЕ<sub>c12</sub> в суспензии, так и доля КОЕ<sub>c12</sub> в S-фазе клеточного цикла [33]. На нестимулированных же клетках костного мозга не установлено присутствие ИЛ-1Р. При использовании <sup>125</sup>I-ИЛ-1 для исследования экспрессии ИЛ-1Р на клетках костного мозга мышей, обработанных ИЛ-1, было установлено, что *in vivo* инъекция 300 нг ИЛ-1 мышам вызывает 5–10-кратное увеличение связывания <sup>125</sup>I-ИЛ-1 с клетками костного мозга с пиком реакции через 4–24 ч после обработки. Это коррелирует со способностью ИЛ-1 вызывать продукцию КСФ акцессорными клетками и повышением радиоустойчивости облученных животных. Введение анти-ИЛ-1Р антител за 8–12 ч перед введением ИЛ-1 ингибирует стимуляцию экспрессии ИЛ-1Р от 59 до 100% и снижает выживаемость облученных мышей на 92%. Поскольку меченые МАТ непосредственно не связываются *in vitro* с клетками костного мозга из ИЛ-1 обработанных мышей, но связываются с акцессорными клетками, то можно считать, что МАТ могут действовать, блокируя ИЛ-1 вызванную акцессорными клетками функцию. Стимуляция *in vitro* клеток костного мозга разными КСФ (ИЛ-3, Г-, ГМ-КСФ), но не ИЛ-1, может усиливать экспрессию ИЛ-1Р. Эти результаты подтверждают опосредованное действие ИЛ-1 на повышение экспрессии ИЛ-1Р на клетках костного мозга, что может быть вызвано ИЛ-1-индуцированной выработкой КСФ. Установлена индукция ИЛ-1Р на ранних кроветворных предшественниках, полученных путем удаления из суспензии клеток, несущих поверхностные маркеры зрелых клеток В220, RBC-81,5, MAC-1, Ly2, L3T4 и обработки оставшихся клеток КСФ. Таким образом, доказано, что взаимодействие ИЛ-1 с КСФ заключается в индукции ИЛ-1Р различными КСФ. Синергизм процесса основан на каскадных взаимодействиях большого спектра регуляторно-акцессорных клеток костного мозга, что необходимо учитывать при разработке соответствующих программ криоконсервирования костного мозга и обеспечения сохранности “полноты миелотрансплантата”.

Продолжение анализа различных мембранных структур кроветворных клеток будет представлено в следующем разделе статьи.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БОЕ-Э — бурсообразующие эритроидные единицы  
ГМ, (Г, М)-КСФ — гранулоцито-макрофагальный (Г — гранулоцитарный, М — макрофагальный) колониестимулирующий фактор  
ИЛ-1 (2, 3, 6) — интерлейкин-1 (2, 3, 6)  
ИЛ-1 (2)Р, КСФ-1Р — рецепторы к ИЛ-1 (2), КСФ-1  
ИФ — интерферон  
КОЕ-ГМ (Meg) — колониеобразующие единицы, формирующие колонии, состоящие из гранулоцито-макрофагальных элементов (Meg — мегакариоцитарных клеток)  
КОЕ<sub>mix(c)</sub> — колониеобразующие единицы, формирующие колонии, состоящие из гранулоцито-макрофагально-эритро-мегакариоцитарных элементов (с — колониеобразующие единицы в селезенке)  
ЦНС — центральная нервная система  
CD — кластер дифференцировки  
CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> — наличие или отсутствие антигена на клетках  
Gr — гликопротеин  
H-2 — главный комплекс гистосовместимости у мышей  
HLA — лейкоцитарные антигены человека  
Ia — иммуноассоциированные антигены  
Leu-Sam — молекула адгезии лейкоцитов  
LFA — антиген, связанный с функцией лимфоцитов  
MAC-1 — макрофагальный антиген  
MPO — миелопероксидаза

p 55, p 75 — белки с молекулярной массой 55 и 75 кДа  
RGD — последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp  
VLA — очень поздний антиген

Представленные исследования были поддержаны Международной Соросовской программой (ISSER) грантом № PSU 054082.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. — Киев: Наук. думка, 1994. — 431 с.
2. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунобиологические свойства кроветворных клеток костного мозга: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Харьков, 1988. — 35 с.
3. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая клетка и ее микроокружение. — М.: Медицина, 1984. — 234 с.
4. Broxmeyer H., Galbraith P. Relationship of CSA to apparent kill of human CFC by irradiated and hydroxyurea // *Blood*. — 1976. — 47, № 3. — P. 403.
5. Civin C.I. Human monomyeloid cell membrane antigens // *Exp. Hematol.* — 1990. — 18, № 5. — P. 461–467.
6. Dukes P.P., Ma A. IL-1 and IL-6 effects on DNA synthesis and recovery of day-12 CFU-S in serum free culture // *Exp. Hematol.* — 1990. — 18, № 6. — P. 555.
7. Dumont H.J., Dijkmas R. Selective up-regulation by IF $\gamma$  of surface molecules of the Ly-6 complex in resting T-cells // *Eur. J. Immunol.* — 1987. — 17, № 2. — P. 1183–1190.
8. Fukui G. Intercellular actin bundles induced by DMSO in interphase nucleus of distostelium // *J. Cell. Biol.* — 1978. — 76. — P. 146–157.
9. Gazzola M.-V., Collins N.H. Recombinant IL-3 induced IL-2 receptor expression early myeloid cells in normal human bone marrow // *Exp. Hematol.* — 1992. — 20. — № 2. — P. 201–208.
10. Guilbert L.J., Stanley E.R. The interaction of  $^{125}$ I-colony-stimulating factor-1 with bone marrow-derived macrophages // *J. Biol. Chem.* — 1986. — 261, № 4. — P. 4024–4030.
11. Hamilton J.A., Stanley E.R. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony stimulating factors // *J. Cell. Physiol.* — 1980. — 103, № 4. — P. 435–442.
12. Hetzel F.W., Kruuv J. Exposure of mammalian cells to physical damage effect of the state of adhesion on colony-forming potential // *Cryobiology*. — 1973. — 10, № 3. — P. 206–212.
13. Kanakura Y., Druker B. Signal transduction of the human GM-CSF and IL-3 receptors involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmic proteins // *Blood*. — 1990. — 76, № 7. — P. 706–710.
14. Katz D.H. The role of the histocompatibility gene complex in lymphocyte differentiation // *Immunology of bone marrow transplantation*. — New-York. — 1976. — P. 79–85.
15. Kitamura T., Miyajima A. Functional reconstitution of the human IL-3 receptor // *Blood*. — 1992. — 80, № 1. — P. 84–91.
16. Lipton J.M., Nathan D.G. Cell-cell interactions in the regulation of erythropoiesis // *Br. J. Haematol.* — 1983. — 53, № 3. — P. 361–367.
17. Low P., Lepock J. Effect of colchicine on survival of mammalian cells exposed to freeze-thaw damage // *Cryobiology*. — 1978. — 15, № 6. — P. 675–680.
18. Metcalf D. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular and clinical aspects // *Sciences*. — 1991. — 254, № 4. — P. 529–540.
19. Minguello J.J., Tavassoli M. Proteoglycan synthesis by hemopoietic progenitor cells // *Blood*. — 1989. — 73, № 2. — P. 1821–1830.
20. Nicola N.A. Receptors for colony-stimulating factors // *Br. J. Haematol.* — 1991. — 77, № 2. — P. 133–137.
21. Patel V.A., Lodish H.F. The fibronectin receptor on mammalian erythroid precursor cell: characterization and developmental regulation // *J. Cell. Biol.* — 1986. — 102, № 2. — P. 449–455.
22. Ploemacher R.E., Brons N.H. Colony formation by bone marrow cells after incubation with neuraminidase // *Exp. Hematol.* — 1981. — 9, № 3. — P. 169–178.
23. Robinson P.J. Two different biosynthetic pathways for the secretion of Qa region-associated class I antigens by mouse lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. USA*. — 1987. — 84. — № 2. — P. 527–532.
24. Rock K.L., Yeh T.H. TAP, a novel T-cell activating protein involved in the stimulation of MHC-restricted T-lymphocytes // *J. Exp. Med.* — 1986. — 163, № 2. — P. 315–334.
25. Samlowski W.E., Raymond A.D. Bone marrow engraftment efficiency is enhanced by competitive inhibition of the hepatic asialoglycoprotein receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1985. — 82, № 8. — P. 2508–2513.
26. Sciro R., Soligo D. Integrins expression on human bone marrow // *Exp. Hematol.* — 1990. — 18, № 6. — P. 568–570.
27. Sherr C.J., Rettenmier C.W. CSF-1 receptor // *Blood*. — 1990. — 75, № 1. — P. 1–10.
28. Sorg G. Macrophage-derived cell regulatory factors // *Cytokines*. — 1989. — 1. — P. 89–105.
29. Spangrude G.J., Scollay R. A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells // *Exp. Hematol.* — 1990. — 18, № 8. — P. 920–927.

30. Stockinger H., Majclic O. Exposure by desialylation of myeloid antigens on acute lymphoblastic leukemia cells // J. Natl. Cancer Inst. – 1984. – 73, № 1. – P. 7–11.
31. Strauss L.C., Scubitz K.M. Antigenic analysis of hematopoiesis. II. Expression of human neutrophil antigens on normal and leukemic marrow cells // Blood. – 1984. – 63, № 5. – P. 574–580.
32. Taketasy F., Chiba S. IL-3 specifically inhibits GM-CSF binding to higher affinity receptor // J. Cell Physiol. – 1991. – 146, № 2. – P. 251–255.
33. Tanaka T., Suda T. G-CSF expands the pool of Pre-CFU-S in mice // Exp. Hematol. – 1990. – 18, № 6. – P. 604–606.
34. Tavassoli M., Hardy C.L. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow // Blood. – 1990. – 76, № 6. – P. 1059–1070.
35. Vairo G., Hamilton J.A. Activation and proliferation signals in murine macrophages: Stimulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity by hematopoietic growth factors and other agents // J. Cell Physiol. – 1988. – 134, № 1. – P. 13–18.
36. Van den Engh A. Antigenic differences between hematopoietic stem cells and myeloid progenitor // J. Exp. Med. – 1974. – 139, № 6. – P. 1621–1627.

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

Поступила 17.02.95

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

МЕМБРАННІ СТРУКТУРИ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ФЕНОТИПІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ І ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРОВОУТВОРЮЮЧИХ КЛІТИН; МОЖЛИВА ЇХ МОДИФІКАЦІЯ ПІД ДІЄЮ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ. Частина I

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Огляд літературних та отриманих на основі власних досліджень даних що до структури ряду поверхневих молекул кровоутворюючих клітин різного рівня диференціювання та їх ролі в регулюванні функціонального стану гемопоетичних попередників. Обговорюється можливість зміни експресії антигенів та функціональної активності рецепторних структур на кровоутворюючих попередниках після кріоконсервації як одна із причин зміни захисного потенціалу трансплантованого кріоконсервованого кісткового мозку.

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

MEMBRANE STRUCTURES, DETERMINING PHENOTYPICAL CHARACTERISTICS AND FUNCTIONAL STATE OF HEMOPOIETIC CELLS; THEIR POSSIBLE MODIFICATION UNDER THE ACTION OF CRYOPRESERVATION FACTORS. Part I

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

The authors conducted a review of the data, reported in special literature, and those obtained during their own experimentation, dealing with the structure of some surfacial molecules of hemopoietic cells of various levels of differentiation, and their role in the regulation of the functional state of hemopoietic progenitors. They speculate on the possibility of changing the expression of antigens and functional activity of the receptor structures on hemopoietic progenitors after cryopreservation to be one of the reasons of the alteration in the protective action of the cryopreserved bone marrow being transplanted.

УДК 615.361; 612.43/47

**Н.С.Пушкарь, Е.А.Гордиенко, А.И.Осецкий,  
О.И.Гордиенко, Л.Г.Кулешова**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ ПРИ ГЛУБОКОМ  
ОХЛАЖДЕНИИ**

Исследованы физические процессы в биологических системах при низких температурах. С помощью физико-математического аппарата термодинамики необратимых процессов, теории упругости проанализированы причины явлений криповреждения клеток во время их охлаждения,

разработаны физико-математические модели, служащие для систематизации и трактовки результатов криобиологических экспериментов [5].

*Физико-математический анализ процессов, протекающих на различных этапах криоконсервирования клеточных суспензий*

Один из важных моментов физико-математического рассмотрения процессов, происходящих на различных этапах замораживания клеточных суспензий, – анализ явлений массопереноса между клетками и окружающей средой. Перенос клеток из одной среды в другую вызывает нарушение термодинамического равновесия между внеклеточным и внутриклеточным растворами, необходимым условием которого является равенство значений химических потенциалов проникающих через мембрану веществ вне и внутри клетки. Основным препятствием для диффузии в системе являются мембраны; перепады осмотического давления сосредоточены, в основном, на них, в то время как градиентами осмотического давления в межмембранных областях можно пренебречь. Обычно растворитель (вода) проникает через мембраны клеток значительно быстрее, чем молекулы других веществ. Поэтому при переносе клетки из изотонического в гипертонический раствор ее объем в начале экспозиции уменьшается настолько, что суммарная концентрация выравнивается за счет оттока воды из клетки, что определяется как стадия обезвоживания клетки. На следующей стадии концентрации проникающего через мембрану клетки вещества вне и внутри клеток медленно выравниваются и при том тем быстрее, чем больше поверхностно-объемное отношение клетки и коэффициент проницаемости клеточной мембраны для растворенного вещества. При этом клеточный объем медленно восстанавливается.

В первом приближении влияние охлаждения на кинетику изменения объема клетки и концентраций растворенных внутри нее веществ можно учесть, полагая, что изменение коэффициентов фильтрации и проницаемости плазматической мембраны для растворенного вещества с изменением температуры подчиняется аррениусовым зависимостям. Один из самых значительных и физически ясных эффектов, который вызывает охлаждение клеток до начала кристаллизации в суспензии, заключается в том, что охлаждение замедляет (а при больших скоростях охлаждения – полностью останавливает) те изменения клеточного объема и концентраций растворенных внутри клетки веществ, которые происходят в отсутствие охлаждения, то есть на этапе изотермической экспозиции клеток при исходной температуре. Как показывают численные эксперименты, увеличение проницаемости клеток для растворенных веществ при прочих равных условиях снижает неблагоприятные “эффекты раствора”. Амплитуды колебаний исследуемых веществ оказываются существенно ниже в том случае, когда охлаждение клеточной суспензии начинается спустя достаточно длительный промежуток времени от начала фазы восстановления объема клеток до исходного значения. Поэтому, с точки зрения интенсивности испытываемых клетками воздействий и воспроизводимости результатов, более предпочтительной является длительная экспозиция клеток в криозащитном растворе. С другой стороны, слишком длительная экспозиция клеток в растворе криопротектора до начала охлаждения повышает опасность их постгипертонического лизиса на конечных этапах криоконсервирования.

Как следует из проведенных расчетов, при постоянной скорости охлаждения по мере падения температуры переохлаждение и концентрация внутриклеточного раствора монотонно нарастают. При этом большие значения переохлаждения в процессе медленного охлаждения достигаются при более низких температурах, чем в процессе более быстрого охлаждения. С увеличением исходной концентрации криопротектора в замораживаемой суспензии концентрация электролита в жидкой фазе при определенной температуре (из области

сосуществования жидкой и твердой фаз) снижается за счет коллигативного эффекта. Величина переохлаждения внутриклеточного раствора в процессе экспоненциального охлаждения на этапе кристаллизации вначале растет, достигает максимального значения, а затем резко падает до нуля. Поэтому в большинстве клеток при соответствующим образом подобранных экспоненциальных режимах охлаждения кристаллы льда внутри клеток не образуются.

Известно, что по мере снижения температуры все большая часть растворителя (воды) превращается в лед, и концентрация растворенных в жидкой фазе веществ существенно возрастает. Вследствие увеличения концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ, в частности электролитов, на клеточной мембране возникает градиент осмотического давления, вызывающий сравнительно быстрый выход воды из клеток. Изменение объема клеток сопровождается деформацией и перераспределением липидов и белков на поверхности мембран. Существует критическое напряжение, при котором происходит нарушение свойств избирательной проницаемости мембран из-за перераспределения мембранных компонентов и образования доменов и концентрации напряжений около физико-химических неоднородностей. Нарушения свойств избирательности мембраны могут происходить в результате фазовых переходов, имеющих место в плазматической мембране при снижении температуры.

Нами проведен физико-математический анализ процессов, протекающих при деформации клеточных мембран. Контакт везикулы или клетки с гипертонической средой на этапе эквilibрации с криозащитным раствором приводит к определенной перестройке латеральной организации, в частности, на мембране появляются места с повышенным содержанием того или иного компонента. Вероятно, вследствие этого явления "облегчается" фазовое превращение в мембране, если вслед за экспозицией в гипертонической среде суспензия охлаждается. Указанный эффект зависит от времени экспозиции клеток в гипертонической среде до начала охлаждения, потому что для перераспределения мембранных компонентов под влиянием деформации необходимо сравнительно большое время (около 10 мин). Вследствие латерального перераспределения мембранных компонентов в деформируемой мембране фазовые превращения в различных ее участках протекают неодновременно, в результате чего при быстром охлаждении жидкие липидные участки мембраны могут подвергаться большому изотропному натяжению, становится энергетически выгодным образование макроскопической поры во вкрапленных в затвердевшую фазу жидких участках мембран. Возможно, этот эффект обуславливает сенсбилизацию эритроцитов гипертоническими растворами к последующему охлаждению.

Физико-математическое исследование показало, что растяжение, как и изгибание мембраны, может привести к аналогичным эффектам – латеральное перераспределение компонентов в деформируемой путем растяжения двухкомпонентной мембране при определенных условиях становится энергетически выгодным. Таким образом, при оводнении бислойной везикулы или клетки возможно латеральное разделение мембранных компонентов, хотя для осуществления этого явления может потребоваться значительный промежуток времени, необходимый для преодоления системой посредством флуктуации активационного барьера. Даже если эта энергия невелика, для осуществления явления латерального разделения мембранных компонентов оводнение везикулы (клетки) должно быть медленным и протекать за время, превышающее характерное время, необходимое для диффузионного перераспределения мембранных компонентов в монослоях. В противном случае мембрана порвется раньше, чем в ней образуются обогащенные одним из компонентов кластеры.

Нами проведен количественный анализ явления образования поры в изотропно растянутой мембране клетки. Свободная энергия растянутой мембраны как функция радиуса поры (при заданном натяжении) показана на рис. 1. Если растяжение мало, то энергия монотонно увеличивается с ростом радиуса поры (кривая 1), и появление поры энергетически невыгодно. Если растяжение превышает некое критическое значение, свободная энергия как функция радиуса поры имеет минимум при некотором отличном от нуля радиусе поры (кривая 2). Следовательно, в этом случае имеется принципиальная возможность образования макроскопической поры при растяжении мембраны, превышающем критическое значение. По мере увеличения растяжения мембраны минимум на энергетической кривой становится более глубоким. Для образования поры система должна преодолеть энергетический барьер  $W_0$ , а для "залечивания" поры – энергетический барьер  $W_1$  (рис. 1). Физико-математический анализ явления показывает, что при заданном натяжении среднее время образования поры определяется следующим образом:

$$\langle t \rangle = \frac{(KT)^{3/2} \sigma}{2\pi\gamma D(0) \sqrt{(4\sigma^3 - 3\Gamma(\gamma)R_0)^2}} e^{\pi\gamma^2 / KT\sigma}.$$

Предполагая, что в мембранах эритроцитов образование пор происходит в областях чистого липида, принимаем:  $\gamma \sim 10^{-11}$  н. На рис. 2 показаны экспериментально измеренные (черные точки) времена гемолиза эритроцитов и рассчитанные по формуле (1) средние времена образования поры в мембране (сплошная линия) в зависимости от обратной величины натяжения мембраны  $\sigma$ . Экспериментальные данные, представленные на рис. 2, получены Рэндом методом втягивания одиночных эритроцитов в пипетку с калиброванным диаметром при фиксированном перепаде давления. Удовлетворительное согласие между экспериментальными и расчетными данными свидетельствует в пользу представления о том, что механизм осмотического лизиса липидных везикул или клеток связан с флуктуационным образованием одиночной макроскопической поры в мембране, подвергнутой изотропному натяжению при контакте с гипотонической средой [2, 4].

#### *Экспериментальное изучение проницаемости клеточных мембран для криопротекторов*

В свете развиваемых представлений большое значение для практического применения полученных теоретических результатов при оптимизации методов низкотемпературного консервирования приобретает определение коэффициентов проницаемости клеточных мембран для растворенных веществ, в частности криопротекторов. Нами экспериментально изучены коэффициенты проницаемости плазматической мембраны яйцеклетки мыши для диметилсульфоксида (ДМСО) в области температур 25–10 °С. Методом взвешивания фотографических изображений определяли кинетику изменений относительной площади сечения клетки при помещении в гипертонический раствор крио-

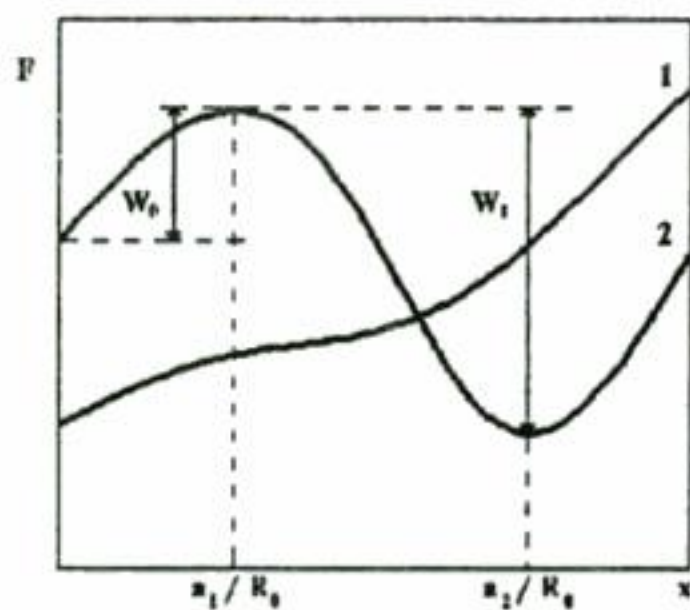


Рис. 1. Свободная энергия изотропно растянутой мембраны ( $F$ ) как функция радиуса поры ( $x$ ) при заданных натяжениях поры

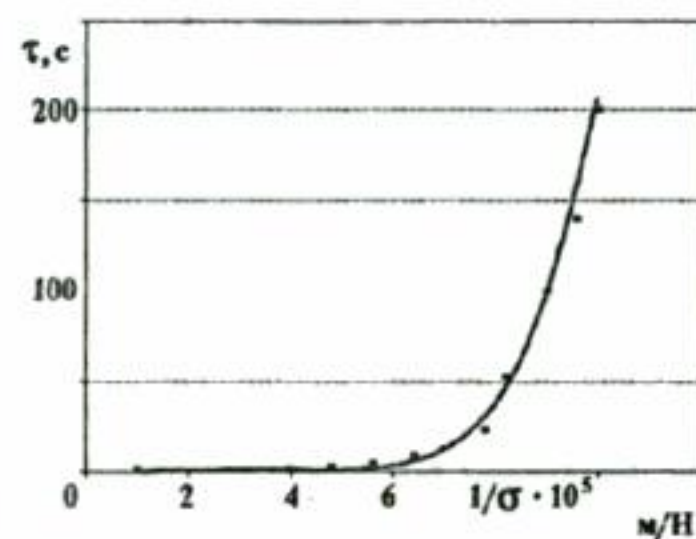


Рис. 2. Экспериментальная зависимость времени гемолиза ( $\bullet$ ) и теоретическая зависимость среднего времени флуктуационного образования мембранной поры (—) от обратной величины натяжения мембраны

протектора при трех температурах (25, 15 и 10 °С). Время достижения клеткой объема, равного исходному, составляло при температуре 25 °С ( $200 \pm 35$ ) с, при 15 °С – ( $465 \pm 51$ ) с, при 10 °С – ( $472 \pm 46$ ) с. Соответствующие этим значениям коэффициенты проницаемости плазматических мембран яйцеклеток для ДМСО в среднем равны:  $0,125 \times 10^{-6}$  м/с,  $0,538 \times 10^{-7}$  м/с и  $0,337 \times 10^{-7}$  м/с. Энергия активации в исследованной области температур составила 60 кДж/моль [3].

Коэффициенты проницаемости мембран эритроцитов человека для глицерина также определяли по кинетике изменения объема клетки и ее гемолиза. В данном случае применяли метод малоуглового рассеяния света суспензией эритроцитов в гипертоническом водном растворе исследуемого проникающего криопротектора (глицерина). Кривые рассеяния были сняты при температурах 37 и 20 °С (рН 7,0) при различных концентрациях глицерина. Для 20%-й концентрации криопротектора время достижения максимального объема и время 50%-го гемолиза составило ( $30,1 \pm 3,5$ ) с и ( $238,6 \pm 13$ ) с при 37 °С и ( $58,0 \pm 3,9$ ) с и ( $471,8 \pm 52$ ) с при 20 °С соответственно. Рассчитанные коэффициенты проницаемости при этом равны  $3,875 \times 10^{-7}$  м/с для 37 °С и  $1,95 \times 10^{-7}$  м/с для 20 °С. Энергия активации процесса переноса молекул глицерина через мембраны эритроцитов в области указанных температур составила 30,5 кДж/моль [1].

#### *Тензодилатометрия охлаждаемых растворов криопротекторов, клеток и тканей*

Анализ теоретических и экспериментальных данных, имеющих в отечественной и зарубежной литературе, свидетельствует о том, что большинство протекающих в биосистемах процессов сопровождается перестройкой структуры и изменением объема. По изменению объемных эффектов можно достаточно достоверно анализировать состояние физических характеристик растворов криопротекторов и биологических систем во всем температурном интервале процесса криоконсервирования. Однако развитие методов, изучающих изменение объема биосистем при охлаждении, до настоящего времени сдерживалось отсутствием в отечественной и зарубежной практике приборов для точного измерения этих эффектов.

Нами был создан тензодилатометрический комплекс для криобиологических исследований, который дал возможность: определить теплофизические характеристики охлаждаемых биосистем, в том числе температурные зависимости объема различных растворов, клеточных суспензий и тканей в интервале температур  $60 \div -120$  °С, и давлений  $10^5 - 2 \times 10^6$  Па; изучить кинетику структурных превращений в замороженных системах, в том числе переходов, сопровождающихся трудно регистрируемыми тепловыми эффектами, в интервале температур  $-60 \div -196$  °С; определить механические свойства замороженных биосистем в интервале температур  $0 \div -196$  °С. Применение тензодилатометрического комплекса в экспериментальной криобиологии позволило разработать ряд новых методов изучения параметров состояния биосистем, необходимых для оптимизации отдельных этапов технологии криоконсервирования. С его помощью проведены исследования зависимости объемных эффектов при кристаллизации некоторых водных растворов криопротекторов от их концентрации. График полученных зависимостей свидетельствует о том, что криопротектор влияет на изменение объема его водного раствора

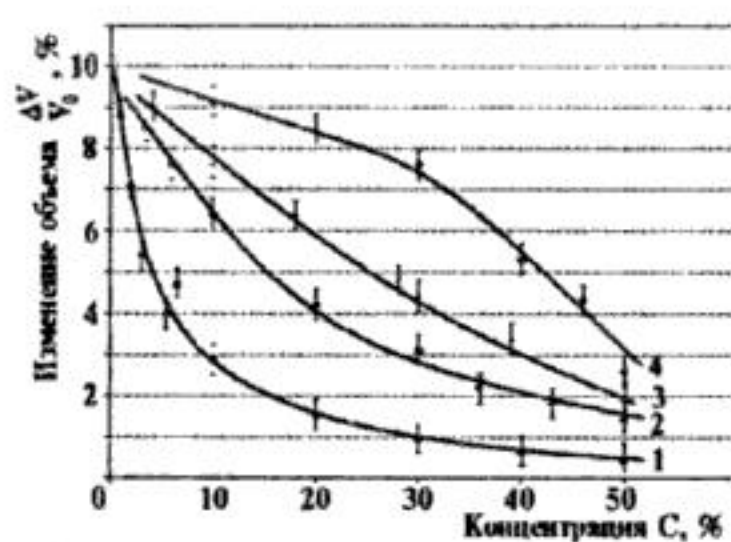


Рис. 3. Относительное изменение объема при кристаллизации растворов криопротекторов в зависимости от их концентрации: 1 – ДМСО, 2 – 1,2-пропандиол, 3 – ПЭО-400, 4 – ПЭО-1500

интервале температур  $-60 \div -196$  °С; определить механические свойства замороженных биосистем в интервале температур  $0 \div -196$  °С. Применение тензодилатометрического комплекса в экспериментальной криобиологии позволило разработать ряд новых методов изучения параметров состояния биосистем, необходимых для оптимизации отдельных этапов технологии криоконсервирования. С его помощью проведены исследования зависимости объемных эффектов при кристаллизации некоторых водных растворов криопротекторов от их концентрации. График полученных зависимостей свидетельствует о том, что криопротектор влияет на изменение объема его водного раствора

при кристаллизации. Очевидно, криопротектор связывает молекулы воды, препятствуя развитию кристаллизации. Как видно из рис. 3, чем выше молекулярная масса криопротектора, тем больше относительное изменение его объема при кристаллизации растворов одинаковых массовых концентраций. Как известно, растворы криопротекторов, изменяющие объем при кристаллизации до 6 %, существенно не влияют на выживаемость биосистем. В то время как при изменении относительного объема растворов криопротекторов более чем на 6 % жизнеспособность после замораживания существенно снижается. Таким образом, можно определить оптимальные для защиты биообъектов в процессе криоконсервирования значения концентрации криопротекторов. Так, для ДМСО это значение составляет не выше 10 %, в то время как для полиэтиленоксида -1500 оно превышает 30 %. Учитывая это обстоятельство, а также высокую проникающую способность молекул ДМСО, при работе со щитовидной железой следует отдать предпочтение этому криопротектору [7].

На основе полученных результатов была разработана высокоэффективная технология криоконсервирования тканей щитовидной железы, позволяющая сохранить функционально-структурную полноценность тиреоидной паренхимы в течение 13 мес хранения при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### *Криомикроскопия*

Успешная реализация методов низкотемпературного консервирования биологических объектов во многом зависит от глубокого понимания физико-химических явлений на всех этапах цикла: подготовка – замораживание – хранение – отогрев. В настоящее время в криобиологических исследованиях широко используются такие современные методы, как калориметрия, ЯМР, ЭПР, электронная микроскопия. Однако все они относятся к косвенным методам. Практически единственным прямым методом, позволяющим изучать состояние биологических систем во всех температурных зонах, является криомикроскопия. Основные физико-химические явления, обуславливающие в конечном счете жизнеспособность клетки после криоконсервирования, развиваются на этапе фазового перехода “вода-лед”. К ним, как известно, относятся дегидратация клеток в каналах кристаллами льда, внутриклеточная кристаллизация, механическое взаимодействие клеток с внеклеточным льдом и др. В зависимости от характеристик процесса охлаждения биологической суспензии фазовый переход в ней сопровождается формированием внеклеточных кристаллов льда различной морфологии. При этом жизнеспособность клеток определяется не только структурой внеклеточных кристаллов, но и распределением клеток в ней. Как показали криомикроскопические исследования, при образовании внеклеточных кристаллов льда наблюдается как отодвижение клеток в образующиеся каналы, так и захват клеток в замкнутые полости и жидкими микрофазами. Такая неоднородность распределения клеток в структуре льда определяет особенность физико-химических условий, в которые попадают клетки, а следовательно, и их ответ на замораживание-отогрев.

Проведенные криомикроскопические исследования показали необходимость создания по возможности максимально равновесных условий фазового перехода. При этом формируется такая структура внеклеточного льда, при которой большинство клеток располагаются в каналах. В данном случае сохранность определяется соотношением размера клеток и размера образующих каналов. При понижении температуры по мере сужения каналов клетки подвергаются как дегидратации, так и механическому сдавливанию кристаллами льда (рис. 4). Криопротекторы, приводя к увеличению ширины каналов, снижают уровень деформации клеток льдом. Однако выделить собственно повреждения механическим фактором оказывается невозможным в связи с тем, что сдавливание клеток в каналах сопровождается их дегидратацией. Механический фактор вносит вклад в повреждение при несоответствии размера обез-

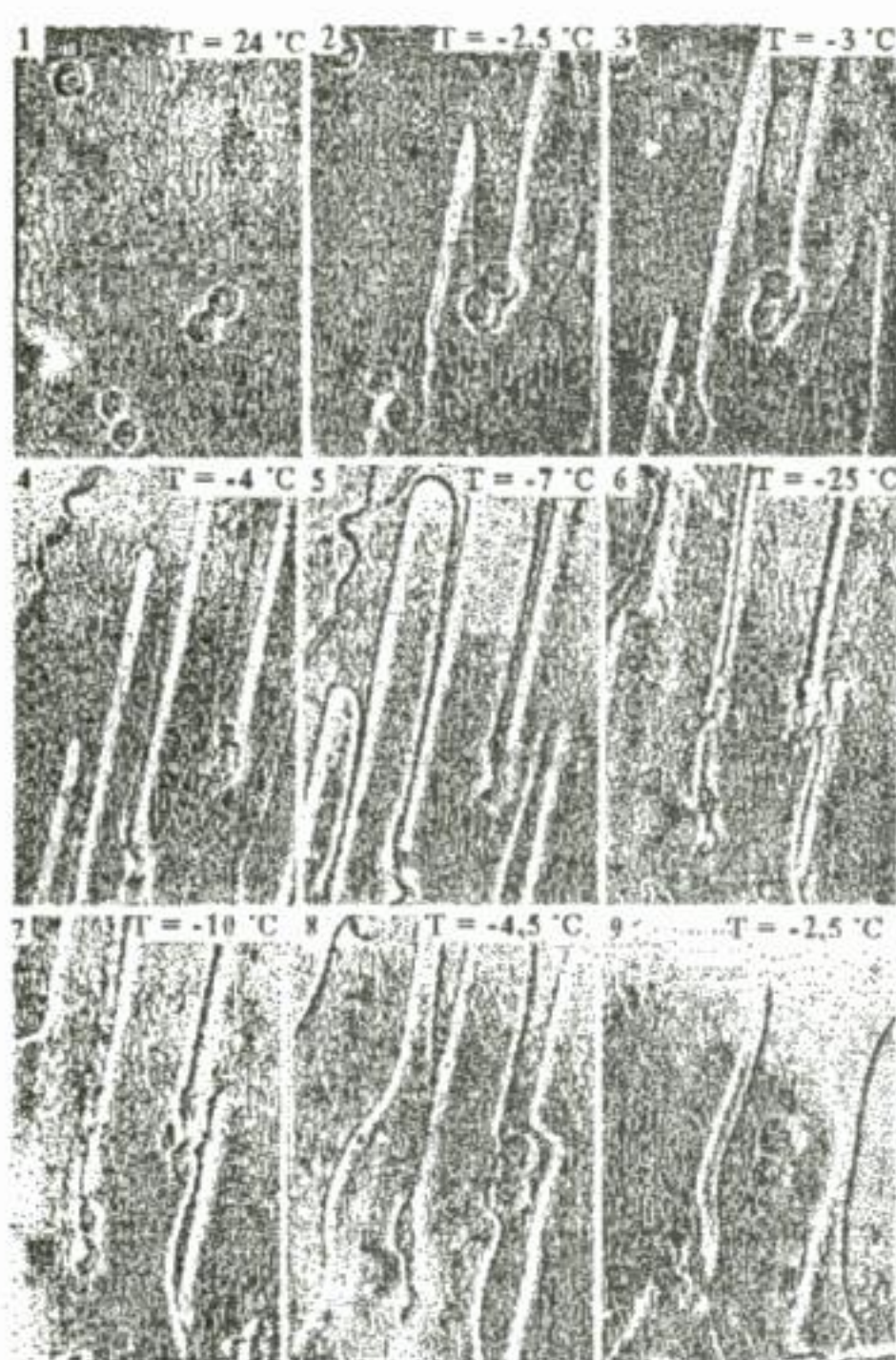


Рис. 4. Обезвоживание и деформация клеток почек сирийского хомячка в каналах.  $\times 120$ . Уменьшение при репродуцировании 3/5

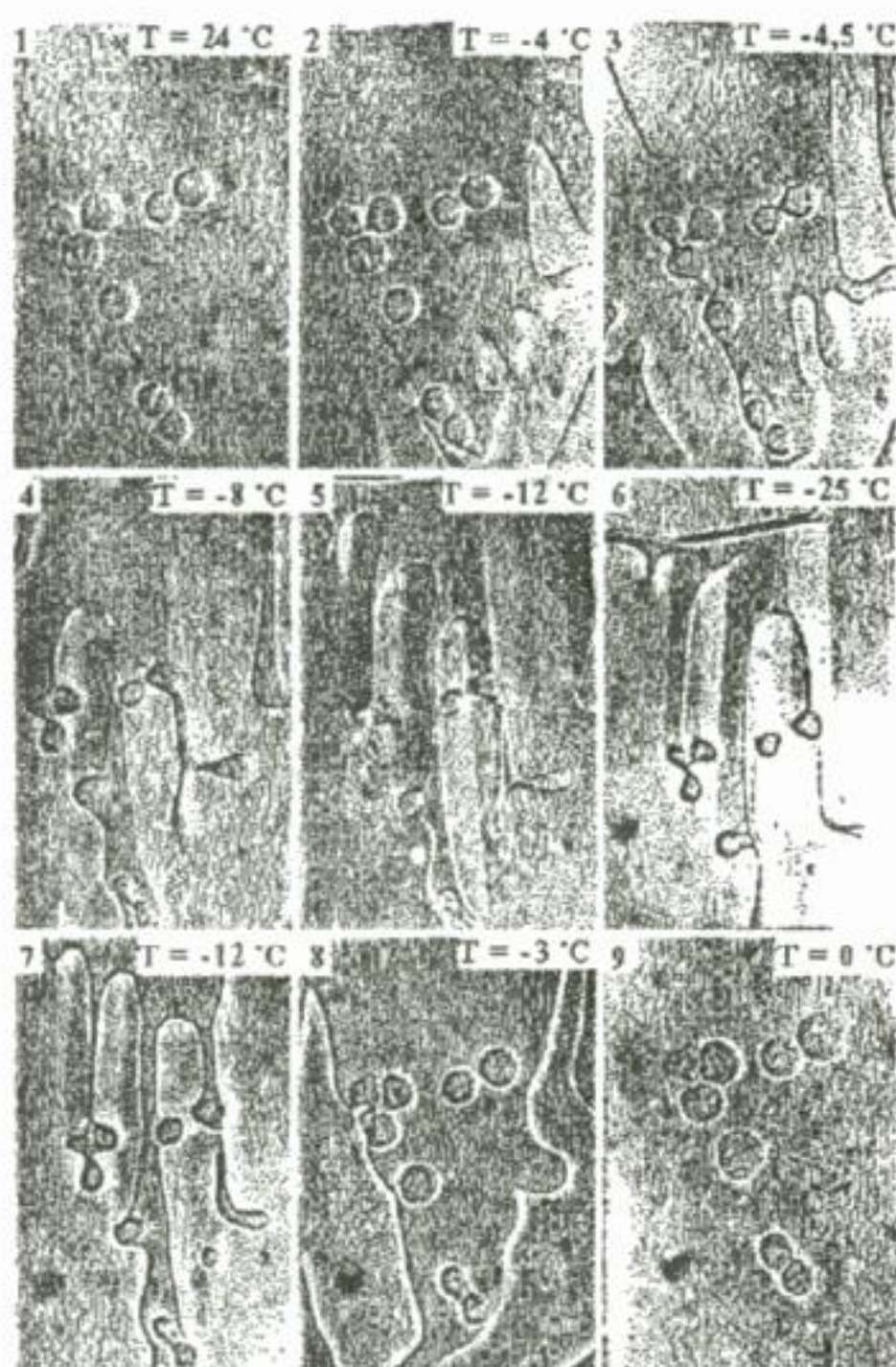


Рис. 5. Повреждение клеток почек сирийского хомячка при их захвате в полости с жидкими микрофазами.  $\times 120$ . Уменьшение при репродуцировании 3/5

воженных клеток и ширины формирующегося канала. При повышении скорости охлаждения рост внеклеточных кристаллов льда происходит в крайне неравновесных условиях. В результате этого фронт кристаллизации теряет устойчивость, что выражается в образовании разветвлений сети вторичных осей дендритов. При этом увеличивается вероятность захвата клеток в полости с жидкими микрофазами, где они обычно повреждаются (рис. 5). Кроме того, увеличение скорости охлаждения обуславливает несоответствие скорости обезвоживания клеток и скорости вымораживания внеклеточной воды, что приводит к механическому повреждению клеток в каналах. В связи с этим в некоторых случаях даже в условиях отсутствия внутриклеточной кристаллизации повышение скорости охлаждения суспензии коррелирует с падением сохранности клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния // Проблемы криобиологии. – 1994. – № 1. – С. 32–38.
2. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Смольянинова Е.И. К вопросу о механизме осмотического лизиса клеток // Биологические мембраны. – 1993. – 10. – № 6. – С. 627–631.
3. Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И. Влияние концентрации внеклеточного хлористого натрия на проницаемость мембран яйцеклеток и эмбрионов мыши для молекул воды // Проблемы криобиологии. – 1993. – № 4. – С. 25–28.
4. Гордиенко Е.А., Некоз И.А. Реактивный эффект при осмотическом лизисе клеток // Биологические мембраны. – 1989. – 6, № 11. – С. 1170–1174.
5. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного криоконсервирования клеточных суспензий. – Киев: Наук. думка, 1994. – 144 с.
6. Кулешова Л.Г., Розанов Л.Ф. Роль структуры внеклеточного льда в процессе криоповреждения клеток // Моделирование криобиологических процессов. – Харьков: Б. и., 1988. – С. 25–34.

7. Пушкарь Н.С., Осецкий А.И., Аненко В.И., Макаренко Б.И. Тензодилатометрия охлаждаемых растворов криопротекторов и тканей // Докл. АН УССР. Сер. Б. – 1990. – № 3. – С. 74–78.

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

Поступила 03.03.95

**М.С.ПУШКАР**, Є.О.ГОРДІЄНКО, О.І.ОСЕЦЬКИЙ, О.І.ГОРДІЄНКО, Л.Г.КУЛЕШОВА

## ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИЧНИХ ПРОЦЕСІВ В БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТАХ ПРІ ГЛИБОКОМУ ОХОЛОДЖЕННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Досліджені фізичні процеси в біологічних системах при низьких температурах. За допомогою фізико-математичного апарату термодинаміки необоротних процесів, теорії пружності проаналізовані причини явищ кріоушкодження клітин під час їх охолодження, розроблені фізико-математичні моделі, які служать систематизації і трактування результатів кріобіологічних експериментів.

**N.S.PUSHKAR**, E.A.GORDIENKO, A.I.OSETSKY, O.I.GORDIENKO, L.G.KULESHOVA

## STUDY OF PHYSICAL PROCESSES IN BIOLOGICAL SYSTEMS DURING PROFOUND COOLING

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

Physical processes, occurring in biological systems at low temperatures, were studied. Using a physico-mathematical apparatus of the thermodynamics of the irreversible processes, a theory of elasticity, the authors analyzed the reasons for the events of cell cryoinjury during their cooling, and developed physico-mathematical models, which may be used for systematization and interpretation of the results of cryobiological experiments.

УДК 612.13.014.43:547.422

**В.И.Луговой, О.В.Липина, В.К.Мазалов, И.В.Слета**

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНОКСИДОВ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ

Экспериментально показано, что при общем остром охлаждении белых крыс введение растворов полиэтиленоксида молекулярной массы 400 и 1500 способствует значительному снижению интенсивности нарастания вязкости крови и минимального напряжения сдвига, менее выраженному увеличению гематокрита, нормализации микроциркуляции.

Существенная роль в нарушении кровообращения при охлаждении организма принадлежит гемореологическим изменениям [2]. В связи с этим актуальной задачей является поиск новых лекарственных препаратов, обеспечивающих нормализацию патофизиологических изменений в условиях охлаждения теплокровных организмов. Большой интерес в этом отношении представляют вещества ряда полиэтиленоксида (ПЭО), которые, как известно, способны понижать гидродинамическое сопротивление, а также периферическое сопротивление и динамическую вязкость крови при малых напряжениях сдвига в условиях нормотермии [1, 3]. Целью данной работы было изучение возможности применения полиэтиленоксидов с молекулярной массой 400 и 1500 для коррекции гемореологических расстройств, возникающих при общем охлаждении теплокровного организма.

В опытах использовали белых беспородных крыс массой 220–250 г, которых охлаждали погружением в холодную воду ( $t=3^{\circ}\text{C}$ ). О степени охлаждения животных судили по снижению ректальной температуры (РТ), которую измеряли на глубине 2,5 см термометром ТПЭМ-1. Максимальное время плавания крыс в холодной воде составляло 5 мин 45 с. При этом ректальная температура снижалась до  $19^{\circ}\text{C}$ , после чего животные теряли способность удерживаться на воде и тонули. Кровь для исследования брали из нижней полой вены шприцом,

обработанным гепарином. Измерение динамической вязкости крови проводили на модифицированном капиллярно-рамочном вискозиметре типа Копли [3] в диапазоне напряжений сдвига ( $\tau$ ) 2,65–9,5 дин/см<sup>2</sup> при температуре равной температуре тела охлажденного животного. Текучесть крови оценивали по величине предельного (минимального) напряжения сдвига, которое необходимо приложить, чтобы кровь пришла в движение. Величину предельного напряжения сдвига при различных температурах рассчитывали по Casson [4]. Гематокрит определяли путем центрифугирования крови со скоростью 3000 об/мин в течение 15 мин. Биомикроскопию сосудистого русла проводили на специально оборудованном микроскопе "Люмам Р-1", снабженном средствами фото- и телерегистрации.

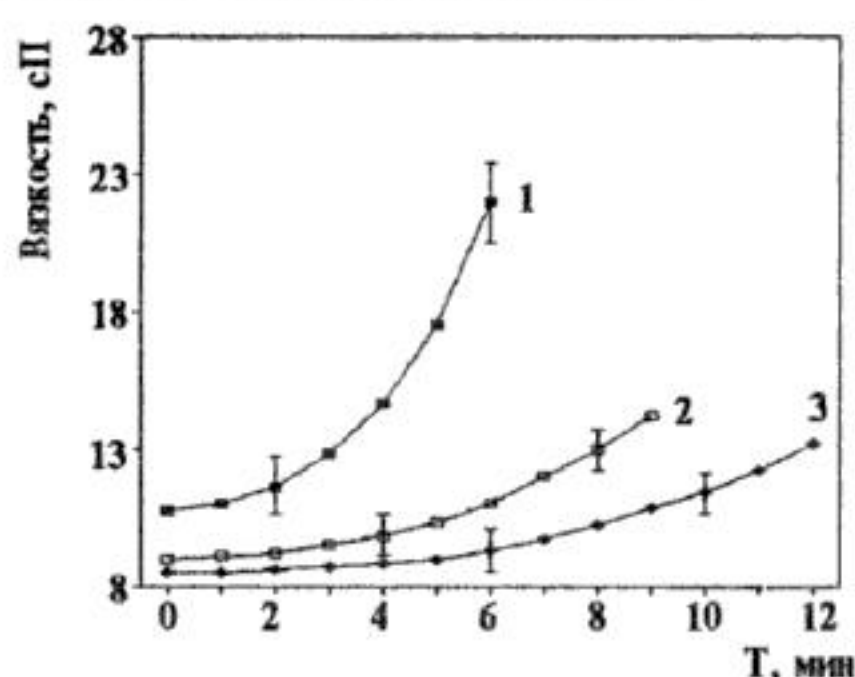


Рис. 1. Влияние охлаждения и растворов ПЭО на вязкость крови крыс в зависимости от времени нахождения животных в холодной воде ( $\tau = 2,85$  дин/см<sup>2</sup>): 1 – без премедикации, 2 – ПЭО-400; 3 – ПЭО-1500

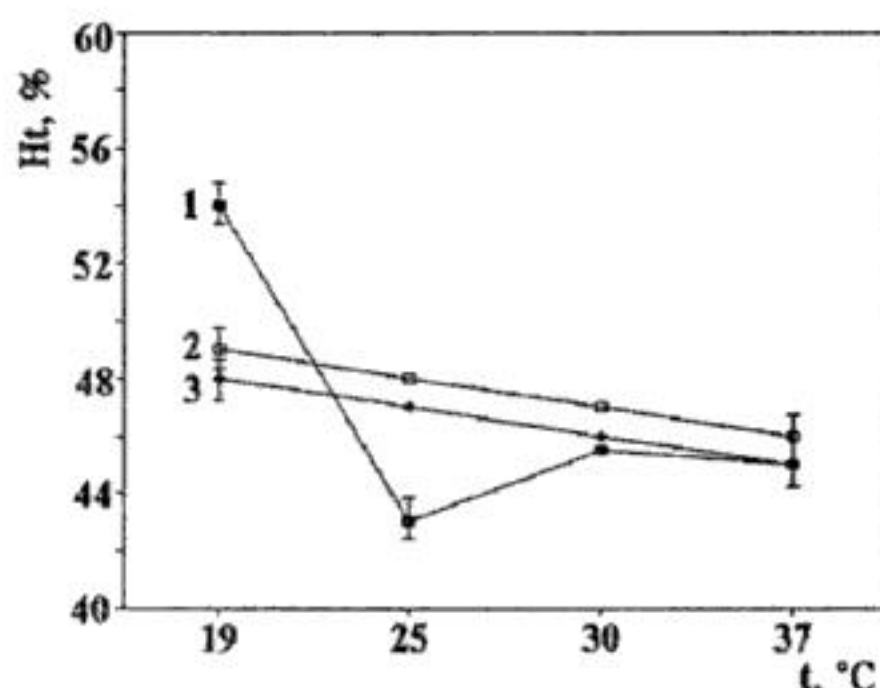


Рис. 2. Влияние растворов ПЭО на изменение гематокрита в процессе общего охлаждения крыс: 1 – без премедикации, 2 – ПЭО-400, 3 – ПЭО-1500

Для изучения влияния ПЭО на реологические свойства крови и микроциркуляцию крысам перед их погружением в холодную воду вводили 15%-е растворы ПЭО-400 или ПЭО-1500 [3]. Контролем служили реологические показатели крови и картина микроциркуляторного русла брыжейки крыс, которых охлаждали без премедикации. Было установлено, что введение животным перед охлаждением растворов ПЭО способствовало менее выраженному нарастанию вязкости крови, чем у крыс, охлаждаемых без премедикации, что особенно характерно для малых напряжений сдвига. Так (рис. 1), при глубокой гипотермии крыс (РТ 19–20 °С) на фоне введенных ПЭО-400 и ПЭО-1500 величина динамической вязкости крови при напряжении сдвига 2,85 дин/см<sup>2</sup> достигает  $(14,0 \pm 0,85)$  сП и  $(13,2 \pm 0,9)$  сП соответственно, тогда как у охлаждаемых без препарата вязкость крови значительно выше  $(22,0 \pm 1,1)$  сП.

Влияние ПЭО-400 и ПЭО-1500 на величину минимального напряжения сдвига крови (дин/см<sup>2</sup>) охлаждаемых крыс

| Условия охлаждения | Температура организма, °С |      |      |      |
|--------------------|---------------------------|------|------|------|
|                    | 37                        | 30   | 25   | 19   |
| Без премедикации   | 0,30                      | 0,38 | 0,46 | 1,02 |
| Введение ПЭО-400   | 0,30                      | 0,34 | 0,34 | 0,49 |
| Введение ПЭО-1500  | 0,30                      | 0,32 | 0,36 | 0,46 |

введении ПЭО-400 или ПЭО-1500 была в полтора-два раза ниже, чем без премедикации. При этом ПЭО-1500 в большей мере чем ПЭО-400 способствует замедлению нарастания вязкости крови охлаждаемых крыс.

Результаты исследования влияния ПЭО-400 и ПЭО-1500 на величину минимального напряжения сдвига крови при общем остром охлаждении крыс,

После 5-минутного пребывания крыс в холодной воде на фоне премедикации вязкость крови достоверно от нормотермического уровня не отличалась. Даже на уровне максимальной экспериментальной гипотермии, которая достигалась через 9–12 мин охлаждения, вязкость крови при

расчетные значения которого приведены в таблице, свидетельствуют о значительном уменьшении этого показателя по сравнению с таковым для животных, охлаждаемых без ПЭО, особенно при глубокой гипотермии ( $PT\ 19\ ^\circ C$ ).

При изучении влияния полиэтиленоксидов на изменение показателя гематокрита при охлаждении крыс было установлено, что ПЭО-400 и ПЭО-1500 изменяют характер температурной зависимости гематокрита: при введении растворов ПЭО-400 и ПЭО-1500 гематокрит увеличивается в меньшей степени и его температурная зависимость приобретает линейный характер как для ПЭО-400, так и для ПЭО-1500 (рис. 2).

Введение экспериментальным животным накануне охлаждения растворов ПЭО способствует не только улучшению реологических характеристик крови, но и нормализации микроциркуляции. Если пребывание крыс в холодной воде в течение 5 мин без премедикации вызывало прекращение циркуляции крови в микрососудах брыжейки, то на фоне введенного ПЭО микроциркуляторная картина характеризовалась исключением из кровотока только части капилляров. В артериолах и венах кровоток сохранялся, хотя наблюдались агрегаты эритроцитов (рис. 3).



Рис. 3. Микроциркуляторное русло брыжейки крыс после введения ПЭО-1500 и охлаждения в воде в течение 5 мин. Объектив  $\times 10$ , окуляр  $\times 7$ . Уменьшение при репродуцировании 3/5

Максимально длительное прижизненное охлаждение крыс, которое при введении ПЭО-400 достигалось через 9 мин плавания в холодной воде, а при введении ПЭО-1500 – через 12 мин, сопровождалось исключением из кровотока части микрососудов (как заполненных кровью, так и запустевших). Однако примерно в 30% микрососудов брыжейки кровоток сохранялся, тогда как при 5-минутном охлаждении без премедикации отсутствовал полностью. Диаметр функционирующих сосудов несколько увеличен, кровоток замедлен, выглядит густым, зернистым (рис. 4), наблюдаются множественные белые тромбы. Лимфоток сохраняется (рис. 5). Микрогемоциркуляторное русло брыжейки после охлаждения животных, которым вводили ПЭО-400, заметно не отличается от крыс, которым вводили ПЭО-1500.

Таким образом, введение полиэтиленоксидов с молекулярной массой 400 и 1500 при общем остром охлаждении крыс способствует значительному сни-

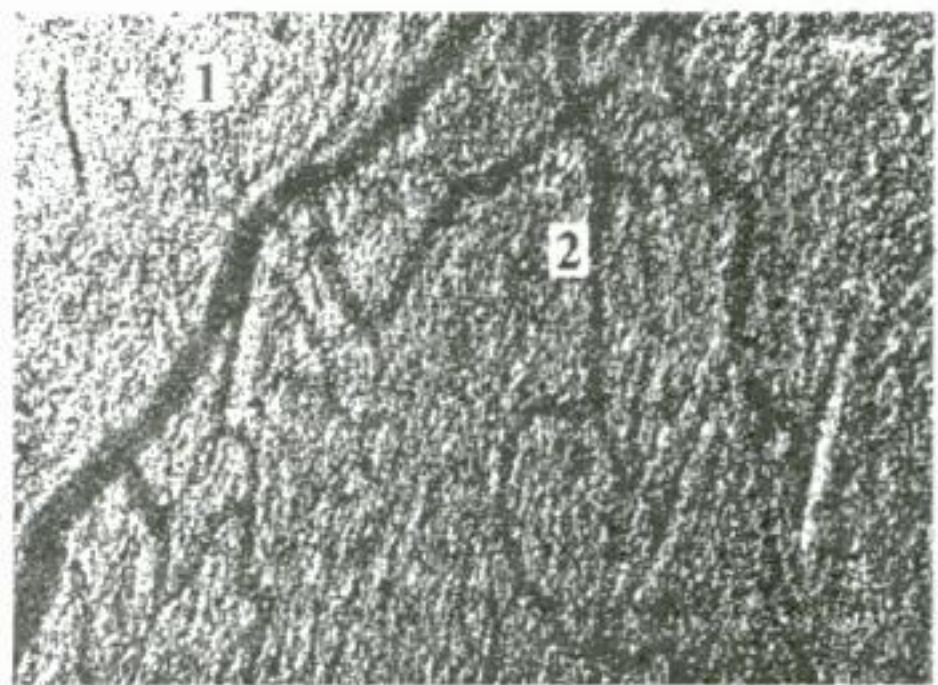


Рис. 4. Микрогемоциркуляторное русло брыжейки крыс после введения ПЭО-1500 и охлаждения в воде ( $PT = 19\ ^\circ C$ ): 1 – зона, в которой кровоток отсутствует, 2 – зона, в которой кровоток сохранился. Объектив  $\times 10$ , окуляр  $\times 7$ . Уменьшение при репродуцировании 3/5

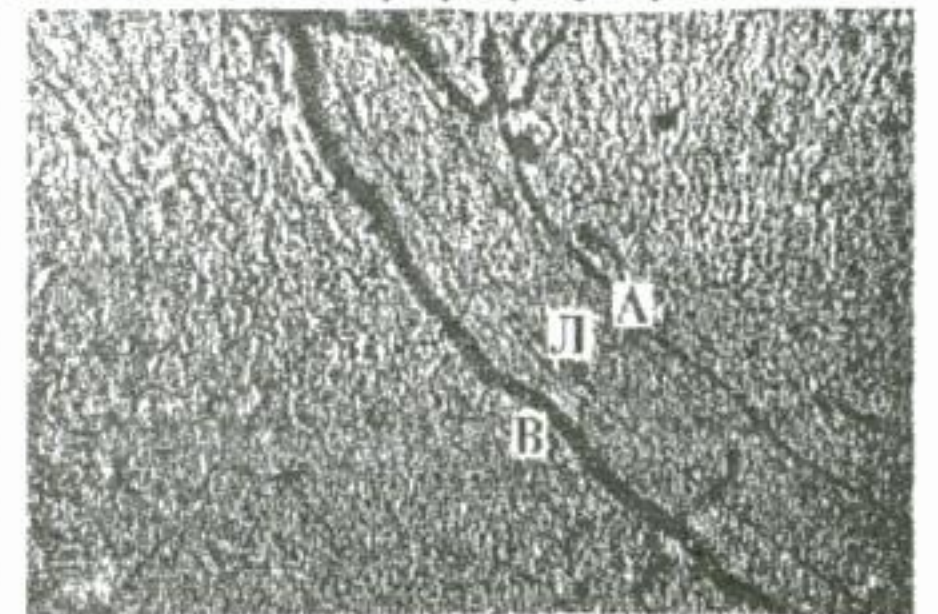


Рис. 5. Микроциркуляторное русло брыжейки крыс после введения ПЭО-1500 и охлаждения в воде до ректальной температуры  $19\ ^\circ C$ . Сохранился лимфоток (Л). А – артериола; В – венола. Объектив  $\times 10$ , окуляр  $\times 7$ . Уменьшение при репродуцировании 3/5

жению нарастания вязкости крови и минимального напряжения сдвига, а также менее выраженному увеличению гематокрита, улучшая тем самым текучесть крови и ее микроциркуляцию. Представленные результаты позволяют надеяться на раскрытие патогенетических механизмов холодовой травмы у теплокровных организмов и их коррекцию с помощью криопротекторных веществ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорян С.С., Ганнушкина И.В., Каменева М.В. и др. О сочетанном влиянии фактора крови С-26 и полиэтиленоксида на гемодинамику // Анестезиология и реаниматология. – 1987. – № 4. – С. 64–66.
2. Майстрах Е.В. Патологическая физиология охлаждения человека. – Л.: Наука, 1969. – 216 с.
3. Пустовойт П.А. Влияние криопротекторов и замораживания эритроцитов на реологические свойства крови: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Харьков, 1984. – 24 с.
4. Селезнев С.А., Ващенко С.М., Мазуркевич Г.С. Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии. – Л.: Медицина, 1976. – 205 с.
5. А.с. 1520688 СССР (1989 г.). Не публикуется.

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

Поступила 02.02.95

В.Й.ЛУГОВІЙ, О.В.ЛІПІНА, В.К.МАЗАЛОВ, І.В.СЛІТА

## ВПЛИВ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДУ НА РЕОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КРОВІ БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ОХОЛОДЖЕННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

Експериментально показано, що при загальному гострому охолодженні білих щурів введення розчинів поліетиленоксиду молекулярної маси 400 і 1500 сприяє значному зниженню (зростання) в'язкості крові та мінімальної напруги зсуву, менш вираженому збільшенню гематокріта, нормалізації мікроциркуляції.

V.I.LOUGOVOY, O.V.LIPINA, V.K.MAZALOV, I.V.SLETA

## EFFECT OF POLYETHYLENE OXIDES ON RHEOLOGIC PROPERTIES OF WHITE RAT BLOOD DURING COOLING

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

It was demonstrated experimentally that under total acute cooling of white rats injection of solutions of polyethylene oxide with molecular mass of 400 (PEO-400) and 1500 (PEO-1500) facilitates a considerable reduction in the intensity of a rise in blood viscosity and minimum tension shift, a less manifested increase in hematocrit value and normalization of microcirculation.

УДК 57.043:636

Н.Д.Безуглый, Н.А.Гордиенко

## ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК И ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РАСТВОРАХ КРИОПРОТЕКТОРОВ.

### 1. Общее описание изменений клеточного объема

Рассматривается осмотическая реакция клеток в растворах криопротекторов. Предложено количественное описание поведения яйцеклеток и эмбрионов при любых изменениях объема в любой момент времени и показана зависимость длительности уравнивания клетки со средой от начальной и конечной концентрации проникающих и непроникающих веществ. Определены коэффициенты проницаемости к глицерину и диметилсульфоксиду (ДМСО) для яйцеклеток и эмбрионов мыши и крупного рогатого скота, показано, что зона пеллюцида не обладает избирательной проницаемостью к низкомолекулярным веществам. Предложен механизм повреждения яйцеклеток и эмбрионов при насыщении и выведении криопротектора.

Важными этапами криоконсервации эмбрионов млекопитающих является выбор защитного вещества, режим добавления его в среду перед заморажи-

ванием и удаление его из среды после оттаивания. Первые положительные результаты криоконсервации эмбрионов мыши [14], овцы [12], коровы [13] и других млекопитающих получены при использовании плавных режимов насыщения и выведения проникающих криопротекторов. Хотя эти эмпирически подобранные методы обеспечили сохранность зародышей, не ясно, в какой степени они оптимальны. Для оптимизации режимов применения криопротекторов необходимо изучить осмотическое поведение эмбрионов в растворах защитных веществ.

Впервые осмотическая реакция клеток в растворах криопротекторов количественно была описана в работе [3], и основные ее выводы подтверждены численным решением уравнений проницаемости [10]. Предложенные модели можно рассматривать как описание общего вида осмотического поведения клетки в растворах криопротекторов, однако расчет конкретных методик насыщения и выведения для определенного типа клеток сделан не был. Целью данной работы было изучение осмотической реакции зародышей в растворах криопротекторов для разработки технологического режима их применения.

В опытах были использованы эмбрионы мышей линии СВВА и крупного рогатого скота. Получение зародышей проводили по общепринятым методикам. Жизнеспособность эмбрионов оценивалась по результатам культивирования в фосфатно-солевом буфере Дюльбекко с 20% фетальной сыворотки и по стельностям коров-реципиентов, которым были пересажены зародыши. Осмотическую реакцию эмбрионов млекопитающих изучали методом волюмометрии [2]. При этом изменение объема зародыша в средах различного состава фотографировали на микроскопе МБИ-12. После обработки фотопленки на проекционном устройстве получали увеличенное изображение клетки и методом планиметрии определяли площадь поперечного сечения. Для однородного в пространстве сжатия и расширения клетки относительный объем можно определять по формуле [2]:

$$v(t) = \left[ \frac{\Gamma(t)}{\Gamma^{iso}} \right]^{3/2}, \quad (1)$$

где  $v(t) = \frac{V_c(t)}{V_c^{iso}}$  – относительный объем клетки;  $V_c$  – клеточный объем;  $\Gamma$  – площадь сечения клетки;  $t$  – время; суперскрипт  $iso$  относится к изотоническому раствору.

*Физико-математическая модель осмотического поведения клетки.* При моделировании осмотической реакции клеток цитоплазму и окружающую среду можно рассматривать как идеальные растворы, состоящие из воды –  $w$ , веществ, проникающих через мембрану, –  $p$ , непроникающих –  $i$  и осмотически неактивных –  $b$ . В этом случае клеточный объем  $V_c$  равен:

$$V_c = V_w + V_i + V_p + V_b, \quad (2)$$

Если мы определим  $j_v$  как общий поток веществ в клетку,  $j_w$  – поток воды и  $j_p$  – поток проникающих растворенных веществ, то соответствующие изменения объемов будут выглядеть следующим образом:

$$\frac{dV_c}{dt} = j_v S, \quad (3)$$

$$\frac{dV_{w,p}}{dt} = v_{w,p} j_{w,p} S, \quad (4)$$

где  $S$  – площадь поверхности мембраны клетки,  $v_w$  и  $v_p$  – молярные объемы воды и растворенного вещества.

Для одиночных изолированных клеток объемные потоки веществ и воды через цитоплазматическую мембрану описываются уравнениями Кедема-Качалского [9]:

$$j_v = L_p [ \Delta P - RT ( \Delta C_i + \sigma \Delta C_p ) ], \quad (5)$$

$$j_p = \bar{C}_p (1 - \sigma) j_v + RTw \Delta C_p, \quad (6)$$

где  $L_p$  – коэффициент проницаемости к воде;  $\bar{C}_p$  – усредненное значение осмолярности проникающих веществ;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – температура;  $\sigma$  – коэффициент отражения ( $\sigma < 1$ );  $\Delta P$ ,  $\Delta C_i$ ,  $\Delta C_p$  – обозначают соответственно разность (внутриклеточная,  $e$ , минус внеклеточная,  $i$ ) гидростатического давления и осмолярностей непроникающих и проникающих веществ на клеточной мембране;  $w$  – коэффициент проницаемости к проникающему веществу.

При решении системы (2)–(6) следует учитывать, что 1) при сжатии клеток в гипертонических растворах силами упругого натяжения можно пренебречь [10]; 2) площадь поверхности мембраны остается постоянной при сжатии и расширении клетки, так как изменение объема происходит за счет деформации мембран путем изгиба [4] и (или) перераспределения вещества мембраны между микровилли [1]; 3) раствор можно считать идеальным, если концентрация растворенных веществ удовлетворяет выражению  $C_{i,p} < \frac{\mu_{i,p}}{v_{i,p}}$ , где  $\mu$  – степень диссоциации веществ [1]; 4) растворенные вещества равномерно распределены в цитоплазме и в окружающей клетку среде, то есть диффузионные процессы в среде протекают намного быстрее осмотических на мембране, при выполнении условия  $\frac{L_p}{1 - v_b} < \frac{D}{3C_i} RT$ , где  $v_b = \frac{V_b}{V_c}$  – относительный объем осмотически неактивных веществ в клетке,  $D$  – коэффициент диффузии растворенных веществ в клетке [1]; 5) большинство криопротекторов намного медленнее проникают в клетку по сравнению с водой, то есть выполняется условие  $w v_p < L_p$  и  $\sigma \rightarrow 1$  [4]. Так как вышеуказанные условия выполняются для яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих [2], их осмотическая реакция может быть описана аналитическим решением системы уравнений (2)–(6) при любых изменениях клеточного объема. При изменении осмолярности и состава среды осмотическую реакцию клетки можно разбить на два этапа. Вначале происходит изменение клеточного объема за счет выравнивания вне- и внутриклеточного давления при перераспределении воды между клеткой и окружающей средой согласно уравнениям:

$$\frac{t}{\tau_w} = \frac{(C_i^{iso} + C_p^o)}{(C_i^e + C_p^e)} (1 - v) + \left[ \frac{C_i^{iso} + C_p^o}{C_i^e + C_p^e} \right]^2 \ln \frac{C_i^{iso} + C_p^o - C_i^e - C_p^e}{C_i^{iso} + C_p^o - v (C_i^e + C_p^e)}, \quad (7)$$

$$\tau_w = 1 / L_p \left( \frac{S}{V_w} \right)^{iso} RT C_i^{iso}, \quad (8)$$

где  $\tau_w$  – характерное время проникновения воды через цитоплазматические мембраны;  $v = \frac{V_w(t)}{V_w^{iso}}$  – относительный объем воды в клетке;  $\left[ \frac{S}{V_w} \right]^{iso}$  – поверхностно-объемное соотношение. На втором этапе медленно, по сравнению с первым процессом, объем изменяется за счет выравнивания концентраций криопротектора при постоянном осмотическом давлении по закону:

$$\frac{t}{\tau_p} = \frac{C_i^{iso} + C_p^o}{\mu_p C_i} + \frac{(C_i^e + C_p^e) C_i^{iso}}{\mu_p (C_i^e)^2} \left[ \ln \frac{C_i^{iso} C_p^e - C_i^e C_p^o}{(C_p^e + C_i^e) (C_i^{iso} - C_i^e v)} - \frac{C_i^e}{C_i^{iso}} v \right], \quad (9)$$

$$\tau_p = 1 / w (3 / V_w^{iso}) RT, \quad (10)$$

где  $\tau_p$  – характерное время транспорта проникающих веществ,  $C$  – начальная концентрация криопротектора в клетке. В случае непроникающих криопротекторов второй этап отсутствует, осмотическая реакция клетки описывается уравнениями (7)–(8). Анализ решения показывает, что уравнения (7)–(10) качественно описывают осмотическую реакцию клетки так же, как описано в

работе [3]: при переносе клетки в раствор криопротектора она сжимается в результате обезвоживания и на следующем этапе восстанавливает свой объем вследствие входа защитного вещества; при переносе насыщенной криопротектором клетки в изотонический раствор она разбухает в результате оводнения, а затем восстанавливает свой объем в результате выхода защитного вещества. В то же время предложенные решения определяют клеточный объем в момент времени  $t$  для любых (а не только для бесконечно малых) изменений и показывают зависимость длительности уравнивания клетки со средой от начальной и конечной концентрации проникающих и непроникающих веществ, а именно: длительность уравнивания возрастает с уменьшением концентрации непроникающих веществ во внеклеточной среде, с увеличением концентрационного шага и начальной концентрации в клетке проникающих веществ, длительность сжатия клетки меньше длительности разбухания при прочих равных условиях.

*Проницаемость цитоплазматических мембран эмбрионов коров и мыши к ДМСО и глицерину.* Для определения длительности эквilibрации эмбрионов в растворах криопротекторов необходимо знание поверхностно-объемного соотношения и удельной проницаемости цитоплазматических мембран зародышей ((8)–(10)). Поверхностно-объемное соотношение определяли в предположении сферичности яйцеклетки, зиготы и бластомеров на стадии морулы. На стадии развития от 2 до 8 клеток предполагалось, что бластомеры имеют форму сплюснутого эллипсоида вращения. При этом исключалась площадь контактов между бластомерами и учитывался объем осмотически неактивного вещества в клетке. Поверхностно-объемное соотношение составляет 0,100; 0,100; 0,127; 0,159; 0,210; 0,285  $\text{мкм}^{-1}$  для яйцеклетки, зиготы, 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов и морулы мыши соответственно: и 0,077; 0,077; 0,204; 0,425  $\text{мкм}^{-1}$  для яйцеклетки, зиготы, ранней морулы и 7-дневного эмбриона коровы соответственно.

Сравнение изменения клеточного объема зиготы мыши при помещении в 1М растворы глицерина и ДМСО (рис. 1) показывают, что проницаемость к ДМСО достаточно высока и сравнима с проницаемостью к воде. Глицерин можно отнести к медленно проникающим по сравнению с водой веществам.

Удельная проницаемость к ДМСО на разных стадиях развития от неоплодотворенной яйцеклетки до морулы не изменяется и составляет  $1,65 \times 10^{-3}$  см/мин и  $10^{-4}$  см/мин для эмбрионов коровы и мыши соответственно. Глицерин в ооциты коров не проникает, а цитоплазматические мембраны бластомеров морулы высокопроницаемы к глицерину. Коэффициент проницаемости на этой стадии развития –  $2,2 \times 10^{-3}$  см/мин. При оплодотворении и дальнейшем дроблении зародыша мыши проницаемость к глицерину возрастает от  $1 \times 10^{-5}$  см/мин для яйцеклетки до  $5,1 \times 10^{-4}$  см/мин для морулы и составляет  $3,33 \times 10^{-5}$  см/мин;  $4,1 \times 10^{-5}$ ;  $9,6 \times 10^{-5}$ ;  $3,1 \times 10^{-4}$  см/мин для зиготы, 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов соответственно. Характерные времена транспорта глицерина и ДМСО через цитоплазматические мембраны колеблются от нескольких минут до часов для яйцеклетки и эмбрионов различных стадий развития, что необходимо учитывать при разработке методов применения криопротекторов.

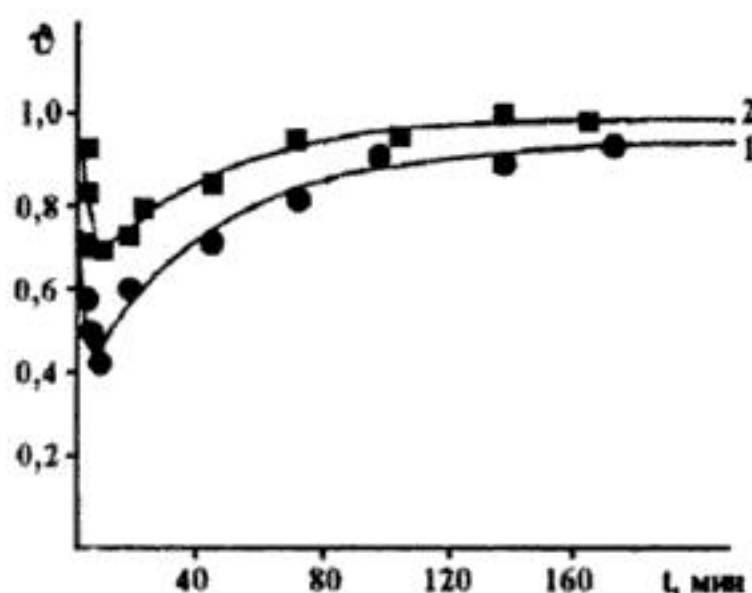


Рис. 1. Изменение относительного объема зиготы мыши со временем после переноса из фосфатно-солевого буфера в 1М раствор глицерина (1,  $n=16$ ), и 1М раствор ДМСО (2,  $n=15$ ); — вычисленные значения

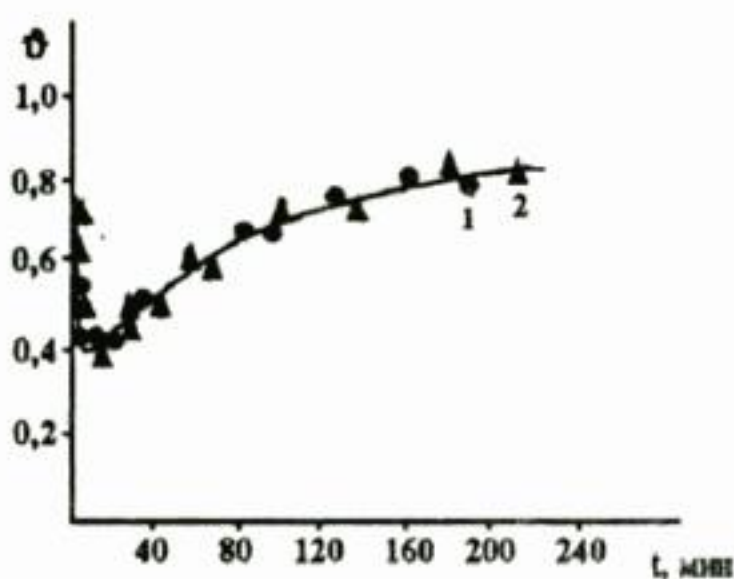


Рис. 2. Изменение объема яйцеклетки мыши в 1М растворе глицерина на фосфатно-солевом буфере с интактной зоной пеллюцида (1,  $n=15$ ) и после удаления последней (2,  $n=13$ ); — вычисленные значения

Следование осмотической реакции мышинных яйцеклеток с зоной пеллюцида и после ее удаления в гипертонических растворах ДМСО и глицерина показало, что прозрачная оболочка не является значительным барьером для проникновения через нее молекул воды, глицерина и ионов натрия и хлора (рис. 2). Размеры пор в зоне пеллюцида сравнимы с характерными размерами высокомолекулярных соединений типа поливинилпирролидона. Прозрачная оболочка не является полупроницаемым барьером для низкомолекулярных соединений и ее влияние на транспорт таких веществ можно не учитывать. Следовательно, осмотическое поведение яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих в растворах низкомолекулярных соединений определяется только избирательной проницаемостью цитоплазматических мембран и не зависит от свойств зоны пеллюцида.

*Механизм повреждения клеток при насыщении и выведении криопротекторов.* Обратимое изменение клеточного объема при насыщении и сжатии клеток может происходить только в определенном диапазоне значений, так как существует критическое значение объема. Считают, что расширение клетки происходит за счет растяжения мембран [4]. Однако показано, что цитоплазматическая мембрана клеток млекопитающих может растягиваться незначительно, на 3–4% [6]. При дальнейшем растяжении она теряет упругие свойства и разрывается, а клетка погибает. Незначительность упругих сил натяжения мембраны как при разбухании, так и при сжатии яйцеклеток и эмбрионов в докритических диапазонах изменения клеточного объема подтверждается тем, что эти клетки являются абсолютными осмометрами [11]. Некоторое натяжение мембраны при этом определяется, видимо, упругостью цитоскелета. Мембраны большинства клеток млекопитающих не являются гладкими, а покрыты многочисленными микровилли в виде микроворсинок, микроскладок и т. п. [8]. Такое строение мембран характерно и для яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих [5]. Мы считаем, что при оводнении зародышей увеличение объема происходит за счет распрямления участков мембран, заложенных в микровилли. При полном распрямлении микровилли после незначительного растяжения клетки лизируются из-за слабой способности мембраны к растяжению. Зная площадь мембраны, “скрытую” в микровилли, можно рассчитать относительный критический объем клетки:

$$v_c^{cr} = (1 + \alpha)^{3/2}, \quad (11)$$

где  $\alpha$  — доля мембраны, “скрытая” в микровилли. По данным работы [5], около 70% мембран эмбрионов мыши ранних стадий развития сосредоточено в микровилли, что соответствует значению критического объема 2,2. Однако зона пеллюцида яйцеклетки и эмбрионов ранних стадий развития препятствует

Характерной чертой строения эмбрионов млекопитающих является наличие зоны пеллюцида, чем некоторые авторы объясняют их специфическую реакцию на воздействие низких температур [7]. Для выяснения ее роли в процессах проницаемости сравнивалось поведение яйцеклеток и эмбрионов в растворах проникающих и непроникающих веществ с интактной зоной пеллюцида и после ее удаления. Для удаления зоны пеллюцида использовали 0,5%-й раствор проназы в среде Хенкса. В результате установлено, что зона пеллюцида не изменяет своей формы при переносе клеток в не-изотонический раствор. Изменение объема клеток происходит только за счет деформации цитоплазматической мембраны. Ис-

разбуханию клеток, так как перепад осмотического давления на цитоплазматической мембране компенсируется упругими силами растяжения прозрачной оболочки. Клетки повреждаются при меньших значениях относительного объема и, возможно, повреждение происходит в местах соприкосновения цитоплазматической мембраны с порами зоны пеллюцида. Уменьшение объема зародыша происходит за счет более плотной "укладки" мембраны и возрастания площади, заключенной в микровилли. Поэтому в большинстве случаев форма клетки в гипертонических растворах подобна таковой в изотонических условиях [1]. Вследствие различных механизмов разбухания и сжатия выведение криопротектора из клетки намного опаснее этапа насыщения клетки криопротектором.

Таким образом, предложенное описание осмотической реакции клеток в растворах криопротекторов позволяет определить клеточный объем для любых его изменений и рассчитать относительный критический объем клетки. Определены коэффициенты проницаемости к глицерину и ДМСО для яйцеклеток и эмбрионов мыши и крупного рогатого скота. В следующей части нашего исследования эти результаты будут использованы для оптимизации методов применения защитных веществ при криоконсервации эмбрионов млекопитающих.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безуглый Н.Д. Осмотическая реакция яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих при криоконсервации: Автореф. дис.... канд. биол. наук. – Харьков, 1984 – 24 с.
2. Безуглый Н.Д., Осташко Ф.И., Волкова Е.Г., Пинцов В.М. Волюмометрия как метод изучения проницаемости мембранного аппарата яйцеклетки и эмбрионов млекопитающих // Научн.-техн. бюлл. НИИЖЛ и П УССР. – 1986, – № 34. – С. 25–34.
3. Гордиенко Е.А., Бронштейн В.Л. К механизму лизиса. Математическая модель. Приложение к криобиологии // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. – Киев: Наук. думка, 1974. – С.13–18.
4. Иткин Ю.А., Гордиенко Е.А., Бронштейн Л.В. Физико-математический анализ механизмов криоповреждений и криозащиты клеток // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. – Киев: Наук. думка, 1974. – С. 305–309.
5. Anderson E., Ducibella I., Ukona T., Karvonsky M. Ultrastructural developmental changes // The freezing of mammalian embryos // General discussion. Ciba Found. Symp., Amsterdam: Elsevier, 1977. – P. 226–228.
6. Evans B.A., Hochmut R. Mechanochemical properties of membrane // Current topics in membrane and transport / Eds. by F.Bronner, A.Kleinzeller. – 1978. – № 4. – P. 1–64.
7. Frim J., Krew J., Kanagawa H. The effect of puncturing the zona pellucida on freeze-thaw survival of bovine embryos // Can. J. Anim. Sci., – 1993. – 59, № 3. – P. 623–626.
8. Knutton S.O., Jacson J.M., Graham J.M. et al. Microvilli and swelling // Nature. – 1976. – № 262. – P. 52–54.
9. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability // J. Gen. Physiol. – 1961. – 45, № 1. – P. 143–179.
10. Levin R.L., Miller T.W. An optimum method for the introduction and removal of permeable cryoprotectants: isolated cells // Cryobiology. – 1981. – 18, № 1 – P. 32–48.
11. Rall W.F. Unpublished date // Cited by P.Masur in: Slow freezing injury in mammalian cells. In: The freezing of mammalian embryos. Ciba Found. Symp., Amsterdam: Elsevier, 1977 – P. 28.
12. Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M. Deep freezing of sheep embryos // J. Reprod. Fertil. – 1974. – 46 – P. 151–154.
13. Wilmut J., Rowson L.E.A. Experiments an the low temperature preservation of cow embryos // Vet Rec. – 1973. – 92. – P. 686–690.
14. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C // Science. – 1972. – 1978. – № 4. – P. 411–414.

Ин-т животноводства УААН,  
г. Харьков, п/о Кулинич

Поступила 23.01.95

М.Д.БЕЗУГЛИЙ, Н.О.ГОРДІЄНКО

## ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ ЯЙЦЕКЛІТИН ТА ЗАРОДКІВ ССАВЦІВ У РОЗЧИНАХ КРІОПРОТЕКТОРІВ. 1. Загальний опис змін клітинного об'єму

Інститут тваринництва УААН, м. Харків, п/о Кулинич

Розглянута осмотична реакція клітин у розчинах кріопротекторів. Запропоновано кількісний опис поведінки яйцеклітин і зародків за будь-яких змін об'єму у будь-який момент часу і показана залежність тривалості урівноваження клітини з середовищем від початкової і кінцевої концентрацій проникаючих і непроникаючих речовин. Визначені коефіцієнти проникності до гліцерину і диметилсульфоксиду для яйцеклітин і зародків миші та великої рогатої худоби, показано, що зона пеллюциду не має вибіркової проникності до низькомолекулярних речовин. Запропоновано механізм пошкодження яйцеклітин і зародків при насиченні та виведенні кріопротектора.

N.D.BEZUGLY, N.A.GORDIENKO

## OSMOTIC RESPONSE OF MAMMALIAN OOCYTES AND EMBRYOS IN CRYOPROTECTIVE SOLUTIONS. I. General description of changes in cell volume

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

Osmotic response of the cell was studied in cryoprotective solutions. There was proposed a quantitative description of the behavior of oocytes and embryos under any volume alterations at any time, and a dependence of the duration of cell getting equilibrated with the medium on the original and finite concentration of penetrating and non-penetrating substances. The factors of permeability to glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were determined for oocytes and embryos of mice and cattle; zona pellucida was shown not to possess a selective permeability to low molecular substances. There was proposed a mechanism of injury of oocytes and embryos during saturation by and elimination of a cryoprotectant.

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ БИООБЪЕКТОВ

УДК 612.111:57. 086.13

**С.Х.Межидов, В.А.Моисеев**

## ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ С 1,2-ПРОПАНДИОЛОМ НА СОХРАННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

В результате проведенных исследований установлено, что сочетание 1,2-пропандиола с различными высокомолекулярными кріопротекторами позволяет снизить его концентрацию при той же сохранности клеток. Кроме того, удается получать стабильные результаты по сохранению клеток в ресуспенсирующей среде в течение 3 сут после отмывки.

Существующие методы криоконсервирования, используемые на практике, основаны на применении низкомолекулярных проникающих в эритроциты кріопротекторов глицерина и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) [1, 2]. Недостатком этих методов являются относительно высокие концентрации используемых кріопротекторов, что требует неоднократных отмывок [1], или остающееся достаточно большое количество кріопротектора после однократной отмывки (до 1,5%) [2], накладывающее ограничения на количество переливаемой крови. Поэтому уменьшение концентрации кріопротекторов, используемых для криоконсервирования, является одной из важных задач. Эта цель может быть достигнута путем сочетания высоко- и низкомолекулярных кріопротекторов.

Достаточно малой токсичностью обладают низкомолекулярный 1,2-ПД [3], а среди высокомолекулярных – кріопротектор из ряда полиэтиленгликолей – ПЭГ-1500 [4]. В связи с этим нами проведены исследования влияния

сочетания 1,2-ПД с криопротекторами из ряда полиэтиленгликолей на сохранность эритроцитов при их замораживании.

Все использованные препараты марки ХЧ и ЧДА. Для экспериментов использовались эритроциты донорской крови человека 3–5 сут хранения при 4 °С. Перед экспериментом эритроциты отмывали физиологическим раствором хлорида натрия, приготовленным на 5 ммоль/л натрий-фосфатном буфере  $pH=7,2$ . Эритроциты смешивали с растворами 1:1 и разливали по 2 мл в стеклянные пробирки диаметром  $(9,3 \pm 0,3)$  мм и толщиной стенки  $(1,2 \pm 0,15)$  мм. Замораживание эритроцитов проводили со скоростью 12–14 °С/мин в специальном контейнере, который помещался в емкость с жидким азотом. После замораживания эритроциты переносили в жидкий азот на 20–30 мин, после чего отогревали со скоростью 10 °С/мин до  $(-100 \pm 10)$  °С, а затем на водяной бане 41–45 °С в течение  $(50 \pm 5)$  с [2]. После отогрева определяли гемолиз в надосадке или общие потери после отмывки. Гемолиз определяли по известной методике [5].

В табл. 1 приведены данные о зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации ПЭГ-1500. При этом концентрация 1,2-ПД – 26, натрия хлорида – 0,4, сахарозы – 2%. Из табл. 1 видно, что при концентрации ПЭГ-1500 выше 2% гемолиз эритроцитов в пределах 2%. При изучении зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации сахарозы (табл. 2) было установлено, что при концентрациях сахарозы 1–5% гемолиз более чем в 2 раза меньше, чем при ее отсутствии. При этом концентрация 1,2-ПД – 26, натрия хлорида – 0,4, ПЭГ-1500 – 2%.

Исследование зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-ПД (концентрация ПЭГ-1500 – 5, натрия хлорида – 0,4, сахарозы – 2%) показало (табл. 3), что эффективными являются его концентрации выше 24%. При исследовании зависимости гемолиза эритроцитов от концентрации хлорида натрия было установлено, что при концентрации выше 0,6% гемолиз увеличивается более чем в 2 раза и составляет  $(6,7 \pm 0,7)$  % (концентрация 1,2-ПД – 26, сахарозы – 2, ПЭГ-1500 – 2%).

Далее

была исследована зависимость гемолиза эритроцитов от различных высокомолекулярных криопротекто-

ров при их концентрации 6% (1,2-ПД – 32, сахароза – 3, натрия хлорид – 0,4%). Данные таких исследований представлены в табл. 4, из которой видно, что оксиэтилированный крахмал-180000 (ОЭК-180000), ПЭГ-1500, ПЭГ-3000, поливинилпирролидон-12600 дают высокую сохранность клеток после замораживания, отогрева, отмывки и ресуспендирования в 8в. После переноса в ресуспендирующую среду гемолиз эритроцитов во всех случаях находился в

Т а б л и ц а 1

Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации ПЭГ-1500 при криоконсервировании

| Концентрация, %<br>ПЭГ-1500 | 2             | 4             | 6             | 8             | 10            | 12            |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Гемолиз, отн., %            | $3,2 \pm 0,4$ | $1,8 \pm 0,3$ | $1,5 \pm 0,4$ | $1,6 \pm 0,7$ | $1,5 \pm 0,4$ | $2,0 \pm 0,3$ |

Примечание. Концентрация 1,2-ПД – 26, сахарозы – 2, натрия хлорида – 0,4%.

Т а б л и ц а 2

Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации сахарозы при криоконсервировании

| Концентрация, %<br>сахарозы | 0             | 1             | 2             | 3             | 4             | 5             |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Гемолиз, отн., %            | $6,4 \pm 1,9$ | $2,6 \pm 0,4$ | $1,9 \pm 0,4$ | $3,1 \pm 0,6$ | $2,3 \pm 0,3$ | $2,1 \pm 0,3$ |

Примечание. Концентрация 1,2-ПД – 26, ПЭГ-1500 – 2, натрия хлорида – 0,4%.

Т а б л и ц а 3

Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации 1,2-ПД при криоконсервировании

| Концентрация, %<br>1,2-ПД | 20             | 22             | 24            | 26            | 28            | 30            | 32            | 34            | 38            |
|---------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Гемолиз, отн., %          | $17,7 \pm 2,6$ | $12,4 \pm 1,3$ | $8,5 \pm 0,9$ | $2,7 \pm 0,3$ | $2,4 \pm 0,4$ | $1,7 \pm 0,3$ | $1,6 \pm 0,4$ | $1,0 \pm 0,6$ | $1,0 \pm 0,6$ |

Примечание. Концентрация сахарозы – 2, натрия хлорида – 0,4, ПЭГ-1500 – 5%.

Т а б л и ц а 4

Зависимость гемолиза эритроцитов от концентрации различных высокомолекулярных соединений при криоконсервировании

| Высокомолекулярные соединения, 6%-е | ОЭК-180000 | ПВП-12600 | ПЭГ-1500 | ПЭГ-3000 |
|-------------------------------------|------------|-----------|----------|----------|
| Гемолиз, отн., %                    | 4,1±0,5    | 4,3±0,5   | 3,9±0,5  | 3,8±0,5  |

Примечание. Концентрация 1,2-ПД – 32, натрия хлорида – 0,5, сахарозы – 3%.

диапазоне (0,3 ± 0,1) %. На 3-и сут гемолиз во всех образцах не превышал 1%, в то время как на 4-е сут во всех образцах он превышал

2%. Сочетание ОЭК-180000 с желатиной (по 2%) не дало улучшения результатов. Здесь также на 4-е сут гемолиз эритроцитов был более 2%, что указывает на наличие скрытых повреждений.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование высокомолекулярных соединений позволяет снизить концентрацию проникающего криопротектора 1,2-ПД, увеличить сроки хранения эритроцитов в ресуспендирующей среде до 3 сут. В экспериментах, проведенных совместно с А.М.Воротилиным, сохранность эритроцитов в ресуспендирующей среде после криоконсервирования с “Пропандиосахаролем” была 3–4 сут.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилов О.К., Аграненко В.А. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, предназначенных для трансфузии. Метод. рекоменд. – М.: МЗ СССР, 1980. – 35 с.
2. Грищенко В.И., Воротилин А.М., Гучок В.М. и др. Криоконсервирование эритроцитов под защитой криоконсерванта “Пропандиосахароль”. Метод. рекоменд. – Харьков: МЗ СССР, 1990. – 12 с.
3. Гучок В.М., Зборовская Э.А. Токсичность α-пропиленгликоля // Криобиология и криомедицина. – 1980, вып. 7. – С. 46–49.
4. Гучок В.М. Сравнительное исследование токсичности этиленгликоля в раннем постнатальном онтогенезе // Там же, с. 34–39.
5. Рождественская М.А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. М.: Медгиз, 1955. – С. 55–58.

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

Поступила 30.11.94

С.Х.МЕЖІДОВ, В.О.МОЙСЕЄВ

## ВПЛИВ СПОЛУЧЕННЯ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ З 1,2-ПРОПАНДІОЛОМ НА СХОРОННІСТЬ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків

У результаті проведених досліджень встановлено, що сполучення 1,2-пропандіола з різними високомолекулярними криопротекторами дозволяє зменшити його концентрацію при тій же схоронності клітин. Крім того, вдається одержати стабільні результати на протязі 3 діб після відмивання.

S.KH.MEZHDIDOV, V.A.MOISEYEV

## EFFECT OF COMBINED TREATMENT BY HIGHLY MOLECULAR CRYOPROTECTANTS AND 1,2-PROPANEDIOL ON SURVIVAL OF RED BLOOD CELLS DURING CRYOPRESERVATION

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

The experimental investigations conducted has shown that a combination of 1,2-propanediol with various highly molecular cryoprotectants permits to reduce its concentration with the same survival of cells. Besides, it becomes possible to obtain stable results of cell survival in a resuspending medium throughout 3-day period after washing.

## ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ОСТРОВКОВОЙ ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОФИЛАКТИКЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Диабетическая ангиопатия нижних конечностей – одно из самых тяжелых и грозных проявлений сахарного диабета. Развитие микроангиопатий и атеросклероза средних и крупных сосудов нижних конечностей как следствие прогрессирования заболевания приводит довольно часто к вынужденному хирургическому вмешательству – ампутации. Считают [2–6], что наиболее перспективными в плане профилактики и лечения сахарного диабета и его осложнений в настоящее время являются хирургические методы – трансплантация поджелудочной железы, имплантата ее фрагментов или клеток и их культур. Оптимальным источником имплантационного материала при этом является поджелудочная железа плодов человека, получаемая в результате абортов по медицинским показаниям, либо железа новорожденных поросят. Особенностью ткани этого возрастного периода является содержание богатых  $\beta$ -клетками ациноинсулярных комплексов, которые, как правило, не встречаются в железе взрослых людей или половозрелых животных. Надежным методом длительного хранения биоматериала для его использования в плановом и экстренном лечении больных с сахарным диабетом является его замораживание до субнулевых температур с последующим хранением в криобанке.

Целью данного исследования было изучение эффективности имплантации криоконсервированной островковой ткани поджелудочной железы (ОТПЖ) новорожденных поросят в профилактике хирургических осложнений у больных сахарным диабетом.

Под наблюдением в течение 6–20 мес находились 80 больных сахарным диабетом в возрасте от 20 до 65 лет, из которых 30 была произведена имплантация криоконсервированной ОТПЖ: 13 женщинам и 17 мужчинам. Контрольная группа включала 50 человек: женщин – 28, мужчин – 22. Клиническое обследование больных включало: анализ крови и мочи, определение сахара в крови по методу Хагедорна-Йенсена, определение содержания сахара в моче экспресс-методом, определение общего холестерина по методу Илька, определение липопротеидов по методу Брунштейн-Самали, определение неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крови; состояние кровообращения исследовалось методом реовазографии (РВГ). Ткань поджелудочной железы получали как описано в работе [7], после чего замораживали по методике [1]. Имплантация 5 мл биоматериала, приготовленного на физиологическом растворе, была проведена внутримышечной инъекцией под местной анестезией. Анализ наиболее адекватных показателей степени компенсации и тяжести заболевания сахарным диабетом – уровни гликемии и доз вводимого инсулина – свидетельствует о том, что имплантация криоконсервированной ОТПЖ позволяет снизить уровень гликемии при прежней либо меньшей дозе инсулина. Показатели жирового обмена до и после лечения в контрольной и исследуемой группах также свидетельствуют о том, что имплантация ОТПЖ ведет к нормализации жирового обмена. Так, содержание НЭЖК и холестерина в сыворотке крови больных сахарным диабетом контрольной группы средней тяжести с субкомпенсированным и декомпенсированным течением снижалось ( $p < 0,05$ ) меньше, чем у больных сахарным диабетом исследуемой группы с таким же течением заболевания, которым в комплексном лечении использовалась криоконсервированная ОТПЖ. Анализируя показатели РВГ в контрольной и исследуемой группах, можно констатировать, что за короткий срок (3–4 недели), прошедший после имплантации, имеется явная тенденция к улучшению реовазографических показателей у больных с I–II степенью ишемии. Нами изучен катамнез в течение 4 лет у 40 больных: 20 человек (1-я группа, контрольная) – больные, которые лечились традиционными методами и 20 человек (2-я группа) – больные, которым на фоне комплексной терапии диабетических ангиопатий произведена имплантация криоконсервированной культуры ОТПЖ. Сравнительный анализ катамнестических данных у равноценных групп по количеству больных и по тяжести сахарного диабета показал, что в течение 4 лет среди 10 больных контрольной группы со средней и тяжелой степенью заболевания 1/3 и 2/3 голени ампутированы в 13% случаев, а в такой же по составу исследуемой группе аналогичная ампутация произведена в 7% случаев ( $p < 0,01$ ). За этот же срок среди 15 больных контрольной группы стопа ампутирована в 13% случаев, а среди больных исследуемой группы – в 7% случаев ( $p < 0,01$ ). В меньшем количестве в исследуемой группе ампутированы пальцы.

Таким образом, имплантация криоконсервированной ОТПЖ является патогенически обоснованным дополнительным методом лечения и эффективным средством профилактики, предотвращающим развитие хирургических осложнений у больных сахарным диабетом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюмкин В.Н., Шумаков В.И. Лечение больных инсулинозависимым сахарным диабетом с помощью свободной трансплантации островковых клеток поджелудочной железы // XI Всесоюз. научн. конференция по трансплантации сердца, печени, почек, поджелудочной железы и др. органов: Тез. докл., Львов: Б.и., 1990. – С. 38–40.
2. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии. – Киев: Здоров'я, 1973. – 145 с.
3. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии. – М.: Медицина, 1989. – 288 с.
4. Ефимов А.С. О характере артериальной гипертензии, развивающейся у лиц, больных ювенильным сахарным диабетом // Эндокринология. – Киев: Здоров'я, 1985. – Вып. 15. – С. 51–54.
5. Кулешов Е.В. Хирургические заболевания и сахарный диабет. – Киев: Здоров'я, 1990. – 184 с.
6. Макаренко Г.Н., Бойко Н.И., Петровский М.П. Коррекция гликемии при гнойной хирургической инфекции у больных сахарным диабетом методом трансплантации эндокринной ткани поджелудочной железы // II научн. Всесоюз. конференция по трансплантации сердца, поджелудочной железы и др. органов: Баз. докл., Львов, окт. 1991. – С. 88–89.
7. Павловский М.Н., Бойко Н.И. Интрапортальная аллотрансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы в комплексном лечении хирургических больных сахарным диабетом // Вестн. хирургии. – 1990. – 145, № 10. – С. 29–31.

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

Поступило 17.11.95

## РЕЦЕНЗИЯ

**На книгу: А.М.Белоус, В.И.Грищенко. Криобиология.  
– Киев: Наук. думка, 1994. – 431 с.**

Авторы монографии “Криобиология” член-корреспондент НАН Украины, член редколлегии журнала “Cryo-Letters” А.М.Белоус и академик НАН Украины, член редколлегии журнала “Cryobiology” В.И.Грищенко – криобиологи с мировым именем. Издание монографии очень актуально, так как до сих пор не было учебного пособия, которое освещало бы общие и частные вопросы теории и практики криобиологии. Рецензируемая монография написана как бы в двух ракурсах: с одной стороны, она содержит строго научные данные, а с другой, – данные, доступные пониманию биологов, химиков, физиков и других специалистов, способных разобраться в специальных терминах.

В предисловии подчеркивается, что монографии и другие труды, посвященные вопросам криобиологии, были опубликованы более 20 лет назад, и многие научные положения требуют обновления и развития.

Первая глава посвящена истории развития и научно обоснованным реальным задачам в области криобиологии и криомедицины. Обладая огромным опытом работы в данной области, авторы более осторожны в оценке реализации практических задач и возможности их решения, особенно в области криоконсервирования органов и организмов.

В следующих четырех главах (2–5) изложены существующие представления о механизмах криоповреждений биообъектов: о значении воды и температурной стабилизации биообъектов различного уровня организации; структуре и физико-химических свойствах льда; механизмах и динамике процессов кристаллообразования. При этом использована современная информация в объеме, достаточном для получения общих представлений о характере и основах криобиологии. Подобного рода материалы представляют огромную ценность для поступающих в аспирантуру и для начинающих сотрудников, сдающих экзамены по специальности.

Глава 6 посвящена характеристике свойств проникающих и непроникающих криопротекторов, механизмов их криозащитного действия. Впервые в монографии достаточно подробно описаны свойства нового, завоевывающего свои позиции в криобиологии криопротектора 1,2-пропандиола, который ранее был отнесен к малоперспективным, хотя работы П.Дузу и особенно сотрудников Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

показали, что он является эффективным криопротектором для защиты как макромолекул, так и клеток и органов.

В главах 7 и 8 представлены данные о характере низкотемпературных изменений ферментных систем и плазматических мембран, что дополняет и расширяет содержание главы 2, а также современные методы исследования структуры макромолекул и мембран, рассмотрена взаимосвязь их структуры и функции.

В главах 9, 10 и 11 освещены различные способы криоконсервирования клеточных суспензий, тканей и органов человека и животных, а также приемы и способы замораживания, длительного хранения и размораживания биоматериала с использованием современной аппаратуры. Приведенный в этих главах огромный экспериментальный материал изложен лаконично и довольно полно.

Глава 12 посвящена аспектам применения низких температур в экспериментальной и клинической медицине. Эту главу условно можно разделить на три части: первая – общее охлаждение организмов в естественных условиях и гипотермия тела человека, вторая – местная гипотермия тканей и органов, третья – локальная криотерапия тканей и органов. Каждый из разделов представлен довольно емко, а для более детального изучения вопросов рекомендована дополнительная литература. По-видимому, к рекомендованной литературе следует добавить книгу Г.А.Бабийчука и др. “Гипотермия в лечении острых отравлений”. Глава особенно интересна для начинающих исследователей в области медицины, медицинской ветеринарии и других биологических наук.

В 13-й главе представлены механизмы естественного ана- и гипобиоза, затрагиваются актуальные вопросы довольно нового раздела в современной криобиологии. В ней показано, что без раскрытия механизмов перехода организмов в состояние зимней спячки, анабиоза и других анабиотических состояний невозможно дальнейшее продвижение криобиологической науки в вопросах низкотемпературного консервирования органов и целых организмов. Представляется, что это самая интересная и важная глава, так как имеющаяся в мире литература по вопросам анабиоза, мезобиоза и гибернации носит, в основном, описательный характер и мало раскрывает молекулярные и клеточные механизмы регуляции и адаптации систем к низким температурам. Несомненный интерес для самого широкого круга исследователей представляет и 14-я глава, которая посвящена проблемам сохранения генофонда растительных объектов.

В целом, выход в свет книги А.М.Белоуса и В.И.Грищенко “Криобиология” несомненно знаменует собой важную веху в развитии теоретических основ фундаментальной и прикладной криобиологии. Монография весьма богата новыми идеями и по своему научному значению должна по праву занять важное место в современной науке, подводя итоги развития криобиологии и криомедицины на данном этапе.

К сожалению, рецензируемую книгу практически невозможно приобрести, так как вышла тиражом 400 экземпляров и была раскуплена сразу же после выхода в свет. Поэтому было бы желательно издать эту книгу большим тиражом.

В.А.Моисеев

## ХРОНИКА

С 6 по 11 июля 1995 г. в городе Медисон (штат Висконсин, США) проходило 32-е ежегодное совещание Общества криобиологов США. Инициатором его проведения был профессор университета штата Висконсин James H. Southard. В рамках этого совещания было проведено 8 сессионных заседаний, симпозиум и 2 заседания, на которых были представлены стендовые доклады. В работе совещания приняли участие криобиологи из США, Великобритании, Франции, Германии, Японии, Украины, Бельгии, Канады, Китая, Австралии, Венгрии, Болгарии и Тайваня.

Были заслушаны доклады по основным разделам: "Хранение тканей и органов" (председатели – J.Kruuv и B. Fuller), "Криоконсервация продуктов крови" (председатель – A.Sputtek), "Криоконсервация I: клеток и тканей" (председатель – D.Pegg), "Криохирургия" (председатель – J.Baust), "Криопротекторы: натуральные и ненатуральные" (председатели – D.Yang и A.DeVries), "Холодовая акклиматизация и повреждения растений замораживанием" (председатели – D.Hincha и J.Duman), "Фундаментальная криобиология/витрификация" (председатели – J.McGath и K.Diller), "Криоконсервация II: гаметы и эмбрионы" (председатели – S.Leibo и W.Rall).

Под председательством P.Mazur был проведен симпозиум "Острые повреждения охлаждением (chilling injury) при криобиологическом сохранении животных клеток".

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ (г. Харьков, Украина) был представлен докладами директора института академика В.И.Грищенко и д.б.н. А.С.Капсельянца.

В целом работа 32-го совещания Общества криобиологов прошла в деловой и дружеской обстановке и участники совещания смогли не только обменяться новой научной информацией, но и благодаря радушному приему организаторов приятно провести время в живописном университетском городе Медисон.

А.С.Капсельянец

## **I съезд Украинского общества криобиологии и криомедицины**

Украинское общество криобиологии и криомедицины (УОКиК) зарегистрировано в Министерстве юстиции Украины 22 июля 1994 г. как добровольная самоуправляющаяся общественная организация, которая объединяет преподавателей и научных работников, специализирующихся в области криобиологии и криомедицины.

Основные задачи общества таковы:

- содействие внедрению научно-исследовательских работ по криобиологии и криомедицине в практику;
- обмен информацией между членами общества по вопросам криобиологии и криомедицины
- содействие подготовке научных кадров в области криобиологии и криомедицины;
- развитие международного сотрудничества по вопросам, относящимся к уставной деятельности.

В целях реализации поставленных задач 18–20 октября 1995 г. в г. Харькове состоялся I съезд УОКиК. На организационном заседании с докладом "О целях и задачах создания Украинского общества криобиологии и криомедицины" выступил его председатель академик НАН Украины В.И.Грищенко. Съезд утвердил план работы Правления общества и рассмотрел вопрос о вступительных и членских взносах.

На съезде присутствовало более 130 делегатов ( из них 27 докторов и 75 кандидатов наук), которые прибыли из многих областей Украины, а также из России и Японии.

В дни работы съезда были заслушаны и обсуждены научные доклады по следующим направлениям:

1. Механизмы криповреждений и криозащиты биологических объектов.
2. Низкотемпературные банки и проблемы криоконсервирования биологических объектов.
3. Современные аспекты применения низких температур в медицине.
4. Механизмы адаптации млекопитающих и растений к пониженным температурам.
5. Криобиологическое приборостроение.

Интересная научная информация была представлена в стендовых докладах. Живой интерес и дискуссию вызвал “круглый стол” на тему “Клеточная терапия”. Заинтересованные могли посетить выставку криобиологического оборудования. В решении съезда УОКиК отмечено, что с развитием криобиологии как науки возросло ее значение в решении проблем медицины, сельского хозяйства и промышленности. Изданы тезисы докладов, представленных на съезде.

В.И.Гарбуз

Администрация Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины ставит в известность научную общественность организаций медико-биологического профиля, врачей практического здравоохранения и других заинтересованных лиц о возобновлении работы специализированного совета Д 50.21.01 при ИПКиК НАН Украины.

Принимаются к защите диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата медицинских и биологических наук по специальности “Криобиология”.

Контактный телефон для справок (0572) 72-41-43.



## НИКОЛАЙ СИДОРОВИЧ ПУШКАРЬ

21 июля 1995 года скончался выдающийся ученый, основатель отечественной криобиологии член-корреспондент Национальной Академии наук Украины и Академии медицинских наук Украины, профессор, доктор медицинских наук, лауреат Государственной премии СССР Николай Сидорович Пушкарь.

Н.С.Пушкарь родился 3 августа 1930 г. в с. Шолохово, Никопольского района Днепропетровской области. После окончания Днепропетровского медицинского института и аспирантуры в Украинском институте усовершенствования врачей Николай Сидорович на протяжении ряда лет занимался организационной деятельностью в области медицины и медицинского образования. В 1963 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1969 г. ему была присвоена ученая степень доктора медицинских наук по специальности “хирургия”, а в 1978 г. избран членом-корреспондентом АН УССР по специальности “криобиология”. С 1972 г. по 1983 г. он возглавлял созданный по его инициативе Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, проявив себя талантливым организатором науки, сумевшим объединить усилия ученых разных специальностей для развития нового в стране, чрезвычайно перспективного научного направления. Как руководителю академического института ему были присущи инициативность, огромная работоспособность, чувство нового, умение ставить и решать масштабные научные и организационные задачи. Н.С.Пушкарь руководил важнейшими фундаментальными исследованиями, направленными на изучение механизмов криоповреждения и криозащиты клеточных структур, а также многочисленными прикладными разработками, многие из которых уже сейчас широко используются в медицине и народном хозяйстве. Впервые в мире им и его учениками были разработаны количественные теоретические модели явлений и процессов, протекающих на различных этапах цикла низкотемпературного консервирования костного мозга, ткани щитовидной железы, лейкоконцентрата и лимфоконцентрата периферической крови человека, а также новые методики лечения с применением указанных объектов и холодовых воздействий. Н.С.Пушкарь был инициатором разработки и создания оригинальной аппаратуры для низкотемпературного консервирования биологических объектов, а также приборов для исследования их структуры и состояния как в процессе замораживания-отогрева, так и после деконсервации. Он был научным руководителем 26 диссертационных работ, создал научную школу в области фундаментальной криобиологии. Общий стаж педагогической работы Н.С.Пушкаря составил 27 лет.

За достижения в области фундаментальной криобиологии Н.С.Пушкарь был удостоен премии им. А.А.Богомольца, а за работы в области прикладной криобиологии и криомедицины – Государственной премии СССР. Н.С.Пушкарь автор 9 монографий, более 300 научных работ и 40 изобретений. Вклад Н.С.Пушкаря в развитие отечественной науки и здравоохранения отмечен орденами Трудового Красного Знамени и “Знак Почета”, медалью, знаком “Отличник здравоохранения”.

Научная общественность, друзья, коллеги, родные и близкие глубоко скорбят в связи с безвременным уходом из жизни Николая Сидоровича Пушкаря.

## ЕВГЕНИЙ ЯКОВЛЕВИЧ ПАНКОВ

26 июля 1995 г. скоропостижно скончался академик Академии наук национального прогресса, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Харьковского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор Панков Евгений Яковлевич.

Е.Я.Панков родился 5 октября 1932 г. в г. Могилеве в семье военнослужащего. В 1956 г. он окончил Харьковский медицинский институт и с 1960 г. после успешной защиты кандидатской диссертации продолжил свою научную и трудовую деятельность в НИИ ортопедии и травматологии. В 1972 г. интенсивная научно-исследовательская работа завершилась защитой докторской диссертации.

Е.Я.Панков – поистине многогранный и талантливый ученый: морфолог, цитолог, гистолог, эмбриолог, физиолог, ортопед и т. д., он один из основоположников ряда новых направлений и идей в биологической науке, в частности в криобиологии. Будучи заведующим отделом криоморфологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (1974–1976 гг.), он способствовал развитию новых направлений в криобиологии, им были обобщены данные о характере нарушений структурно-функциональной организации клетки при криоконсервировании. Использование новых возможностей цитохимического анализа – анализ структуры популяции клеточных элементов ферментного спектра клетки, исследование координации обмена клетки – позволило сделать новые выводы о характере нарушения структурно-функциональной организации клетки при низкотемпературном консервировании и открыло перспективы для направленного анализа биологических систем в экстремальном состоянии. Исследования в области криоконсервации клеток костного мозга и крови позволило заключить, что криоконсервирование клеток костного мозга и крови ведет к образованию новой клеточной популяции, обогащенной пролиферирующими клетками. С именем Е.Я.Панкова связано и рождение нового научного направления – криобиологии обновления, которое он обогатил и собственными данными, показав, что трансформирующее действие криоконсервирования (криоохлаждения) суставного хряща меняет ход деформирующего артроза, формируя новые отношения в суставе. Исследования в области криобиологии обновления совместно с сотрудниками ИПКиК НАН Украины (В.И.Грищенко, Э.И.Обозная) он отдавал много творческих сил на протяжении последних 20 лет. Результаты этой работы отражены в значительном количестве совместных научных трудов. Новое явление состоит в том, что биообъекты, в частности животные, растительные и дрожжевые клетки, пережившие криоконсервирование, образуют качественно новую, функционально более полноценную клеточную популяцию путем изменения морфологии, функции и регуляции клеточного генома. Идея качественного обновления криоконсервированных биообъектов не потеряла своей актуальности и в наши дни, она нашла поддержку ряда зарубежных и отечественных ученых.

Е.Я.Панков был не только заведующим кафедрой, крупным ученым, но и Учителем в самом высоком и благородном смысле этого слова. Блестящий лектор и талантливый педагог, он внес существенный вклад как в дело подготовки специалистов – гистологов, цитологов и эмбриологов, – так и в развитие идей и методов в биологии и медицине, в частности в криобиологии и криомедицине. Острый ум, блестящая память, высокий интеллект и широкая эрудиция позволили Е.Я.Панкову стать крупнейшим ученым современности, который на протяжении 40 лет все свои силы отдавал научной и педагогической



деятельности. За это время им было опубликовано около 350 научных работ, среди которых 7 монографий, подготовлены 21 кандидат наук, 3 доктора наук. Итоги научной деятельности были отмечены двумя серебряными медалями ВДНХ, медалью им. Пуркинье Европейского общества анатомов, гистологов и эмбриологов, отражены в 22 авторских свидетельствах. Под его руководством и при непосредственном участии было издано учебное пособие “Микроморфология человека” в двух частях (1993–1994 г.), а также многочисленные методические рекомендации для студентов.

Е.Я.Панков вел всестороннюю общественную деятельность, являясь членом трех специализированных советов: ХГМУ, ИПКиК НАН Украины и НИИ ортопедии и травматологии. Много внимания он уделял издательской деятельности, являясь членом редакционных коллегий журналов “Проблемы криобиологии”, “Ортопедия и травматология”, а также главным редактором журнала “Вестник проблем современной медицины”, который издается с 1993 г.

Обладая глубокими знаниями, огромным опытом, большим тактом руководителя и личным обаянием, Е.Я.Панков завоевал признательность и любовь друзей, сотрудников, аспирантов и студентов. Он сумел объединить усилия морфологов, физиологов и генетиков в решении общих проблем. Светлая память о добром и отзывчивом товарище, коллеге и Учителе не угаснет в сердцах тех, кто был рядом с ним при жизни.

# ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ

3<sup>1995</sup>

Проводится подписка на журнал "Проблемы криобиологии". С 1985 г. научно-теоретическое издание выходило под названием "Криобиология", с 1991 г. – "Проблемы криобиологии". Издается на русском и английском языках. Объем 5,6 печ. л., периодичность четыре номера в год. В журнале публикуются фундаментальные и прикладные работы по проблемам охлаждения и замораживания в биологии, медицине и пищевой промышленности, низкотемпературному консервированию клеток и тканей, их сублимационному высушиванию и созданию криогенной техники. Освещаются вопросы гибернации, холодостойкости животных и растений.

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

Our Journal PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY is published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukrainian Academy of Sciences in Russian and in English. The journal provides basic information to researchers investigating the various phenomena involved in the interaction between low temperatures and living cells or tissue, as well as to clinicians who are undertaking trials of hypothermia. Particular emphasis is laid upon ongoing research on topics which are of utmost importance with regard to preservation of cells, tissues and organs, cell damage caused by freezing, cold acclimation and hardiness in plants, mechanisms of cold survival in animals and microorganisms. The journal draws from diverse related disciplines such as morphology, physiology, genetic molecular biology, pathology, biochemistry, immunology, pharmacology and pharmaceuticals, low temperature techniques and equipment. A subscription to PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY includes 4 issues a year.

Subscription orders should be addressed to  
Editor-in Chief V.I.Grishchenko  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of the Ukraine  
23 Pereyaslavskaya Str., 310015 Kharkov, The Ukraine  
Tel. (0572) 72-41-43  
Fax (0572) 72-00-84

ИНДЕКС 70474

ISSN 0233-7673 ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ. 1995. №3. 1-56